

## RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

### INFECTOLOGÍA I

**0001. (0821) ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS Y POLIMORFISMOS DEL PROMOTOR DEL GEN DEL TNF-ALFA.** ML Gallo Vaulet<sup>1</sup>, AC Entrocassi<sup>2</sup>, AI Corominas<sup>2</sup>, M Rodríguez Fermepin<sup>1</sup>

*1 Inmunología Clínica, Dpto. Bioquímica Clínica, Fac. de Farmacia y Bioquímica UBA, 2 Unidad de Estudios de Chlamydia, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA*

El polimorfismo G-308A en el promotor del gen del TNF-alfa ha sido estudiado como determinante potencial de susceptibilidad a infección por leishmania o a formas graves de eclampsia y sepsis. En las infecciones por *Chlamydia trachomatis* (CT) este polimorfismo ha sido asociado a mayores lesiones en Tracoma, pero no se halló asociación en pacientes con salpingitis. La frecuencia del alelo A varía entre el 1 y el 20%. Se estudió la frecuencia alélica del polimorfismo G-308A en dos poblaciones (una población sintomática con demanda diagnóstica para infección por CT, y otra asintomática que participó de ensayos de tamizaje para CT), se evaluó la relación entre el polimorfismo y la infección por CT, y entre polimorfismo y genotipo de CT. Los genotipos de CT y el polimorfismo del TNF se determinaron mediante PCR-RFLP. Entre los 218 individuos asintomáticos, (9 infectados por CT) el 82.5% portaba el alelo G homocigota, 16.1% eran heterocigotas y 1.4% eran homocigotas A. En los 338 pacientes (20 infectados por CT) se observó una distribución muy similar (GG: 84.6%; GA:14.8%; AA:0.6%). No se observó diferencia significativa entre la población asintomática y la población con demanda diagnóstica. La frecuencia poblacional del alelo A hallada fue baja. La distribución de los alelos hallada en los 29 infectados por CT fue: homocigotas GG: 89,66% y heterocigotas: 10,34% (esta diferencia no fue significativa). Los genotipos de CT detectados fueron: D, E, G, H, I y K. En el grupo de homocigotas G, la distribución fue: 13 E (50%); 5 D (19,23%); 3 G (11,54%), 2 H (7,69%), 2 K (7,69%) y 1 I (3,85%). En los heterocigotas fue: 1 E, 1G y 1 I (33,33% cada uno). Si bien el número de muestras es escaso y las diferencias son no significativas, se observa una menor frecuencia del genotipo E en los heterocigotas. Como el alelo A presentó una baja circulación en la población estudiada, se hace necesario ampliar la muestra para confirmar estos resultados.

**0002. (0694) ESTUDIOS IN VITRO DE LA INHIBICIÓN DEL BIOFILM DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA Y ELASTASA EN ESPUTOS DE PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA.** AN Ramos<sup>1</sup>, M Rachid<sup>1</sup>, A Venecia<sup>2</sup>, L Perrot<sup>2</sup>, E Fernández<sup>3</sup>, JC Valdez<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología, Universidad Nacional de Tucumán, 2 Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán, 3 Laboratorio Bacteriológico Central, Hospital Central de Salud Zenón Santillán. Tucumán. Argentina*

En la Fibrosis quística (FQ), la viscosidad del moco predispone a infecciones pulmonares crónicas por *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) productoras de biofilm (Bf). La infección induce una inflamación bronquial exacerbada dominada por PMN cuyos componentes líticos tales como la elastasa, produce severos daños

tisulares. **Objetivo:** Estudiar la inhibición producida por DNasa y sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus plantarum* (SLp) sobre el Bf de Pa y elastasa (Easa) en esputos de pacientes con FQ (EFQ). **Materiales y Métodos:** Cepas: Pa de muestra clínica (PaC) y mutante no productora de acil-homoserin lactonas (AHLs) (Pa119). En micro placas realizamos pruebas de síntesis e inhibición de Bf con ambas cepas utilizando: EFQ, lisados de PMN, sobrenadante de Pa (SPa), DNasa y SLp. Se cuantificó el Bf por la técnica de cristal violeta. La Easa en los EFQ y PMN, solos y adicionados con DNasa y/o SLp se midió por el método de Rojo congo-Elastina. Estadística: t de Student. P<0.05 es considerado estadísticamente significativo. **Resultados:** La PaC produce más Bf que la Pa119 (p<0.05). La producción de Bf es inhibida por la dilución (p<0.05), el SLp (p<0.001) y la DNasa (p<0.005) y es estimulado por SPa homólogo (p<0.001). En pacientes no nebulizados con DNasa, la Easa es menor que en los nebulizados (p<0.005). La fluidificación del moco con DNasa in vitro produce una liberación de Easa que se manifiesta mas en los nebulizados (p<0.005). El SLp inhibe la Easa de EFQ y PMN. **Conclusiones:** Las AHLs son importantes en la síntesis de Bf pero otras sustancias del SPa también intervendrían en dicha síntesis. El SLp que inhibe las AHLs, pero no a la DNasa, inhibe el Bf. El moco promueve la formación de Bf. La Easa es liberada del moco por la DNasa tanto in vivo como in vitro y es inhibida in vitro por el SLp. La DNasa fluidifica el moco e inhibe el Bf. El SLp inhibe el Bf y la Easa. SLp y DNasa, podrían usarse juntos en la terapia de FQ

**0003. (0346) APOPTOSIS INDUCIDA POR LA PROTEÍNA X DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN HEPATOCITOS HUMANOS. VÍAS INTRACELULARES INVOLUCRADAS.** L Barbini, F Cardoso, R Campos

*Cátedra de Virología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*

La proteína X del virus de la hepatitis B (HBV-X) está asociada a la patogénesis de la enfermedad hepática en la infección crónica por HBV. Según los genotipos infectantes, la progresión de la enfermedad es variable. HBV-X induce la muerte celular por apoptosis y sus propiedades biológicas podrían diferir en los distintos genotipos. El estudio de la actividad biológica de HBV-X permitirá esclarecer los mecanismos de patogenia de la infección por HBV. El objetivo del trabajo fue estudiar las vías intracelulares involucradas en la inducción de apoptosis por HBV-X de genotipos A y F en hepatocitos humanos. Se utilizaron células de hepatoma [Hep3B, p53 (-)], con expresión de HBV-X. Se estudió la expresión de proteínas regulatorias de la apoptosis [familia Bcl-2: antiapop (Bcl-2 y Bcl-X) y pro-apop (Bad y Bax)]. Se determinaron actividades de caspasas (3 y 8). Al estudiar la expresión de las proteínas regulatorias en Hep3B con expresión de HBV-X de genotipos A y F, se detectó aumento de las pro-apoptóticas (Bad y Bax), y disminución en Bcl-X (anti-apoptótica). Este balance definiría el destino del hepatocito hacia la muerte por apoptosis. Además, se detectó actividad de casp-3 en los hepatocitos expresando HBV-X, mientras que no se detectó actividad de casp-8. La ausencia de actividad de casp-8 excluye a la vía extrínseca en el mecanismo de muerte inducida por HBV-X. Los resultados sugieren que la vía apoptótica involucrada es la intrínseca. En conclusión, la apoptosis de los hepatocitos inducida por HBV-X de los genotipos A y F, resulta de la modulación en la expresión de proteínas regulatorias de la familia de Bcl-2, con un balance a favor de la expresión de proteínas pro-apoptóticas sobre las anti-

apoptóticas. La vía intrínseca de la apoptosis está involucrada en la muerte inducida por HBV-X en este tipo celular, y sería independiente de p53.

**0004(0459). LA CÚRCUMA ACTIVA LA PRODUCCIÓN VIRAL POR MODULACIÓN DEL ESTADO RÉDOX EN LÍNEAS PROMONOCÍTICAS HUMANAS PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON HIV-1.** CE Espada<sup>1</sup>, D Riva<sup>2</sup>, G Dolcini<sup>1</sup>, L Martínez Peralta<sup>1</sup>, S Mersich<sup>2</sup>

1 Centro Nacional de Referencia para el SIDA- Facultad de Medicina- UBA, 2 Laboratorio de Virología- FCEyN-UBA

El compuesto natural Curcumina (Cur) ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y proapoptóticas. Sin embargo, su uso en distintos modelos de infección por el virus HIV-1 ha arrojado resultados contradictorios. En nuestro laboratorio, trabajos previos demostraron que Cur disminuye la replicación viral en células de origen linfocítico persistentemente infectadas con HIV-1. **Objetivo:** Estudiar el efecto del tratamiento con Cur sobre la producción viral y su relación con parámetros de citotoxicidad y estrés oxidativo en células promonocíticas persistentemente infectadas con HIV-1 (U1). **Materiales** y métodos: Células U1 y células control, U937 fueron incubadas con Cur (1.5 y 15  $\mu$ M) en RPMI 5% SFB. Luego de 48 h se determinaron: i) producción viral en sobrenadante: medición de p24 por ELISA; ii) viabilidad celular(VC): tinción con azul tripan; iii) citotoxicidad celular: liberación de ácido láctico (LA); iv) contenido en glutatión reducido (GSH) y v) actividad superóxido dismutasa (SOD) en células lisadas. Se asignó al tratamiento Control (CC=RPMI 5% SFB) un valor de 100% en los ensayos i), ii) y iv). **Resultados:** Ambas concentraciones de Cur aumentaron significativamente p24 respecto al CC (1,5  $\mu$ M=150% y 15 $\mu$ M=200%,  $p<0.05$ ). Sólo en células U1, 15  $\mu$ M de Cur disminuyó significativamente la viabilidad celular (63.3 $\pm$ 3%) que se correspondió con un aumento en la citotoxicidad celular (CC=418.9 $\pm$ 4.8 y 15 $\mu$ M=504.6 $\pm$ 48.5  $\mu$ gLA/106 cél). En ambas líneas celulares, Cur aumentó GSH en función de la dosis entre 25 y 150 $\pm$ 4%. En U937, SOD aumentó hasta 4.5 $\pm$ 0.5 veces respecto a CC, mientras que disminuyó en U1 hasta un valor de 0.5 $\pm$ 0.3 Conclusiones: Estos resultados sugieren que, en el linaje celular estudiado, Cur modula el estado redox y aumenta la citotoxicidad celular, lo cual se reflejaría en el aumento de la producción viral.

**0005. (0610) EFECTO DE ACANTHOSPERMAL B, UNA SUSTANCIA NATURAL, SOBRE INFECCIONES AGUDAS EN PIEL PROVOCADAS POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO-RESISTENTE.** ME Arena<sup>2,3</sup>, N Gobbato<sup>1</sup>, E Cartagena<sup>2</sup>, JC Valdez<sup>1</sup>, A Bardón<sup>2,3</sup>

1 Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, 2 Cátedra de Química Orgánica III, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, 3 CONICET

El estudio de la actividad biológica de compuestos naturales aislados de plantas autóctonas resulta una alternativa al tratamiento médico de microorganismos patógenos resistentes a antibióticos. *Staphylococcus aureus* meticilino resistente es responsable de numerosas infecciones en piel. El compuesto Acanthospermum hispidum DC, fue aislado de un extracto clorofórmico y purificado por técnicas cromatográficas de alta resolución, realizando su elucidación estructural por métodos espectroscópicos (RMN y EM). Previamente demostramos "in vitro" su acción bacteriolítica selectiva sobre *S. aureus* meticilino-resistente. Los mecanismos de acción fueron: daños en la pared celular, degradación del DNA e inhibición de la replicación celular. En base a estos estudios, investigamos su acción "in vivo". Pusimos a punto un protocolo de infección aguda en ratones Balb/c. Se evaluaron por inoculaciones intradérmicas en el lomo diferentes concentraciones de microorganismos y de sustancia. Se decidió trabajar

con 107 ufc/ml de *S. aureus* que produce una rápida infección no letal y con 50  $\mu$ g de acanthospermum B ya que con 100  $\mu$ g de la misma se observa necrotización en la zona de inoculación. La inyección de Acanthospermum B (disuelto en PBS) se realiza a las 24 horas de producida la infección en el lote de ratones (el control sólo lleva PBS). El recuento de microorganismos se realiza a las 48 horas en piel, bazo e hígado, por triplicado en todos los casos. En piel la infección disminuye 0,5 unidades logarítmicas por la presencia de Acanthospermum B (1,5 $\pm$ 0.3  $\times 10^9$  a 5,1 $\pm$ 1.0  $\times 10^9$  ufc/g). En hígado la sustancia inhibe completamente el desarrollo microbiano, observándose 4,7 $\pm$ 1.1 $\times 10^2$  ufc/g en los controles. En bazo, para ambos casos, los valores son similares y menores a 10 colonias. Los resultados "in vivo" sugieren una potencial aplicación de Acanthospermum B para controlar infecciones en piel.

**0006. (0822) EFECTO BACTERICIDA DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIAS (SLPI) SOBRE MYCOBACTERIUM BOVIS-BCG.** SA Gómez<sup>1</sup>, C Argüelles<sup>2</sup>, D Guerrieri<sup>1</sup>, N Tateosián<sup>1</sup>, R Slimovich<sup>2</sup>, V Pasquini<sup>1</sup>, V García<sup>1</sup>, E Chuluyán<sup>1</sup>

1 Hospital de Clínicas, Laboratorio de inmunogenética, Cátedra de Microbiología, F. de Medicina, UBA, 2 ANLIS-Malbrán, Instituto Nacional de Producción de Biológicos.

SLPI es un inhibidor de proteasas producido principalmente por células epiteliales. Algunos estudios demostrarían que el SLPI posee actividad bactericida contra especies de *Streptococcus* y *Escherichia coli*, pero no se conoce el efecto sobre especies de micobacterias, agente causal de la tuberculosis humana. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de SLPI recombinante humano (rhSLPI) sobre la viabilidad de *Mycobacterium bovis* BCG *in vitro* e *in vivo*. rhSLPI fue incubado por 20h en dosis crecientes con una suspensión de BCG (10<sup>8</sup>ml) crecida en fase logarítmica media, y se determinó el crecimiento de unidades formadoras de colonias (UFC) sembrando sobre agar. rhSLPI suprimió el número de UFC 70% y 30% con 2.5  $\mu$ M y 5  $\mu$ M rhSLPI respectivamente (\* $p<0.05$  y \*\* $p<0.001$  respectivamente; n = 6). Para evaluar los efectos de rhSLPI sobre la viabilidad de BCG realizamos un estudio a largo plazo. Observamos una caída tiempo dependiente en la sobrevivencia de las bacterias, observando máxima mortalidad a partir de las 72h (\*\* $p<0.001$  respecto del control). Para estudiar los efectos de rhSLPI *in vivo*, infectamos ratones Balb/c con una dosis 0.5-1 $\times 10^8$ UFC de BCG/ratón intranasal (i.n.). Al día 10 post infección instilamos a los animales con 4 dosis rhSLPI i.n. (150  $\mu$ g/ml) y al día 14 fueron sacrificados para determinar la carga bacteriana en pulmón. rhSLPI redujo el número de UFC en forma significativa respecto del control (\*\* $p<0.001$ , n=6/grupo). El número de macrófagos alveolares infectados con bacilos ácido resistente positivo también fue menor en el grupo tratado con rhSLPI (\* $p<0.05$ ). Este es el primer trabajo que muestra la acción bactericida de SLPI sobre una especie de micobacteria.

**0007. (0206) EXPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINOLÍTICA DE LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR MMP-2 Y MMP-9 EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA SELECCIONADA EN FORMA ALEATORIA.** LD Alaniz<sup>3</sup>, MR Arnaiz<sup>1,2</sup>, XS Villalonga<sup>1,2</sup>, MI Esteva<sup>1</sup>, AR Riarte<sup>1</sup>

1 Instituto Nacional de Parasitología Dr. "Mario Fatala Chabén", 2 Centros de Altos Estudios en Ciencias de la Salud-CAECIS, Universidad Abierta Interamericana-UAI, 3 Cátedra de Inmunología-IDHEU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET.

**Introducción.** La enfermedad de Chagas causada por el *Trypanosoma cruzi* está caracterizada por una miocarditis crónica progresiva y fibrosante con insuficiencia cardíaca (IC). La remodelación de la matriz extracelular (MEC) juega un rol fundamental en la progresión de la IC y las metaloproteinasas (MMPs), enzimas que degradan la MEC, han sido implicadas en fenómenos inflamatorios. Nosotros evaluamos la actividad gelatinolítica de las MMP-2 y MMP-9 en una población chagásica crónica (Chc)

para determinar la actividad diferencial de las mismas y su significado potencial en la progresión de la enfermedad. **Métodos.** Se estudiaron 30 sueros de pacientes chagásicos (ptes Chc) no clasificados clínicamente y 30 de pacientes no chagásicos (ptes no Ch), tomadas al azar. La actividad gelatinolítica se estudió por zimografías y de acuerdo a índices de densidad (ID) de expresión de las MMPs (densidad de las bandas ptes Chc/densidad de las bandas ptes no Ch) establecidos arbitrariamente se caracterizaron los siguientes grupos: (A) ID menores, (B) ID similares a los de los controles y (C) ID controles. El grupo A se subdividió en (A1) ID muy bajos y (A2) ID bajo. Estadística: ANOVA post-test de Dunnet y ANOVA post-test de Tukey para comparación inter e intragrupo. **Resultados.** Los ptes Chc del grupo A y A1 expresaron una menor actividad gelatinolítica de la MMP-2 y 9 ( $P=0.01$  en ambos casos) cuando se la comparó con los controles. El análisis intragrupo demostró una marcada disminución de la actividad de la MMP-9 grupo A, subgrupos A1 y A2 ( $P=0.001$ ,  $0.001$  y  $0.01$  respectivamente) en relación al B cuyos valores de ID no se diferencian a los de los controles. La diferencia de expresión del ID de la MMP-9 fue mayor entre los subgrupos A1 y A2 ( $P=0.05$ ). Conclusiones: Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica parecen tener una expresión diferencial en el suero de las MMP-2 y 9. Su relación con el estatus clínico de los pacientes o caracterización diferencial está en estudio.

**0008. (0825) ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE BETA-LACTOGLOBULINA BOVINA CONTRA BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS.** L Chaneton, JM Pérez Sáez, LE Bussmann

*Instituto de Biología y Medicina Experimental*

La mastitis bovina es la enfermedad que mayores pérdidas económicas ocasiona en el ganado de tambo. Esta infección es causada principalmente por bacterias, siendo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* algunos de los patógenos de mayor importancia clínica. La  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) es la proteína más abundante (aprox. el 50%) del suero de los rumiantes y pese a ser una molécula ampliamente estudiada, su función biológica en la glándula mamaria y en el lactante no se encuentra aún del todo elucidada. En bovinos, el gen de la  $\beta$ -LG presenta diferentes variantes alélicas siendo las más frecuentes las que codifican para  $\beta$ -LG A y  $\beta$ -LG B. El objetivo de este trabajo es estudiar la posible actividad antimicrobiana de  $\beta$ -LG sobre los patógenos causantes de mastitis bovina. Para ello, se purificó  $\beta$ -LG de leche de vaca Holando Argentina heterocigota (AB) y homocigota (BB) para el gen de  $\beta$ -LG. La acción antimicrobiana de estas proteínas contra bacterias causantes de mastitis fue evaluada mediante ensayos de inhibición de crecimiento de patógenos aislados de leche mastítica.  $\beta$ -LG presentó una apreciable actividad antibacteriana contra *S. aureus* mientras que el crecimiento de *E. coli* no se vio afectado por la presencia de esta proteína en el medio de cultivo. Se observaron diferencias de actividad antimicrobiana entre  $\beta$ -LG AB y  $\beta$ -LG BB produciendo esta última los mayores niveles de inhibición. Los resultados que se describen en este trabajo demuestran que  $\beta$ -LG es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano in vitro y sugieren una participación de esta proteína en la defensa de la glándula mamaria contra infecciones bacterianas.

## HEMATOLOGÍA I

**0009. (0784) DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE VWD TIPO 3 Y TIPO 1 SEVERO MEDIANTE LA RESPUESTA AL DDAVP DEL TIEMPO DE LISIS DE EUGLOBULINAS.** Al Woods<sup>1</sup>, AN Blanco<sup>2</sup>, SH Grosso<sup>2</sup>, JC Calderazzo<sup>3</sup>, SS Meschengieser<sup>2</sup>, MA Lazzari<sup>1</sup>

*1 Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, CONICET, 2 Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, 3 Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Fund Barón*

**Introducción:** En la enfermedad de von Willebrand (VWD), el diagnóstico diferencial entre pacientes (pts) tipo 3 y tipo 1 severo es difícil. La infusión de desmopresina (DDAVP) ayuda al mismo, debido a la ausencia de respuesta en los pts tipo 3 y la buena respuesta en los pts tipo 1 severo. El activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el VWF se almacenan en los cuerpos de Weibel-Palade de la célula endotelial (ce), aunque otros autores sugieren otro sitio de almacenamiento para el t-PA. Se liberan de la ce luego de la infusión de DDAVP. La liberación del t-PA, post DDAVP está significativamente disminuida en pts con tipo 3, pero no se ha medido, en trabajos anteriores, la actividad fibrinolítica global mediante el tiempo de lisis de euglobulinas (TLE) en estos pts. **Objetivo:** Verificar si la estimulación del sistema fibrinolítico in vivo, medida por los cambios en el TLE pre y post 60 y 120 min de la infusión del DDAVP en pts con tipo 3 y tipo 1 severo, puede ayudar al diagnóstico diferencial. **Materiales y Métodos:** Estudiamos 6 pts con VWD tipo 3 y 6 pts con tipo 1 severo. Los cambios en el sistema fibrinolítico se evaluaron mediante el TLE pre y a los 60 y 120 min post infusión de DDAVP (ev) (0,3  $\mu$ g/kg peso). Test estadístico: t-test. **Resultados:** Los resultados se muestran en la Tabla.

---

TLE: Pts tipo 3	
1- Pre DDAVP:	228,6 $\pm$ 56,7 min
2- Post 60 min:	173,3 $\pm$ 55,0 min; 2 vs 1 $P=0.117$
3- Post 120 min:	139,0 $\pm$ 46,9 min; 3 vs 1 $P=0.013$
Pts tipo 1 severo	
4- Pre DDAVP:	164,0 $\pm$ 40,4 min
5- Post 60 min:	46,0 $\pm$ 21,6 min; 5 vs 4 $P=0.000$
6- Post 120 min:	62,5 $\pm$ 5,0 min; 6 vs 1 $P=0.000$
4 vs 1	$P=0.046$
5 vs 2	$p<0.000$
6 vs 3	$p<0.000$

---

**Conclusión:** Se encontró marcada disminución en los TLE entre los pts con VWD tipo 3, comparado con los pts tipo 1 severo, tanto antes de la infusión de DDAVP como a los 60 y 120 min. Creemos que la ausencia de cambios en el TLE en los pts tipo 3 es un dato importante que apoya el diagnóstico diferencial con los pts tipo 1 severo.

**0010. (0239) EFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO POR EL TRATAMIENTO DE PROANTOCIANIDINA EXTRAÍDA DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) SOBRE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS ERITROCITARIA.** J Gonzalez<sup>1</sup>, D Crosetti<sup>1</sup>, A Dominighini<sup>1</sup>, L Urli<sup>1</sup>, M Ferrero<sup>1</sup>, L Alvarez<sup>2</sup>, MT Ronco<sup>2</sup>, M Wagner<sup>3</sup>, A Gurni<sup>3</sup>, CE Carnovale<sup>2</sup>, A Luquita<sup>1</sup>

*1 Cát. Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, 2 Cát. Fisiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR-CONICET, 3 Cát. Farmacobotánica, Fac. Farmacia y Bioquímica-UBA*

Lc o "muérdago criollo", es una planta hemiparásita Argentina. Anteriormente demostramos que el tratamiento de ratas con extracto crudo de Lc por vía intraperitoneal (i.p.), disminuye el colesterol (Co) plasmático, incrementa la viscosidad sanguínea y disminuye la deformabilidad eritrocitaria. Del extracto crudo se purificó Proantocianidina (PLC). **Objetivo:** analizar el efecto del tratamiento con Proantocianidinas extraídas de *Ligaria cuneifolia* (PLc) sobre la concentración plasmática de Co y las propiedades reológicas eritrocitarias. Método: Se utilizaron ratas Wistar machos adultas Controles (C ; n=6) inyectadas i.p. con Solución Fisiológica y Tratadas (T; n=11) inyectadas i.p. con PLc 3 mg /100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 días. Al cuarto día las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal, i.p., obteniéndose sangre por punción cardíaca. Se determinaron en plasma: Co (método enzimático de esterasa-oxidasa (EO)). En sangre: Co de membrana (después de lisis hipotónica y extracción lipídica, se realizó EO), forma eritrocitaria (distinción de las formas por microscopía y cálculo del Índice Morfológico (IM), índice de rigidez (IR) (filtración a través de membranas nucleopore). **Resultados:** (media  $\pm$  ES). Co plasmático (mg %): C: 89,66 $\pm$  3,10, T: 70,82  $\pm$  3,70\* (\* $p<0,05$ ). En sangre: IM: C:- 0,49  $\pm$  0,03; T:

-1,26 ± 0,10\* (\*p<0,01). IR: C: 7,13 ± 1,42; T: 8,01 ± 0,12\* (\*p<0,05). Co de membrana: C: 1,23 ± 0,10; T: 0,84 ± 0,09\* (\*p<0,05). **Conclusión:** El tratamiento de PLc produce un descenso de Co plasmático. Al mismo tiempo, reduce el Co de membrana eritrocitaria, lo que produce un cambio de forma de discocito a estomatocito (IM más negativo). En base a otros estudios, el cambio de forma indicaría una interacción de PLc con la hemicapa interna de la bicapa lipídica de la membrana eritrocitaria modificando su curvatura. Este cambio de forma explicaría la disminución de la deformabilidad eritrocitaria (aumento de IR).

**0011. (0435) EFECTO DEL LÁSER DE HELIO-NEÓN Y ARSENIURO DE GALIO SOBRE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA IN VIVO.** N Servetto<sup>1</sup>, M Baez<sup>1,2</sup>, M Tarán<sup>1,2</sup>, M Moya<sup>1,2</sup>, A Dipietro<sup>3</sup>, J Simes<sup>1</sup>, J Palma<sup>1</sup>, V Campana<sup>1,2</sup>

1 *Cátedra de Física Biomédica - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba*, 2 *Universidad Nacional de La Rioja*, 3 *Escuela de Kinesiología y Fisioterapia - UNC*

Se estudió el efecto del láser de Helio-Neón (He-Ne) y Arseniuro de Galio (As.Ga) sobre marcadores plasmáticos de estrés oxidativo: óxido nítrico (ON), nitrotirosina y superóxido dismutasa (SOD), en ratas con miopatía por inyecciones de adrenalina, su acción a nivel ultraestructural del músculo y su repercusión a nivel mitocondrial. Se estudiaron 4 grupos: (A) control; (B) inyectadas con 0.1 mg/rata/día de adrenalina durante 5 días; (C) inyectadas con adrenalina e irradiadas con He-Ne (8 J.cm<sup>-2</sup>) durante 5 días; y (D) inyectadas con adrenalina e irradiadas con As-Ga (9 J.cm<sup>-2</sup>). Observación por microscopía óptica y electrónica. La determinación de ON (µM), nitrotirosina (nM) y SOD (U/ml) fue por espectrofotometría. Se utilizó test de Fisher y nivel de significación: p<0.05. El ON del grupo B (46.12±5.50) incrementó significativamente (p<0.01) al compararlo con el A (28,72±1.21) y el C (26.56±3.37). Entre los valores de nitrotirosina del B (1419.17±304) y C (448±153) se encontró diferencia significativa (p<0.01). Los niveles de SOD en el B (256.25±12.13) al compararlos con el A (186.56±11.53) y D (201±14.73) mostraron diferencia (p<0.001). El grupo B evidenció un sistema miofibrilar alterado y mitocondrias disgregadas de conformación ortodoxa; en C y D signos de recuperación estructural muscular y mitocondrial, aumento y reorganización de crestas y configuración condensada. Tanto el láser de He-Ne como el de As.Ga han generado una disminución de los niveles plasmáticos de los marcadores de estrés oxidativo: ON, nitrotirosina y SOD en ratas con miopatías experimentales por inyección de adrenalina y recuperación ultraestructural a nivel muscular y mitocondrial.

**0012(0832) EFECTO DE LA HOMOCISTEINA SOBRE LA CINÉTICA DE FORMACIÓN DEL COÁGULO SANGUÍNEO Y SUS PROPIEDADES ELÁSTICAS.** AM Lauricella, B Sasseti, L Kordich

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*

La homocisteína (Hcy) es considerada un factor de riesgo trombotico. En trabajos previos hallamos que la Hcy interactúa con proteínas que intervienen en la fibrinoformación. El tromboelastograma (TEG) evalúa principalmente la cinética de fibrinoformación y las características del trombo formado. Con el objeto de evaluar si la Hcy modifica la velocidad de formación del coágulo y sus propiedades elásticas, se realizaron TEG utilizando sangre entera citrada de 10 individuos sanos y una mezcla de 10 plasmas normales. Cada una de las muestras fue incubada (1 hora, 37 °C) con Hcy en la proporción: 9 partes de sangre + una parte de Hcy (concentraciones finales: 0, 50, 100, 250 y 500 µM). Los parámetros del TEG evaluados fueron: tiempo de coagulación (r), tiempo en alcanzar una amplitud de 20 mm (k), amplitud máxima (am), y módulo de solidez relativo (ε) calculado a partir de am. Los resultados fueron evaluados por el test de Wilcoxon. La presencia de Hcy no modificó los valores de r. En cambio, se obtuvo disminución de los valores de k (a concentraciones de Hcy ma-

yores de 100 µM) y aumento de am y ε. Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas (p<0,05). Promedio de las diferencias de k y ε de los TEG de sangre entera:

Conc. Hcy	Delta k	p	Delta epsilon	p
50	-0,97	NS	14,21	0,031
100	-1,04	0,047	12,44	0,031
250	-1,07	0,046	15,68	0,030
500	-1,29	0,031	39,14	0,008

Los TEG de plasmas incubados con diferentes concentraciones de Hcy no mostraron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas, debido a la ausencia de células. Podemos concluir que el incremento de la concentración de Hcy aumentó la velocidad de formación de fibrina en sangre entera (disminución de k), produciendo coágulos más rígidos (aumento de am y ε). Esto conduciría a la lisabilidad disminuida generando un ambiente protrombotico.

**0013. (0263) ANTAGONISMO ENTRE ESTRADIOL (E2) E HISTAMINA (H) EN LA LIBERACIÓN DE VWF EN CULTIVOS DE HUVEC.** Y Powazniak<sup>1</sup>, AC Kempfer<sup>1</sup>, VA Zapata<sup>2</sup>, L Keller<sup>2</sup>, JC Calderazzo<sup>2</sup>, MA Lazzari<sup>1</sup>

1 *CONICET*, 2 *Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina*

**Introducción.** El VWF es liberado de las HUVEC a través de la vía regulada por estimulación con histamina (H) a través de un incremento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático. **Objetivo:** Evaluar el sinergismo o antagonismo entre estradiol (E2) y H en la liberación del VWF en el cultivo de HUVEC. **Metodología.** Cultivos de HUVEC. Tratamientos de los cultivos: H, E2, I (Ketotifen, inhibidor receptor (HR)1; Cimetidina, HR2; Clobenpropip HR3 Obtención del VWF liberado: recolección de los sobrenadantes de los cultivos de HUVEC. Cuantificación del VWF: Ag por ELISA. El VWF:Ag se expresa como la razón (R) entre las unidades de VWF /100mg proteína de cada tratamiento y su control. Análisis estadístico: ANOVA (p<0.05 significativo). **Resultados.** El tratamiento de las HUVEC con E2 (p=0.411) tiene una R igual a 1. La incubación con H (p=0.001) produjo un aumento muy significativo, 2,5 veces de R, en la liberación de VWF, que disminuyó 1,3 veces cuando se combinó con I (p=0.002). La combinación de E2+H disminuyó significativamente la liberación de VWF en 1.4 veces con respecto a H (p=0.002). Cuando las HUVEC fueron expuestas a I (p=0.001) aumentó significativamente la liberación de VWF con una R de 1.9 veces. La combinación de E2+I produjo una disminución significativa de 0.7 veces con respecto al tratamiento con I (p=0.001). H+E2+I produjo una disminución significativa de 0.9 veces con respecto al tratamiento con H (p=0.013), un aumento significativo de 0.4 respecto a H+I (p=0.04), 0.7 relativo a E2 (p=0.001) y 0.5 respecto a E2+H (p=0.015), y no hubo diferencias con respecto a los tratamientos con I (p=0.172) y E2+I (p= 0.153). **Discusión.** H y E2 presentan un efecto antagónico en las HUVEC sugiriendo que E2 podría estar actuando a nivel de un segundo mensajero como el Ca<sup>2+</sup> en la inhibición de H. Los tres inhibidores que abarcan los HR 1,2 y 3 logran producir liberación de VWF y son inhibidos por E2 en un efecto paradójico.

**0014. (0058) IDENTIFICACION DE PACIENTES CON ACORTAMIENTO DE LA SOBREVIDA DEL FACTOR VON WILLEBRAND (VWF).** M Carrivale<sup>1</sup>, AC Kempfer<sup>2</sup>, A Woods<sup>2</sup>, K Vizcaychipi<sup>3</sup>, OG Astudillo<sup>3</sup>, A Sanchez Luceros<sup>2</sup>, MA Lazzari<sup>2</sup>

1 *Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica*, 2 *CONICET*, 3 *Instituto de investigaciones hematológicas. Academia Nacional de Medicina*

**Introducción:** Varios autores han estudiado la sobrevida del VWF circulante en las distintas variantes de enfermedad de VWF (VWD). Casonato (2002) detectó el acortamiento de la sobrevida del VWF en el tipo VWD Vicenza (mutaciones en exón 17 y 27),

mediando el VWF: Ag después de la administración de la desmopresina. Señaló que en el VWD tipo 2A el acortamiento de la sobrevivida del VWF está relacionada sólo a los multímeros grandes e intermedios. Sadler (2005) sugiere que en el VWD tipo Vicenza, la remoción del VWF domina sobre la proteólisis y que está relacionada al ensamble de los multímeros, aunque existe ausencia de bandas satélites. Haberichter (2006) utilizó los niveles del propeptido (VWFpp) y sugiere que la razón VWFpp/VWF:Ag puede ser útil para discriminar tipos de VWD. **Objetivos:** Estudiar la sobrevivida del VWF en pacientes con enfermedad de VWF (VWD) utilizando la relación entre el propeptido del VWF (VWFpp) y el VWF:Ag. **Métodos:** VWF:Ag por la técnica de Taylor (1988) y VWFpp por la técnica de Borchiellini (1996). Pacientes: 1 VWD adquirido, 3 tipo Vicenza, 2 con mutación en el exón 27 y 1 en el exón 17, 4 2B, 3 2A, 1 2M y 1 tipo 1. 13 controles normales, 6 grupo sanguíneo (GS) A, 6 grupo 0 y 1 grupo B. **Resultados:** No hay diferencias ( $p < 0.05$ ) entre los GS A y 0 respecto al VWF:Ag ( $p = 0.053$ ), VWFpp ( $p = 0.378$ ) y VWFpp/VWF:Ag ( $p = 0.402$ ). Rango normal en U/dL ( $n = 13$ ): VWF: Ag = 48-107; VWFpp = 48-172; VWFpp/VWF:Ag = 0,91-2,14. La correlación entre el VWF:Ag y VWFpp es = 0.443. La razón VWFpp/VWF:Ag para el VWD: adquirido = 7,60, Vicenza (exón 27) = 6,23 y 11,30, Vicenza (exón 17) = 2, VWD tipo 2B = 1,44; 0,90; 2,47 y 2,84, VWD 2A = 2,06; 2,74 y 2,80, VWD 2M = 2,48, VWD 1 = 1,70. **Conclusión:** En nuestro escaso grupo de pacientes analizados con este nuevo enfoque detectamos 2 poblaciones diferentes: aquellos claramente referidos al tipo 2 y otros con casi 3 veces mayor acortamiento de la sobrevivida del VWF. Potencialmente esto habla de una diferente fisiopatología.

**0015. (0520) HIERRO CORPORAL EN NEONATOS CON LIGADURA TEMPRANA Y TARDÍA DEL CORDÓN UMBILICAL. UN MODELO ANIMAL.** G Facorro<sup>1</sup>, F Capani<sup>2</sup>, E Sarraceno<sup>2</sup>, H Torti<sup>1</sup>, H Coirini<sup>3</sup>, A Hager<sup>1</sup>, E Rubín de Celis<sup>1</sup>

1 *Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*, 2 *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA*, 3 *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA e IBYME*

Una reciente revisión de la literatura sobre ligadura del cordón umbilical indica que neonatos con ligadura tardía (Lt) tuvieron menor riesgo de anemia en la primera infancia que aquellos con ligadura temprana (Lo). La OMS recomienda el uso de la Lt desde 1996, pero aún hoy es una práctica controvertida porque no existe clara evidencia y la práctica institucionalizada establece cortar el cordón durante los primeros 30 segundos del parto, incluso en partos normales. El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo animal, que permita medir la concentración corporal total de hierro en los fetos y sus placentas en función del tiempo al que se liga el cordón. Ratas preñadas en el último día de gestación se anestesiaron por inyección intraperitoneal. El nacimiento se produjo por cesárea y la ligadura del cordón se realizó a dos tiempos: Lo antes de los 30 s y Lt a los 5 min. Para la Lt el feto permaneció a nivel inferior de la posición de la placenta. La determinación de hierro total en fetos y placentas se realizó por espectroscopia de absorción atómica previa mineralización por vía húmeda. Se analizaron las diferencias entre las muestras obtenidas de la misma madre para ambos tiempos y entre los dos tratamientos para el total de muestras, observándose siempre la misma tendencia. Para un N total de 61 fetos (30 Lo y 31 Lt) los resultados obtenidos fueron: 68  $\mu\text{g}$  de Fe/g de peso corporal total ( $S = 13 \mu\text{g}$  Fe/g) para Lo y 78  $\mu\text{g}$  de Fe/g de peso corporal total ( $S = 14 \mu\text{g}$ /g) para Lt. Analizando las dos poblaciones de datos por aplicación de análisis de varianza de un factor se obtuvo una diferencia significativa con  $p < 0.01$ . Para las placentas no se detectaron diferencias significativas. Concluimos que el hierro almacenado al momento del nacimiento puede mejorarse con la Lt del cordón umbilical, siendo por lo tanto esta práctica una buena estrategia para mejorar las reservas de hierro de los neonatos y prevenir la anemia por deficiencia de hierro en la infancia.

**0016(0151) PARAMETROS FISIOLÓGICOS EN EL MODELO DEL RATÓN POLICITEMICO TRANSFUNDIDO CON ERITROCITOS HETEROLOGOS.** MI Conti, MP Martínez, AC Barceló, RM Alippi, CE Bozzini

*Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires; y Bio Sidus S.A.*

El ratón con policitemia post-transfusional homóloga, caracterizado por hiperhemoglobinemia, hipoeritropoyesis e hipoeritropoyetinemia, es un modelo muy laborioso y excesivamente costoso. Se describen algunos parámetros fisiológicos relacionados con la eritropoyesis en un modelo similar obtenido mediante transfusión de hematíes heterólogos (rata). Ratones "receptores" fueron hembras adultas de la cepa CF#1, siendo "donantes" ratas Wistar adultas. Policitemia fue inducida mediante transfusión ip de 1,2 ml de una suspensión de eritrocitos al 80%. La eritropoyesis fue medida como "captación" esplénica de  $^{59}\text{Fe}$ , determinada 6 h post-inyección iv de 0,2  $\mu\text{Ci}$ . Eritrocitos heterólogos "marcados" con  $^{59}\text{Fe}$  fueron obtenidos 10d post-inyección a ratas de 10  $\mu\text{Ci}$ . Eritropoyetinemia en condiciones de normo- e hipobaría fue medida mediante inmunoensayo. La transferencia de eritrocitos "marcados" desde la cavidad peritoneal hacia la sangre comenzó inmediatamente después de la transfusión, alcanzando un máximo 48 h después con un 99,2% de la radioactividad inyectada. El incremento paralelo del hematocrito acompañó esta transferencia, siendo bifásico (0-12h = 1,939; 12-48 h = 0,1321). El valor hematocrito = 55% fue alcanzado en 4h. El valor máximo fue  $69,5 \pm 1,3$  a 48h, declinando con pendiente =  $-0,2458$  y  $t_{1/2} = 141$  min. Un nuevo valor hematocrito = 55% fue observado 106 h post-transfusión. La captación esplénica de radiohierro alcanzó su nadir a 48h, permaneciendo invariable. Los valores de eritropoyetinemia (pg/ml) fueron: 1) Normoxia:  $C = 138,3 \pm 56,0$ ;  $HT = 12,0 \pm 1,5$ ; 2) Hipoxia:  $C = 1247 \pm 204,0$ ;  $HT = 23,1 \pm 8,3$ . Si consideramos el valor hematocrito 55% como umbral de policitemia necesaria para suprimir la eritropoyesis, el modelo estudiado muestra una vida media útil de 102 h a partir del momento de la transfusión, lo que lo convierte en uno de gran utilidad para el estudio agudo de esa función. PROYECTO UBACYT O-012.

**0017. (0786) EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE EL FACTOR VON WILLEBRAND EN MODELO MURINO.** OG Astudillo<sup>1</sup>, A Sanchez-Luceros<sup>2</sup>, AC Kempfer<sup>2</sup>, VA Zapata<sup>1</sup>, M Carrivale<sup>3</sup>, I Piazzon<sup>2</sup>, I Nepomnaschy<sup>2</sup>, MA Lazzari<sup>2</sup>

1 *Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina*, 2 *CONICET*, 3 *SECYT*

En mujeres normales no embarazadas, embarazadas y durante el puerperio nuestro grupo ha observado que el VWF aumenta a medida que avanza el embarazo. Aunque ha sido sugerido un control estrogénico sobre el VWF, el tratamiento en ratones no mostró diferencias en el VWF. La prolactina (P), producida en la pituitaria y tejido decidual, cumple con un importante rol en la reproducción para el mantenimiento y adaptación al embarazo. Las observaciones descriptas nos llevaron a evaluar el efecto sobre el VWF del tratamiento de ratones sometidos a tratamientos con prolactina (P) y bromocriptina (B). **Métodos:** Se estudiaron ratones de la cepa BALB/c (hembras vírgenes, 8 semanas), con peso de 25-30 gramos, sometidos a experimentos ( $n = 5$ ) con: -P de origen ovino 100  $\mu\text{g}/\text{d}$  s.c.; - B 400  $\mu\text{g}/\text{d}$  i.p.; - control positivo LPS 30ug i.p.; -Controles negativos. A las 24hs de la estimulación se recolectó el plasma. Se utilizó la técnica de ELISA para medir el antígeno de VWF (VWF:Ag). **Resultados:** VWF: Ag (U/dL) de ratones inoculados con: P:  $8,2 \pm 1,3$ ; B:  $9,6 \pm 1,1$ ; LPS:  $17,6 \pm 2,3$ ; controles:  $9,6 \pm 1,1$ . El análisis estadístico por ANOVA mostró que no existen diferencias significativas entre P, B y el control. Existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos y los controles negativos comparado con el grupo que recibió LPS. **Discusión:** La B, agonista de los receptores dopaminérgicos, disminuye los niveles de prolactina en sangre y regula su mRNA. Se ha descrito que la dopamina inhibe la se-

creción (por histamina) de VWF en células endoteliales. Aunque no pueden descartarse efectos moduladores de la P y la B sobre el VWF, nuestros resultados indican que no generan cambios perceptibles en la secreción del mismo cuando se los compara con los controles. **Conclusión:** Aunque no pueden excluirse otros efectos a nivel molecular, el VWF plasmático de los ratones estudiados no sufrió modificaciones luego del tratamiento con P y B, respondiendo a otros estímulos tales como el LPS.

**0018. (0392) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE CATIONES DIVALENTES 1 EN RATON ANÉMICO.** T Veuthey, C D'Anna, G Pennacchiotti, M Roque

*Universidad Nacional del Sur*

El transporte de hierro (Fe) es mediado por el Transportador de Cationes Divalentes 1 (DMT1), ampliamente distribuido en órganos comprometidos con el balance de Fe del organismo. El objetivo fue estudiar en ratón la expresión intestinal, hepática y renal de DMT1 en situaciones de intensa demanda eritropoyética. Anemia hemolítica fue inducida en ratones hembras CF1 (30±3g) con Fenilhidrazina (60mg/kg) (días:0,2) (n=9); el grupo control recibió solución salina estéril (n=4). La expresión intestinal, hepática y renal de DMT 1 se evidenció los días 3, 4 y 5 utilizando un anticuerpo policlonal purificado específico anti-DMT1 y el kit Envision+System-HRP (DAB). Los depósitos de Fe hepático se detectaron por tinción de Perl's. DMT1 se expresó en el espacio intracelular de enterocitos de ratón control y anémico, durante la crisis hemolítica (días 3,4). En la etapa de restauración de la eritropoyesis (día 5) mostró expresión intracelular y apical. En el tejido renal de ratones no anémicos se observó expresión homogénea de DMT1 en células tubulares corticales y medulares. En el día 3 de la anemia hemolítica se localizó principalmente en los segmentos tubulares de mayor diámetro de la médula renal interna. En la restauración de la anemia, la distribución fue similar a la observada en condiciones basales. Hepatocitos de ratón control mostraron expresión citoplasmática principalmente a nivel perivascular, con bajos niveles de hemosiderina. En hepatocitos de ratones anémicos la expresión de DMT1 fue menos evidente los días 3 y 4, alcanzando el día 5, niveles similares a los observados en el control. En el tejido hepático, los niveles de hemosiderina no cambiaron con el estímulo hemolítico. Podemos concluir que la anemia hemolítica induce cambios en la expresión de DMT1 en hígado, intestino y riñón, sugiriendo la participación de estos tejidos en la homeostasis del Fe en las condiciones estudiadas.

**0019. (0799) ACTIVACIÓN DE JAK-2 Y STAT-3 POR EL COMPLEJO IL-6 Y SU RECEPTOR SOLUBLE EN PLAQUETAS DE TROMBOCITEMIA ESENCIAL.** CD Chazarreta, JP Salim, FC Molinas, RF Marta

*Sección Hematología Investigación, Unidad Ejecutora IDIM-CONICET, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA*

La IL-6 tiene un rol importante en el desarrollo megacariocítico ejerciendo su efecto a través de su receptor específico IL-6R y una glicoproteína de transducción de señal, gp130. Se ha descrito además, un receptor soluble, IL-6sR, con capacidad de unir IL-6 y asociarse a gp130 actuando como agonista en células que no tienen el receptor específico. En un trabajo previo describimos aumento plasmático de IL-6sR en pacientes con trombocitemia esencial (TE), enfermedad caracterizada por hiperplasia megacario-cítica y aumento de plaquetas (plaq). El objetivo de este trabajo fue evaluar la vía de señalización de IL-6 estudiando el nivel de fosforilación de la tirosinquinasa JAK-2 y del factor de transcripción STAT-3 en plaq de pacientes con TE. Se evaluaron tres pacientes y dos controles. Las muestras se filtraron para eliminar los leucocitos, se lavaron y estimularon con a) 100 ng/ml de trombopoyetina (Tpo), b) 100 ng/ml de IL-6 (IL-6), c) 100 ng/ml de IL-6 + 200 ng/ml de IL-6sR (Complejo d) sin estímulo. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE, transferencia e inmuno-blotting usando anti fosfoJAK-2, anti fosfoSTAT-3 y anti JAK-2 y anti STAT-3, estos últimos para evaluar JAK-2 y STAT-3 total. Se obtuvo la relación (Rel) dividiendo la intensidad de las banda obtenida para STAT-3P por la del STAT3

total y se calculó el cociente entre la Rel inducida por el complejo (RelComplejo) y la Rel inducida por Tpo (RelTpo). Los pacientes presentaron una RelComplejo/RelTpo aumentada, 2.2 (1.86-3.03) (mediana y rango), respecto a los normales 0.72 (0.64-0.8) demostrando un aumento del nivel de fosforilación de STAT3 inducida por el complejo. En cambio, el nivel de fosforilación de JAK-2 fue similar en pacientes y controles en estas condiciones. Estos resultados sugieren que el complejo IL-6/IL-6sR tendría mayor capacidad de activar STAT-3 en pacientes con TE y que esta activación podría ser independiente de JAK-2.

**0020. (0005) EFECTO DEL CROMO SOBRE PROPIEDADES ERITROCITARIAS DETERMINANTES DEL FLUJO SANGUÍNEO.** GB Bazzoni<sup>1</sup>, M Huarte<sup>2</sup>, GN Hernández<sup>1</sup>, L Piehl<sup>2</sup>, AN Bollini<sup>1</sup>, GC Mengarelli<sup>1</sup>, E Rubin de Celis<sup>2</sup>, ML Rasia<sup>1</sup>

*1 Fac. Cs. Médicas, UNR, 2 Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA*

El cromo (CrVI) ejerce efectos carcinogénicos a altas concentraciones. Se ha demostrado que atraviesa la membrana eritrocitaria y una vez en el interior de la célula es reducido a distintos intermediarios que se unen a la hemoglobina y a otros ligandos solubles en agua. En una primera etapa nuestro objetivo fue estudiar la interacción del CrVI con la membrana celular, analizando las propiedades reológicas de glóbulos rojos (GR) humanos, como: deformabilidad eritrocitaria (DE) –determinada por las propiedades viscoelásticas de la membrana, la forma celular y la microviscosidad interna– y fluidez de membrana (FM). A tal fin, GRs de dadores sanos lavados se suspendieron en PBS sin CrVI(control) y con CrVI a 50 y 100 mg/l. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C, en cada fracción se midió: a) viscosidad (VS) de la suspensión a Hto=40% con viscosímetro cono-plato (medida indirecta de la DE); b) FM: estimada por el parámetro de orden "S" utilizando EPR con ácido 5-doxil estearico, y c) se analizó forma celular por microscopía. Los resultados son expresados como: Media ± SEM y se analizaron estadísticamente con: a) t de Student (grupos apareados) y b) test de Student-Newman-Keule.\* p<0.05; \*\*\* p<0.001.

n: 11	VS (a)	Forma celular	"S" (b)
control	2.90 ± 0.06	Discocitos	0,68 ± 0,001
50 mg/l CrVI	3.07 ± 0.03***	Estomatocitos II	0,69 ± 0,002*
100 mg/l CrVI	3.22 ± 0.06***	Estomatocitos II	0,71 ± 0,005***

Nuestros resultados están demostrando que la presencia de CrVI, a ambas concentraciones, afecta no sólo la geometría del eritrocito sino también las propiedades viscoelásticas de la membrana. En otras palabras, la formación de estomatocitos, el aumento producido en la viscosidad y en el parámetro "S" por la presencia de CrVI ponen en evidencia la disminución de la DE. Nuestro siguiente paso es estudiar la microviscosidad y la formación de peróxidos que nos permitirán aportar datos de alteraciones en las propiedades reológicas eritrocitarias como otro posible efecto de la intoxicación con CrVI.

**0021. (0397) EFECTO DE FOTOBIOESTIMULACIÓN SOBRE MARCADORES INFLAMATORIOS Y DE ESTRÉS OXIDATIVO EN ARTRITIS INDUCIDA POR CRISTALES.** C Reinosa<sup>1</sup>, J Simes<sup>1</sup>, M Moya<sup>1</sup>, D Piccini<sup>1</sup>, J Palma<sup>1</sup>, V Campana<sup>2</sup>

*1 Cátedra de Física Biomédica - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba, 2 Universidad Nacional de La Rioja*

Las cristalopatías son patologías inflamatorias por reacción celular al depósito de cristales en las articulaciones. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto antiinflamatorio del láser de Helio-Neón (He-Ne) en artritis por cristales de hidroxipatita (HP) y de pirofosfato cálcico (PF) en ratas, en forma aguda y crónica, a través de la determinación de fibrinógeno, L-citrulina, óxido nítrico (ON), nitrotirosina, estudio anatomopatológico (AP) y su comparación con antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): diclofenac, meloxicam, celecoxib y rofecoxib. La artropatía se indujo

por inyección intraarticular de los cristales en miembros posteriores, en diferentes tiempos. La energía aplicada con láser de 5 mW fue de 8 J.cm<sup>-2</sup>. La AP se realizó por microscopía óptica y los marcadores plasmáticos por espectrofotometría. Se utilizó test de Fisher ( $p < 0.05$ ). Los grupos inyectados con cristales, mostraron un incremento de fibrinógeno (mg/dL), L-citrulina (mM), ON ( $\mu\text{M}$ ) y nitrotirosina (nM) comparando con el grupo control y con el inyectado con cristales y tratado con láser ( $p < 0.001$ ), ( $p < 0.001$ ), ( $p < 0.02$ ) y ( $p < 0.01$ ) respectivamente. Al comparar fibrinógeno de ratas artríticas por HP con intactas y artríticas tratadas con AINEs mostraron  $p < 0.01$ . El láser de He-Ne en cristalopatías inducidas por HP y PF, en forma aguda y crónica, alteró el metabolismo celular y el estrés oxidativo demostrado por la disminución de los marcadores plasmáticos inflamatorios: fibrinógeno, ON, L-citrulina y nitrotirosina; su evolución histológica relativa e igual efecto de los AINEs sobre los niveles de fibrinógeno. Se atribuyen los efectos de la fotoestimulación a la formación de pequeñas cantidades de especies reactivas del oxígeno y antioxidantes posterior a la irradiación, cambiando el estado redox celular, conduciendo al proceso de respuestas biológicas benéficas para el tratamiento de patologías inflamatorias.

**0022. (0755) DETECCIÓN POR PCR-CSGE DE LA MUTACIÓN V617F EN EL GEN JAK2 EN SÍNDROME MIELOPROLIFERATIVO CRÓNICOS (SMP) BCR/ABL NEGATIVOS.** PM Gargallo<sup>1</sup>, C Margaritini<sup>2</sup>, ME Picco<sup>1</sup>, G Via<sup>1</sup>, R Bengió<sup>1</sup>, I Larripa<sup>1</sup>

*1 Academia Nacional de Medicina, Depto de Genética, 2 CEMIC*

Policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis idiopática (MF) son enfermedades hematopoyéticas clonales conocidas como SMP BCR/ABL negativos clásicos. Pero no todos los pacientes con SMP pueden incluirse dentro de estas categorías, a estos casos se los denomina SMP no clasificables. Durante mucho tiempo se desconoció las bases genéticas de éstos desórdenes. Ahora se sabe que una mutación somática y adquirida (JAK2V617F) activa la proteína quinasa JAK2. De este modo, se desencadena una cascada de fosforilaciones que finalmente activan vías de transducción de señales (JAK/STAT) implicadas en la patogénesis de esta patología. El objetivo de nuestro trabajo fue identificar la mutación V617F en un grupo de 52 pacientes con SMP BCR/ABL negativos. Con este fin, aplicamos una nueva estrategia basada en PCR-CSGE a muestras de ADN obtenidas a partir de sangre entera. La distribución de la mutación fue: PV 21/23 (91%), TE 9/13 (69%), MF 3/3 y SMP no clasificables 5/9 (55.5%). En 4 casos con poliglobulia, la ausencia de la mutación excluyó el diagnóstico de PV. Dentro de los 23 pacientes con PV, 12 correspondieron a casos de larga evolución (media: 9,5 años). En este grupo identificamos 3 casos (3/12: 25%) con un patrón de migración diferente al resto de los pacientes. El análisis de estas secuencias mostró una configuración homocigota para V617F. Clínicamente, sólo 1 de ellos presentó complicaciones trombóticas durante la evolución. En conclusión, describimos una nueva metodología para detectar la mutación V617F, basada en PCR-CSGE. Los patrones de migración sugieren el estado homo- y heterocigota de la mutación. El hallazgo de la JAK2V617F constituyó un marcador de clonalidad útil para contribuir al diagnóstico de los SMP BCR/ABL negativo. Sin embargo, la detección de la homocigocidad durante la evolución no siempre se asoció a aquellos casos con complicaciones trombóticas/hemorrágicas.

**0023. (0269) NUEVOS POLIMORFISMOS EN EL INTRON 2 DEL GEN DE ADAMTS13.** L Keller<sup>1</sup>, AC Kempfer<sup>2</sup>, AI Woods<sup>2</sup>, A Sanchez-Luceros<sup>1,2</sup>, Y Powazniak<sup>2</sup>, M Carrivale<sup>3</sup>, MA Lazzari<sup>1,2</sup>

*1 Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, 2 CONICET, 3 SECYT*

**Introducción:** Una severa deficiencia de ADAMTS13 puede causar púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) y mutaciones

encontradas en el gen de ADAMTS13 han sido relacionadas a esta enfermedad. Existen evidencias de que algunos polimorfismos (SNPs) influyen en los niveles de actividad de ADAMTS13. El propósito de este estudio es describir 3 nuevos SNPs localizados en el intrón 2. **Métodos:** Estudiamos 9 pacientes (P1-P9) con microangiopatía trombótica, todos con deficiencia de ADAMTS13, rango=16-43% (rango normal=46-184%). Además P8 y P9 tienen autoanticuerpo anti-ADAMTS13. Los padres de P1 (con niveles de ADAMTS13 normales; 68%, 90%) y tres controles normales (87, 90%, 100%). Se amplificaron regiones del intrón/exón 3 de gen de ADAMTS13 en todas las muestras. En P1 se amplificaron también los exones 5, 6, 9, 12, 15, 20, 21, 25-29 del gen de ADAMTS13. La secuencia automática de fragmentos de DNA se desarrolló usando el kit de secuenciación DYEnamic ET Terminator Cycle y el analizador ABI Prism 310. **Resultados:** Los resultados en el intrón 2 fueron: a) El SNPs G173-18T se encontró en P1, su padre, homocigotas y en su madre y P8 heterocigotas. b) SNPs G173-48A se identificó en P1, su padre, homocigotas y en su madre, P2 y P8 heterocigotas. c) SNPs G173-67C se identificó en P1, su padre, P2, P4-P8 y en dos normales homocigotas y su madre, P9 y un normal, heterocigotas. En los exones 5, 6, 9, 12, 15, 20, 21, 25-29 del gen de ADAMTS13 de P1 no se encontraron mutaciones o SNPs. **Discusión:** Se ha descrito recientemente que algunos SNPs comunes podrían modular la función además de los niveles de ADAMTS13 y combinaciones de SNPs (en un alelo simple) pueden producir la ausencia de la secreción de la proteasa. Hemos identificado 3 nuevos SNPs (G173-18T, G173-48A and G173-67C) en el intrón 2. La relación de los SNPs, solos o combinados, con la secreción y los niveles de ADAMTS13 no es clara, dados los niveles normales que presenta el padre.

**0024. (0152) COMPENSACION GEOMETRICA DEL DETERIORO BIOMECANICO DEL TEJIDO OSEO FEMORAL EN RATAS ADULTAS EXPUESTAS A HIPOBARIA.** C Bozzini, MI Olivera, PA Huygens, GM Champin, CE Bozzini, RM Alippi

*Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires; y Bio Sidus SA*

En condiciones normales, la formación de eritrocitos en la rata adulta ocurre en el tejido eritropoyético ubicado en la médula ósea dentro del esqueleto. La hipertrofia de este tejido durante los estados hipereritropoyéticos puede inducir reabsorción ósea y alterar así la calidad biomecánica del mismo. Esta investigación analiza el efecto de la hipereritropoyesis inducida por exposición a hipobaría sobre la estructura y calidad biomecánica de la diáfisis femoral. Ratas hembras Sprague-Dawley adultas (4 meses) fueron divididas en dos grupos (n = 8). El grupo control (C) fue mantenido en condiciones de normobaría, mientras que el experimental (HX) fue expuesto a aire mantenido a 0,5 atm (380 mmHg) durante 22 h/d x 60 d en una cámara de altura simulada (hipobaría). El peso corporal mostró una disminución del 23% y el hematocrito un incremento del 39,6% en las ratas HX al fin del período de exposición. El peso femoral y el contenido total de calcio (masa ósea femoral) no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Las propiedades biomecánicas del fémur derecho fueron ensayadas en el test de flexión a 3 puntos en un equipo Instron. Las propiedades "estructurales" de la diáfisis femoral (carga de fractura, carga elástica límite, rigidez) no sufrieron variaciones en los animales HX, mientras que la calidad del material óseo (módulo de elasticidad) mostró una disminución significativa (-30%). El área de sección transversal (masa ósea cortical) no fue influida por el tratamiento, mientras que el momento de inercia de la sección transversal fue 28% mayor en las ratas HX, con disminución de la relación pared/luz. El análisis de los resultados indica que la hipereritropoyesis inducida por exposición a hipobaría produce deterioro de la calidad del material cortical, que es compensada por la adecuación del diseño arquitectónico óseo, hecho que deriva en la normalidad de la resistencia ósea en las condiciones ensayadas. PROYECTOS UBACYT O-011 y O-012 Y CONICET PIP 5501.

**0025. (0394) LOCALIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE FERROPORTINA EN TEJIDOS MURINOS.** C D'Anna, T Veuthey, G Lopez, M Roque

*Universidad Nacional del Sur*

Ferroportina (MTP1) es una proteína clave en el metabolismo del Fe que participa en el egreso de este nutriente desde enterocitos y macrófagos tisulares, regulando de esta forma su absorción y reciclaje. Nuestro objetivo fue estudiar la distribución subcelular de MTP1 en hígado, bazo e intestino y su relación con los depósitos de Fe en ratones anémicos y no anémicos (basal). Ratones hembra CF1(30±3g) se agruparon en: Grupo Control (n=4): dosis intraperitoneales (i.p) de Solución Fisiológica (SF)(días:0,2) y Grupo Anémico (n=9): dosis i.p. de Fenilhidrazina (60 mg/Kg; días: 0,2). Bazo, hígado e intestino fueron removidos y fijados en Formol 10%. Secciones de 5 µm fueron procesadas para inmunohistoquímica utilizando un Anticuerpo policlonal anti-MTP1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP(DAB). El Fe de depósito se valoró por Tinción de Perls. MTP1 mostró localización citoplasmática en enterocitos duodenales en estado basal, mientras que en anemia se localizó en membrana basal. En macrófagos de la pulpa roja de ratones no anémicos, MTP1 se colocalizó con abundantes depósitos de hemosiderina. En condiciones de hemólisis aguda, se observaron cambios en la expresión esplénica subcelular de MTP1, que sugieren translocación desde el citoplasma a la membrana celular. En células de Kupffer de ratones no anémicos se observó baja expresión citosólica de MTP1, mientras que en condiciones de anemia, su expresión aumentó en la membrana celular. Nuestros resultados muestran que en condiciones basales, MTP1 se localiza en el citosol de enterocitos y macrófagos esplénicos y hepáticos. En la anemia aguda, la translocación de MTP1 funcionaría como mecanismo de egreso de Fe. Podemos concluir que la distribución subcelular de MTP1 sería regulada por señales sistémicas en respuesta a la demanda eritropoyética.

## REPRODUCCIÓN I

**0026. (0045) EL BLOQUEO DEL TNF-ALFA LIBERADO POR LOS MACRÓFAGOS TESTICULARES PREVIENE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES DE RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL.** MS Theas, S Jarazo Dietrich, P Jacobo, L Lustig

*Instituto de Investigaciones en Reproducción*

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo de inflamación testicular caracterizado por la presencia de un infiltrado intersticial de macrófagos y linfocitos y apoptosis de las células germinales (CG). Dado que previamente demostramos que las CG apoptóticas expresan el receptor de TNF-α (TNFR) de tipo 1 y que el medio condicionado de macrófagos testiculares (MCMT) obtenido de ratas con OAE contiene TNF-α el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto del MCMT sobre la apoptosis de las CG y determinar la participación del TNF-α en dicho proceso. La OAE fue inducida por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo experimental, E), las ratas del grupo control (C) fueron inmunizadas sólo con adyuvantes. Los animales fueron sacrificados a los 30 días (d) (sin lesión), 50d (lesión focal) y 70d (lesión severa) de la primera inmunización. El MCMT obtenido de ratas E (MCMT/E) sacrificadas a los 50 y 70 d indujo in vitro apoptosis de las CG (% de CG TUNEL+, MCMT 50d: C:20.23, E: 60.42\*\*\*; MCMT 70d: C:18.34, E: 59.78\*\*\*, p<0.001 vs respectivo C, test de Chi<sup>2</sup>). El contenido de TNF-α en el MCMT/E fue significativamente mayor a los 70d vs el MCMT/C (TNF-α pg/ml, MCMT 30d C:62.55±16.91, E:66.55±11.07; MCMT 50d C:83.00±6.34, E:100.89±17.28; MCMT 70d: C:68.23±19.53, E:111.45±8.79\*, p<0.05, test de Student). Para evaluar si el TNF-α presente en el MCMT participa en la apoptosis de las CG, éste fue neutralizado in vitro empleando una proteína formada por el TNFR y la porción Fc de una IgG (Etanercept, ET). El ET revirtió el efecto apoptótico del MCMT/E (% de CG TUNEL+, MCMT 70d

C:24.66, E:39.88, E+ET:22.58\*\*\*, p<0.001 vs E, test de Chi<sup>2</sup>). Los resultados indican que los macrófagos testiculares producen factores solubles que inducen apoptosis de las CG, siendo el TNF-α un factor importante ya que el bloqueo del mismo previene la apoptosis de las CG durante la fase severa de la OAE.

**0027. (0356) SOBREENPRESIÓN DE CALBINDINA EN TESTÍCULOS DE RATONES HÍBRIDOS. MECANISMO CELULAR ANTIAPOPTÓTICO?** V Rodríguez<sup>1</sup>, G Díaz de Barboza<sup>1</sup>, R Ponce<sup>2</sup>, G Theiler<sup>2</sup>, V Merico<sup>3</sup>, S Garagna<sup>3</sup>, N Tolosa de Talamoni<sup>1</sup>

*1 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, 2 Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, 3 Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università degli Studi di Pavia, Italia*

Los ratones híbridos (2n=36) que surgen del cruzamiento de ratones machos *Graomys centralis* (2n=42) y hembras *Graomys griseoflavus* (2n=34) son infértiles. Se ha demostrado que calbindina D28K (CB) aumenta su expresión en espermatozoides de híbridos infértiles y que modula las variaciones de calcio intracelular previniendo la apoptosis. En este trabajo se caracterizó fenotípicamente al híbrido y se estudió el papel antiapoptótico que ejercería CB en células germinales. Se realizó análisis morfológico de los ratones híbridos y parentales y de sus respectivos testículos a diferentes edades. En secciones transversales de túbulos seminíferos se determinó la expresión de CB mediante la técnica de inmunoperoxidasa empleando un anticuerpo policlonal anti-CB. La apoptosis se evidenció con la técnica de TUNEL. Los estudios mostraron que el fenotipo del híbrido era similar al del parental, y que el tamaño y peso testicular eran significativamente menores en los híbridos. En los parentales, el porcentaje de túbulos con apoptosis disminuyó con la edad, presentando 2,26±0,13 células TUNEL(+) por túbulo mientras que CB prácticamente no se expresó. En los híbridos, la apoptosis fue máxima a los dos meses y CB aumentó en forma paralela a la apoptosis, encontrándose un mayor número de células CB(+) por túbulo a esta edad. Además, el 61% de las células CB(+) colocalizó con TUNEL. En conclusión: a) el menor tamaño testicular en los híbridos reflejaría una disminución de su capacidad reproductiva; b) la apoptosis en los controles disminuye con la maduración sexual, en los híbridos incrementa con la edad; c) la sobreexpresión de CB en los híbridos y la elevada colocalización de CB en células TUNEL(+) sugiere que esta proteína actuaría como un mecanismo de defensa contra la apoptosis, sin embargo no logra prevenir totalmente la muerte celular desencadenada por las alteraciones cromosómicas.

**0028. (0208) ESTRADIOL EN GANGLIO CELIACO Y GANGLIO MESENTÉRICO SUPERIOR MODIFICA LA LIBERACIÓN DE PROGESTERONA Y LA ACTIVIDAD DE SUS ENZIMAS DE SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN.** AS Vega O., Z Sosa, AM Rastrilla

*Laboratorio de Biología de la Reproducción (LABIR). FQByF-UNSL*

Es conocido la influencia del sistema nervioso periférico en la esteroidogénesis ovárica. El objetivo del trabajo fue investigar en estro y diestro II si la adición de estradiol (E<sub>2</sub>) (10<sup>-6</sup>M) en ganglio mesentérico(GM) y celiaco (GC) modifica la liberación de progesterona y la actividad de sus enzimas de síntesis y degradación (3-β-HSD y 20-α-HSD) en ovario. Se usó el sistema ex vivo GMS-GC-Ovario, distribuido en una cubeta con tres compartimientos. Cada ganglio se colocó en un compartimentos unidos entre sí por el plexo ínter mesentérico y al ovario por el plexo nervioso ovárico y nervio ovárico superior respectivamente. Los grupos de trabajo fueron a. Control: incubación en baño metabólico con solución de Krebs Ringer bicarbonato (pH:7,4) en los compartimientos ganglionares y ovárico; b. adición de E<sub>2</sub> en ganglio mesentérico c. adición de E<sub>2</sub> en ganglio celiaco. A los 15, 30, 60 y 120 min. De incubación se extrajo de cada grupo líquido del compartimiento ovárico

se determinó Progesterona por RIA y espectrofotométricamente la actividad de las enzimas en ovario. La significancia de  $p < 0.05$  referido al control. En Estro,  $E_2$  en GMS aumentó la liberación de Progesterona a los 60 y 120 min. ( $*p < 0.001$ ), provocó cambios significativos en la actividad de 3- $\beta$ -HSD ( $p < 0.01$ ), pero no en la 20- $\alpha$ -HSD. En GC,  $E_2$  disminuyó la liberación de Progesterona a los 30 minutos ( $p < 0.01$ ) y de 3- $\beta$ -HSD ( $p < 0.01$ ) sin modificar la 20- $\alpha$ -HSD. En diestro II,  $E_2$  tanto en GM como en GC disminuyó la liberación de Progesterona en todos los tiempos ( $*p < 0.001$ ). Además se observó en ambos casos una disminución en la actividad de 3- $\beta$ -HSD ( $p < 0.01$ ) y un aumento de 20- $\alpha$ -HSD ( $*p < 0.001$ ). Los resultados demuestran fisiológicamente la presencia de receptores ganglionares para estradiol y ponen en evidencia la importancia de estos receptores a nivel de el ganglio mesen-térico y celíaco que de manera interrelacionada modulan la esteroidogénesis ovárica.

**0029. (0430) GHRELINA Y FUNCIÓN TESTICULAR EN DIFERENTES ESTADOS ENERGÉTICOS.** LI Marques<sup>1</sup>, A Giovambattista<sup>2</sup>, MO Suescun<sup>3</sup>

1 Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, IMBICE, 2 Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE, La Plata, 3 Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, IMBICE; Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.

Ghrelin (Ghr), ligando endógeno para el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R), es una de las principales señales moleculares responsables del control integrador entre balance de energía y reproducción. Actualmente se acepta que dicha hormona ejerce acciones gonadales, principalmente mediadas por GHS-R. En este trabajo se estudió la acción de Ghr en testículo de ratas Sprague Dawley pre y pospuberales con diferentes estados energéticos. A tal fin se evaluó el efecto in vitro de dicha hormona en células de Leydig (CL) aisladas de testículos provenientes de animales controles e hiperleptinémicos (por administración con monosodioglutamato, MSG) pre y post ayuno prolongado y la expresión del ARNm del receptor (GHS-R). La acción de Ghr sobre la respuesta esteroidogénica basal y post hCG (10 ng/ml) se evaluó coincidiendo la hormona con células de Leydig durante 3 horas y determinando la testosterona liberada al medio de incubación. Ghr (1 nM) sólo inhibió significativamente ( $p < 0.05$ ) la respuesta de testosterona a la hCG en el grupo de animales adultos controles y MSG ayunados. En prepuberales el efecto ejercido por Ghr in vitro sobre la esteroidogénesis no resultó significativo. La expresión del receptor se determinó en alícuotas de tejido testicular por técnica de RT-PCR en tiempo real. En los animales adultos se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión del mensajero en ambos grupos MSG y control post-ayuno respecto del control. Sin embargo, en los animales prepuberales sólo se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión del ARNm del receptor GHS-R en los grupos MSG y MSG ayunado respecto del control. Las acciones de Ghr sobre la esteroidogénesis y los cambios en la expresión del ARNm del GHS-R en los diferentes grupos estudiados apoyan la idea que el sistema Ghrelin-GHS-R podría modular la función testicular a nivel local y probablemente de modo diferencial según el estado energético del animal.

**0030. (0674) LA INFECCIÓN BACTERIANA EN UN MARCO DE ALTA CONCENTRACIÓN ANDROGÉNICA INDUCE DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES PROSTÁTICAS.** C Leimgruber, AA Quintar, CA Maldonado

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Cs. Médicas. UNC. Córdoba, Argentina

La prostatitis abarca un amplio espectro de etiologías, siendo la bacteriana la más conocida. Previamente, describimos que la infección con *E. coli* induce una marcada hipertrofia de las células musculares lisas (CML) periacinarias. Considerando la andró-

genodependencia de la próstata, nuestro objetivo fue analizar el comportamiento estromal en respuesta a la infección en animales tratados con altas dosis de testosterona (Tt). Se utilizaron ratas Wistar adultas, y los siguientes grupos: T+IN, tratado con 2.5mg/rata/d de Tt por 10d y luego inoculado intraprostáticamente con *E. coli*; T recibió Tt por 10d y fue inoculado con PBS; IN, inyectado sólo con la bacteria, CTR, inyectado con PBS intraprostático. Los animales fueron sacrificados a las 24, 48h y a los 5d postinoculación; la próstata ventral fue procesada para análisis morfológico y de expresión de  $\alpha$ -actina de músculo liso (ACTA2) y TGF $\beta$ , molécula diferenciadora de CML, por inmunocitoquímica y western blot. A las 48h, tanto T+IN como IN exhibieron un aumento en el espesor del músculo periacinar; sin embargo, solamente T+IN presentó CML con fenotipo secretorio, pérdida del perfil contráctil y débil marcación de ACTA2; además, los fibroblastos mostraron gran desarrollo. La expresión de ACTA2 disminuyó en los grupos infectados, pero más intensamente en T+IN (ANOVA  $p < 0.001$  vs T) que en IN ( $p < 0.05$  vs CTR). Además, en T+IN ACTA2 fue menor que en IN ( $p < 0.05$ ). TGF $\beta$  aumentó en IN e IN-T ( $p < 0.05$  vs CTR y T), mostrando un mayor incremento en IN ( $p < 0.05$  vs IN-T). Estos hallazgos fueron más notorios a los 5d en T+IN. En este tiempo los fibroblastos mostraron gran desarrollo de sus organelas proteínopoiéticas y se dispusieron formando una red. Los resultados indican que la infección en combinación con altas concentraciones de Tt constituye una combinación altamente activadora de las células estro-males, con efectos de dediferenciación sobre las CML y estimulación de los fibroblastos, estableciendo un perfil de "estroma reactivo".

**0031. (0367) CALBINDINA D28K PROTEGE A CÉLULAS GERMINALES DE RATONES SUBFÉRTILES DE LA APOPTOSIS MEDIADA POR VÍA MITOCONDRIAL.** G Díaz de Barboza<sup>1</sup>, V Merico<sup>2</sup>, V Rodríguez<sup>1</sup>, R Ponce<sup>3</sup>, S Garagna<sup>2</sup>, N Tolosa de Talamoni<sup>1</sup>

1 Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2 Laboratorio de Biología dello Sviluppo, Università degli Studi di Pavia, Italia, 3 Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Ratones híbridos subfértiles (2n=32) surgidos del cruzamiento de hembras CD1 (2n=40) y machos Milan II (2n=24) presentan fusiones Robertsonianas. Es conocido que las gametas que presentan rearrreglos en su cariotipo muestran incremento en la muerte celular. En trabajos previos se demostró que la proteína calbindina D28k (CB) aumenta su expresión en células germinales de túbulos seminíferos que presentan una elevada muerte celular por apoptosis. Dado que CB puede prevenir la muerte celular actuando a diferentes niveles de la cascada apoptótica, nos propusimos evaluar su posible rol en la prevención de la apoptosis de células germinales analizando la vía mitocondrial. Para ello, se estudió la expresión de CB, de la proteína pro-apoptótica BAX y la localización de citocromo c, mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas sobre secciones de testículo, usando anticuerpos específicos. La fragmentación del ADN, se evaluó por la técnica de TUNEL. Los resultados revelaron muerte de espermatoцитos en metafase del estadio XII a los 3 meses (m) de edad, efecto que incrementó con el tiempo. Paralelamente, CB aumentó su expresión en el mismo estadio y tipo celular, pero sólo se observó colocalización CB-TUNEL en el 13% de las células CB positivas. Los animales parentales presentaron un mínimo de apoptosis de células germinales y de expresión de CB en el mismo estadio. En los híbridos de 5 m, el 72% de los espermatoцитos en metafase expresó BAX, el 64% mostró localización citoplasmática de cit.c y tinción de TUNEL positiva, mientras que el 52% reveló expresión de CB. Sólo el 15% y 11% de células CB positivas mostró colocalización con BAX o cit. c, respectivamente. Los resultados sugieren que la expresión de CB en algunos espermatoцитos en metafase previene su muerte celular al impedir los mecanismos mitocondriales involucrados en la apoptosis. De esta manera, algunos espermatoцитos alcanzan la madurez y permiten conservar parcialmente la fertilidad del ratón híbrido.

**0032. (0258) DIFERENTE RESPUESTA DEL OVARIO PREPUBERAL Y DEL PRIMER PROESTRO Y ESTRO AL ESTÍMULO ADRENÉRGICO Y COLINÉRGICO GANGLIONAR.**

C Escudero, S Valcaneras, S Delgado, M Casais, D Carrizo, A Rastrilla

Lab. Biol. de la Reproducción. Fac. Qca, Bqca.y Farmacia. Univ Nac. de San Luis. 5700. San Luis. e-mail: sdelgado@unsl.edu.ar

El sistema nervioso periférico juega un rol integrativo junto con el sistema endocrino e inmune en la fisiología ovárica. El objetivo del trabajo fue estudiar la acción de Noradrenalina (NA) y Acetilcolina (Ach) en ganglio celiaco (GC) sobre la liberación ovárica de óxido nítrico (NO) durante el primer ciclo estral (proestro y estro) y su comparación con la etapa prepuber. Se usó el sistema *ex-vivo* GC-Nervio Ovárico Superior- Ovario (GC-NOS-O) en dos compartimientos que contienen por separado el O y el GC ambos unidos por el NOS. Los grupos de trabajo fueron a-Control: incubación en baño metabólico con solución Krebs-Ringer-bicarbonato (pH 7.4). b- adición de NA  $10^{-6}$ M en GC y c- adición de Ach  $10^{-6}$ M en GC. Se extrajeron alícuotas del medio ovárico a los 15, 30, 60 y 120 min. Se midió NO por la reacción de Griess. Estadística: test de Student con significancia ( $p < 0.05$ ) respecto al control. Los niveles controles de NO en proestro y estro fueron menores que los de la etapa prepuber ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  respectivamente). NA aumentó la liberación de NO durante el proestro y estro ( $p < 0.001$ ) y en la etapa prepuber mostró igual efecto aunque con menor significancia ( $p < 0.05$ ). Ach en proestro provocó un aumento marcado en la liberación de NO ( $p < 0.001$ ), mientras que este efecto fue menor en el estro ( $p < 0.01$ ). En la etapa prepuber la acción fue también estimuladora ( $p < 0.001$ ). Los resultados muestran que la acción tanto adrenérgica como colinérgica es similar en ambos estadios siendo NA menos estimuladora en la etapa prepuber.

**0033. (0087) ASPECTOS HISTOLÓGICOS Y LECTINHISTOQUÍMICOS DEL EPIDÍDIMO EN RATAS DE DISTINTAS EDADES INYECTADAS CON ALOXANO EN EL POSDESTETE.**

SM Vázquez<sup>1</sup>, N Hisano<sup>1</sup>, C Barbeito<sup>2</sup>

1 Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, 2 Cátedra de Histología y Embriología e Instituto de Patología. Fac. de Cs. Veterinarias, UNLP. CONICET

Estudiamos la histología y el patrón de unión a lectinas del epidídimo de ratas que recibieron en el posdestete una dosis única de aloxano. Ratas de la línea "m" (n=20) se inyectaron con una dosis única de aloxano (24 mg/100 g de peso corporal) (A) a los 23 días de edad. Otro grupo (n= 16) con agua destilada (1 cc/100 g de peso corporal). Se sacrificaron con sobredosis de éter a los 31, 62, 75 días de edad (4-5 ratas/grupo etario). Los epidídimos fueron disecados y pesados. El epidídimo izquierdo fue fijado en formaldehído 4% en PBS y el epidídimo derecho fue desmenuzado y suspendido en formaldehído 2%, para el conteo de espermatozoides se realizó en una cámara hemocitométrica (N° espermatozoides /mg epidídimo). Los especímenes fueron procesados para histología, coloreados con H-E, PAS y lectinohistoquímica: SBA, UEA-I, PNA, DBA, CON-A, RCA, WGA. Fueron observados en un microscopio Zeiss. Los datos expresados como media  $\pm$  SEM y analizados con el test "t" de Student. Los pesos corporales y epididimarios son menores en los animales tratados ( $P < 0.05$ ), en todas las edades. El conteo de espermatozoides se realizó a partir de los 62 días de edad: (A)  $7694 \pm 3701.58$ , (C)  $66351 \pm 952.16$  ( $p < 0.05$ ). La histología epididimaria muestra menor contenido de espermatozoides, contorno tubular irregular con aumento celular epitelial en los animales tratados a los 62 y 75 días de edad. En la lectinohistoquímica se encontraron variaciones relacionadas con la edad y con el tratamiento, en casi todos los animales controles las lectinas del contenido epitelio tubular estuvo más marcado. Se concluye que entre los cambios producidos por el aloxano en el epidídimo se incluyen alteraciones en la cantidad espermática, modificaciones histológicas y en la expresión de sacáridos.

**0034. (0040) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS ISOFORMAS DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN LAS SUBPOBLACIONES DE MACRÓFAGOS PRESENTES EN EL TESTÍCULO DE RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE.**

S Jarazo Dietrich, P Jacobo, L Lustig, MS Theas

Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA

El testículo es un órgano inmunoprivilegiado debido al microambiente local inmunosupresor y a la barrera hemato testicular que protegen a las células germinales. Sin embargo, infecciones y traumatismos pueden desencadenar autoinmunidad testicular e infertilidad. Para estudiar los mecanismos involucrados en el daño testicular, desarrollamos un modelo de inflamación crónica, la orquitis autoinmune experimental (OAE), caracterizado por la presencia de un infiltrado intersticial de macrófagos (M) y linfocitos y apoptosis de las células germinales. Previamente demostramos que al comienzo de la lesión testicular, hay un aumento de la producción de óxido nítrico (ON) por los M testiculares. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de las isoformas inducible (i), endotelial (e) y neuronal (n) de la óxido nítrico sintasa (ONS) en las subpoblaciones de M no residentes (ED1) y residentes (ED2) del testículo. La OAE fue inducida en ratas por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes (E); las ratas control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes. Por citometría de flujo, observamos que el % de M ED1+/ONSi+ aumentó significativamente mientras que el de ED2+/ONSi+ disminuyó en el grupo E vs C (media $\pm$ DE ED1+/ONSi+ E:36.74 $\pm$ 4.24\*, C:9.03 $\pm$ 1.78, ED2+/ONSi+ E:4.8 $\pm$ 0.87\*, C:32.44 $\pm$ 5.69,  $p < 0.001$ ). Por otro lado, no detectamos cambios importantes en el % de M ED1 y ED2 que expresan las isoformas e y n entre los grupos E y C (ED1+/ONSse+ E:65.05 $\pm$ 3.93, C:51.39 $\pm$ 2.52, ED2+/ONSse+ E:66.58 $\pm$ 12.97, C:50.61 $\pm$ 0.91; ED1+/ONSsn+ E:71.63 $\pm$ 2.89, C:71.31 $\pm$ 7.78, ED2+/ONSsn+ E:77.64 $\pm$ 3.74, C:64.18 $\pm$ 3.23). Demostramos que en la OAE los M testiculares expresan las 3 isoformas de la ONS y que existe una expresión diferencial de las mismas siendo la inducible la modulada por el microambiente inflamatorio. Por otra parte, dado que observamos un marcado aumento del % de M ED1+/ONSi+ postulamos que los M testiculares no residentes tienen un papel preponderante como productores de ON en este modelo.

**0035. (0103) EFECTO DEL TIEMPO DE CASTRACIÓN SOBRE EL GRADO DE SIALIZACIÓN Y COMPLEJIDAD DE CARBOHIDRATOS DE FSH HIPOFISARIA EN LA RATA MACHO.**

V Ambao<sup>1</sup>, M Carino<sup>2</sup>, G Cónsole<sup>3</sup>, S Rullí<sup>2</sup>, R Calandra<sup>2</sup>, S Campo<sup>1</sup>

1 Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), CONICET, 2 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, 3 Cátedra de Histología "B", Facultad de Medicina, UNLP

En trabajos previos hemos demostrado que durante el desarrollo sexual de la rata macho aumenta progresivamente el grado de sialización y la complejidad de las cadenas de carbohidratos (CC) de la FSH, las cuales confieren actividad biológica a la hormona. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la castración sobre el grado de sialización (determinado por la abundancia relativa de análogos de carga, expresión génica e inmunolocalización de sialiltransferasas ST6Gal-I y ST3Gal-III) y de complejidad de las CC. Se evaluaron 4 condiciones experimentales en hipófisis de ratas macho adultas (60-70 días): controles (C), y 2 (Cx<sub>2</sub>), 5 (Cx<sub>5</sub>) y 20 (Cx<sub>20</sub>) días post-castración. Se utilizó isoelectrofoque preparativo, cromatografía en Concanavalina-A, RT-PCR semicuantitativa e inmunohistoquímica. La proporción de hormona más sializada (aislada a pH < 3.2) disminuyó significativamente luego de la castración: C: 14.8  $\pm$  0.6%; Cx<sub>2</sub>: 3.6  $\pm$  2.3%; Cx<sub>5</sub>: 6.5  $\pm$  0.7% y Cx<sub>20</sub>: 3.7  $\pm$  0.3% del total de hormona recuperada ( $p < 0.01$  C vs Cx), como así también la proporción de isoformas con CC altamente ramificados: C: 44.1  $\pm$  6.2%; Cx<sub>2</sub>: 15.4  $\pm$  4.7%; Cx<sub>5</sub>: 10.9  $\pm$  2.1%; Cx<sub>20</sub>: 8.0  $\pm$  3.7% ( $p < 0.001$  C vs Cx) y aumentó concomitantemente la proporción de isoformas con CC

de tipo híbrido: C:  $25.4 \pm 2.2\%$ ;  $Cx_2$ :  $45.5 \pm 0.7\%$ ;  $Cx_3$ :  $53.9 \pm 6.8\%$ ;  $Cx_{20}$ :  $56.7 \pm 7.8\%$  ( $p < 0.01$  C vs  $Cx$ ). La expresión génica de ST6Gal-I disminuyó a los 2 días post-castración y luego aumentó progresivamente. La expresión génica de ST3Gal-III no presentó cambios. La intensidad de la inmunomarcación para ST6Gal-I; el tamaño y la densidad celulares aumentaron en  $Cx_3$  y  $Cx_{20}$  ( $p < 0.05$ ). No se observaron cambios en la inmunomarcación para ST3Gal-III. La castración afecta principalmente el grado de complejidad de los CC de FSH y condiciona el posterior agregado de ácido siálico no permitiendo que la sialiltransferasa espe- cífica controle el grado de sialización.

**0036. (0522) EFECTO DEL ALFA-CIANO-4-HIDROXI-CINAMATO (CHC) SOBRE LA SOBREVIDA DE LAS CÉLULAS GERMINALES EN CULTIVO.** MN Galardo, MF Riera, EH Pellizzari, SB Meroni, SB Cigorraga

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas-CONICET*

Se ha propuesto que el lactato proveniente de las células de Sertoli (CS) constituye un sustrato energético para las células germinales (CG) en desarrollo. La producción de este metabolito está altamente regulada por hormonas y podría ser liberado y captado por las células a través de una familia de transportadores de monocarboxilatos (MCTs) recientemente descritos. El objetivo fundamental de este trabajo fue evaluar el efecto del CHC, un inhibidor general de MCTs, en la supervivencia de CG. Se utilizaron CG (espermatozoides paquiténicos y espermátides redondas) aislados de ratas de 28 días de edad. CG se cultivaron en presencia o ausencia de lactato (L) o en presencia de CS provenientes de animales de 20 días de edad. Se evaluó la viabilidad celular por exclusión del Trypan Blue y se expresó como % de células vivas. La incubación de CG con distintas concentraciones de L o con CS (CG/CS) aumentó la viabilidad celular a las 48 horas de cultivo (CG: 65%; L0.5mM: 70%, L1.25mM:80%, L5mM:87%, L10mM:87%, L20mM:88%, CG/CS: 98%). Paralelamente, se observó que CG regula la entrada de glucosa a CS (CS:  $424 \pm 70$ , CS/CG:  $978 \pm 113^*$  dpm 2-deoxiglucosa / $\mu$ gADN,  $X \pm DS$ ,  $n=4$ ,  $p < 0.01$ ) y la producción de lactato por CS (CS:  $7.86 \pm 0.26$ , CS+CG:  $16.84 \pm 0.51^*$   $\mu$ g/ $\mu$ gADN,  $X \pm DS$ ,  $n=4$ ,  $p < 0.01$ ). Para evaluar la participación de los MCTs, se incubaron las células en presencia de L con distintas dosis del inhibidor de los MCTs,  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinamato (CHC). El CHC inhibió el efecto del lactato sobre la viabilidad celular (CG: 65%, L10mM: 84%, L10mM+CHC1mM: 75%, L10mM+CHC10mM: 62%). CHC también inhibió el efecto del cocultivo con CS sobre la viabilidad celular (CG: 54%, CG/CS: 88%, CG/CS+CHC1mM: 85%, CG/CS+CHC10mM: 52%). Los resultados confirman el papel esencial del lactato en la supervivencia de CG y sugieren que es esencial la actividad de los MCTs para regular la supervivencia de CG. (PIP 5479, CONICET; PICT 25365, ANPCYT).

**0037. (0024) PRODUCCIÓN DE EMBRIONES ANDROGENÉTICOS HAPLOIDES BOVINOS.** G Vichera, D Salamone

*Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires*

La producción de embriones androgenéticos es una herramienta muy útil en la investigación del imprinting genómico, debido a que estos embriones poseen únicamente cromosomas de origen masculino. El objetivo de este trabajo fue producir embriones androgenéticos haploides por diferentes métodos, incluyendo un procedimiento novedoso que consistió en enuclear la metafase III (MIII) de ovocitos fertilizados, antes de que ocurra la formación pronuclear (a). También se realizó la fertilización in-vitro (FIV) de ovocitos enucleados de su metafase II (MII) (b); y la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) en ovocitos enucleados (c). La FIV se realizó con  $15 \times 10^6$  espermatozoides por ml, por 3 hs. La enucleación y la ICSI se realizaron por micro-manipulación. Los ovocitos enucleados e inyectados fueron activados utilizando Ionomicina  $5 \mu$ M por 4 min, luego TCM-199 por 3hs para permitir la extrusión del 2° corpúsculo polar y posteriormente con  $1.9 \text{ mM } 6\text{-DMAP}$  por 3 hs. Los resultados de desarro-

llo se analizaron mediante Chi Cuadrado  $p < 0,05$  (abc porcentajes con diferencias significativas).

Procedimiento	n	Clivados (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
a) FIV / Enucleación MIII	105	58 (55)a	23 (22)a	7 (07)a
b) Enucleación MII/FIV	106	59 (56)a	19 (18)a	8 (08)a
c) Enucleación MII/ICSI/DMAP	96	33 (34)b	1 (01)b	-

El desarrollo de los embriones androgenéticos obtenidos mediante ICSI, fue significativamente inferior con respecto a los métodos que incluían FIV. Por otra parte, se demostró que la enucleación de la MIII de ovocitos fertilizados, es un método efectivo para la producción de androgenotes, debido a que los embriones producidos de esta forma, fueron capaces de evolucionar hasta estadio de blastocisto y no se registraron diferencias significativas con respecto a la FIV de ovocitos enucleados.

**0038. (0249) EFECTO DEL BLOQUEO DE LA ACCIÓN ANDROGÉNICA SOBRE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA EN RATONES MACHO HIPERSECRETORES DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA.** B González<sup>1</sup>, M Poutanen<sup>2</sup>, I Huhtaniemi<sup>3</sup>, R Calandra<sup>4</sup>, S Rulli<sup>1</sup>

*1 Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Buenos Aires, 2 Dto. de Fisiología, Universidad de Turku, Finlandia, 3 Imperial College London, Reino Unido, 4 IMBICE, La Plata*

Hemos demostrado previamente que la hipersecreción crónica de hCG en ratones transgénicos (TG) causa hiperplasia/hiper-trofia de células de Leydig, hiperandrogenismo, infertilidad y severas alteraciones en los órganos reproductivos masculinos. El objetivo del presente trabajo fue analizar si los cambios fenotípicos observados en dichos machos se debían a los elevados niveles de testosterona producidos por la gonada. Para ello, se implantaron pellets de 20 mg del antiandrógeno flutamida (F) en ratones TG a los 12 días, y se determinaron los niveles de FSH sérica, peso y morfología de testículos y vesículas seminales (VS) a los 28 días de edad. Los niveles séricos de FSH fueron: controles (C):  $18.3 \pm 2.3^*$ , TG:  $2.7 \pm 0.4$ , TG+F:  $2.6 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$  ( $*p < 0.001$ ). Los pesos de los testículos fueron: C:  $46.6 \pm 1.6^*$ , TG:  $21.7 \pm 0.6$ , TG+F:  $22.4 \pm 0.2 \text{ mg}$  ( $*p < 0.001$ ). No se observaron cambios significativos en la estructura de los túbulos seminíferos o progresión de la espermatogénesis entre los grupos. Las VS aumentaron de tamaño en TG y restablecieron su peso como en C, luego del tratamiento con F (TG:  $164 \pm 8^*$ , C:  $47 \pm 2 \text{ mg}$ , TG+F:  $40 \pm 3 \text{ mg}$ ,  $*p < 0.001$ ). Además, se analizó si el tratamiento prolongado con F tendría efecto sobre la fertilidad en la adultez. Para ello, se aparearon machos C, TG y TG+F con hembras superovuladas; se determinó la capacidad eyaculatoria por presencia de tapón vaginal, y fecundidad por nacimiento de crías. Tapón vaginal: 3/3 machos C, 0/4 machos TG, 1/4 machos TG+F. Sólo los machos C fueron capaces de fecundar a las hembras. Estos resultados indican que el bloqueo de la acción androgénica en ratones macho TG fue capaz de restituir el tamaño y estructura de los órganos sexuales accesorios, pero no fue suficiente para restablecer la fertilidad, sugiriendo que otros factores estarían involucrados en dicho proceso, ya sean actuando a nivel comportamental, o bien funcional sobre los ductos eyaculatorios.

**0039. (0756) ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE PROTEÍNA CRISP3 EN EL ESPERMATOZOIDE DE RATA.** NM Goldweic, M Weigel-Muñoz, JI Ernesto, DJ Cohen, PS Cuanic

*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)*

La familia CRISP comprende un grupo de proteínas secretorias de 20-30 kDa, ricas en cisteínas y muy conservadas evolutivamente. El primer miembro fue identificado por nuestro laboratorio en epidídimo de rata y se conoce como CRISP1. Posteriormente, se describieron CRISP2 (testicular), CRISP3 (ampliamente distri-

buida) y CRISP4 (epididimaria). Dado que se han detectado CRISP1, 2 y 4 en el espermatozoide de rata, el objetivo del presente estudio fue investigar la posible existencia de CRISP3 en la gameta masculina. El anticuerpo contra CRISP3 humana (anti-CRISP3), utilizado en Western blots (Wb), fue capaz de reconocer a la proteína CRISP3 nativa equina (25kDa) como así también de detectar una banda de 23kDa en extractos de espermatozoides y epidídimo de rata. El tratamiento de dichos extractos con B-mercaptoetanol produjo un corrimiento en la movilidad de la banda confirmando la presencia de puentes disulfuro en la molécula. Con el fin de analizar el tipo de asociación de la proteína al espermatozoide, las células fueron sometidas a diferentes tratamientos de extracción, evaluándose la presencia de la proteína por Wb. Los resultados indicaron que la misma no fue removida por PBS, 2M NaCl, pH 3, pH 11 ni 250 mM DTT, y fue totalmente extraída por 1% Tritón X-100. El análisis del comportamiento de la proteína durante la capacitación (por Wb y densitometría), reveló que los extractos de espermatozoides capacitados in vitro por 5 hs presentaban una banda del mismo peso molecular y con una intensidad menor pero no significativamente diferente que en los controles, indicando que la mayor parte permanecería en la gameta luego de la capacitación y no sufriría procesamiento proteolítico. En conjunto, estos resultados apoyan la existencia de la proteína CRISP3 en el espermatozoide de rata y sugieren su posible participación en el proceso de fertilización.

## ONCOLOGÍA I

### 0040. (0812) AUSENCIA DE SEÑALES MADURATIVAS PARA CELULAS DENDRITICAS EN CELULAS DE UN TUMOR MURINO ESPONTANEO NO INMUNOGENICO. VL Reffo, P Chiarella, J Bruzzo, MF Maglioco, VC Camerano, GI Dran, OD Bustuabad, RA Ruggiero

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

La inmunoterapia sería un tratamiento ideal contra el cáncer porque combina eficacia y especificidad, pero hasta hoy no ha dado resultados exitosos contra tumores establecidos. Hay dos causas posibles de este hecho: la inmunosupresión que se manifiesta en portadores de tumores que han superado cierto tamaño crítico y la indetectable inmunogenicidad de muchos tumores espontáneos. Utilizamos un tumor espontáneo de ratón de indetectable inmunogenicidad (linfoma LB) para determinar si ésta se debe a la falta de antígenos extraños o a su incapacidad para inducir una respuesta inmune. Al estimular células dendríticas (DC) in vitro con extracto de este tumor (DC+LB), las DC no exhibieron un aumento significativo en la expresión de marcadores de maduración (CD40, CD80, CD86, MHCII) respecto de las DC sin estimular, ni inmunizaron in vivo contra células LB. Por otro lado, extractos del fibrosarcoma inmunogénico MC-C hicieron madurar las DC y las convirtieron en poderosas vacunas contra implantes de MC-C. La incapacidad del LB para hacer madurar las DC podría deberse a la ausencia de ciertas señales de daño y no a la ausencia de antígenos. DC estimuladas con una mezcla de extracto de tumor LB y MC-C (DC+LB+MC-C) expresaron marcadores de maduración en un nivel superior al observado en DC inmaduras y en DC tratadas con el extracto de LB solo. Además exhibieron una capacidad vacunante contra LB que no mostraron las DC estimuladas con extracto de LB solo: Dosis tumoral 50 (DT<sub>50</sub>) de LB control=1.0x10<sup>3</sup>±0.3; DT<sub>50</sub> de LB de animales tratados con DC+LB=0.8x10<sup>3</sup>±0.3; DT<sub>50</sub> de LB de animales tratados con DC+LB+MC-C=2.3x10<sup>3</sup>±0.1 (n=3, p<0.02 vs. control y p<0.01 vs. DC+LB). Por lo tanto, el tumor LB tendría antígenos que podrían inducir una respuesta inmune protectora, pero carecería de señales madurativas —que en la mezcla le serían provistas por MC-C— para estimular las DC e iniciar una respuesta inmune antitumoral.

### 0041. (0671) ROL DE LA PROTEINA QUINASA C DELTA (PKCD) EN LA RESISTENCIA A LA MUERTE CELULAR INDUCI-

### DA POR ANTRACICLINAS EN CÉLULAS MAMARIAS MURINAS NMUMG. AJ Urtreger, ML Polo, ED Bal de Kier Joffé

*Instituto de Oncología "A. H. Roffo"*

Los antibióticos AD198 y AD288, derivados de la doxorubicina, poseen un probado efecto antitumoral. El primero actúa intercalándose al ADN e inhibiendo la acción de la topoisomerasa II (antraciclina clásica) y el segundo, lo hace activado PKCd, serino-treonina quinasa proapoptótica en distintos modelos celulares. Paradójicamente, nuestro grupo demostró que la sobreexpresión de PKCd en células mamarias NMuMG (NMuMG-PKcd) indujo, entre otras alteraciones fenotípicas, una mayor resistencia a la apoptosis. En este trabajo nos propusimos estudiar si la sobreexpresión de PKCd es capaz de alterar la susceptibilidad a la muerte celular inducida por AD288 o AD198. El tratamiento con 10uM de cada droga mostró que las células NMuMG-PKcd son más resistentes a la apoptosis que las células control, evaluado por ensayos de citotoxicidad in vitro (sobrevida: AD198, 80±10% vs. 41±8% y AD288, 90 ± 15% vs. 60 ± 10% para NMuMG-PKcd y células control respectivamente, p<0.05). El tratamiento con Rottlerina, inhibidor específico de PKCd, consiguió equiparar las respuestas observadas en la sobrevida entre las células NMuMG-PKcd y control sólo luego de tratarlas con AD198 (81±20% vs. 69±20% para NMuMG-PKcd y células control respectivamente. N.S.), mientras que las diferencias en la sobrevida se mantuvieron cuando las células se trataron con AD288. El tratamiento con distintas dosis de PMA, (100nM activadora y 500nM inhibitoria de PKCs) no fue capaz de alterar la sobrevida de las células que sobreexpresan PKCd, probablemente por el efecto del PMA sobre otras isoformas de PKC. En este trabajo demostramos que en nuestro modelo, PKCd es la responsable del incremento en la resistencia a la apoptosis inducida por AD198. Además existirían otras vías antiapoptóticas independientes de la acción directa de PKCd, ya que las células NMuMG-PKcd fueron más resistentes a las antraciclina clásicas aun en presencia de Rottlerina.

### 0042. (0649) ANÁLISIS DE MASTOCITOS TRIPTASA- Y QUIMASA- POSITIVOS Y MICROVASOS EN CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO -PEQUEÑAS (NSCLC). MJ Carlini<sup>1</sup>, LI Puricelli<sup>2</sup>, LM Dalurzo<sup>3</sup>, D Smith<sup>3</sup>, J Lastiri<sup>3</sup>, B Vasallo<sup>3</sup>, MG Pallota<sup>3</sup>, L Lauria<sup>1</sup>

*1 DBBE, FCEN, UBA, 2 Instituto de Oncología Angel H Roffo, UBA, 3 Hospital Italiano de Buenos Aires.*

Los mastocitos (MC) se acumulan en los tumores sólidos en general asociados a zonas de neovascularización. Hay dos fenotipos de MC humanos, positivos sólo para triptasa (MCt) y positivos para triptasa y quimasa (MCtq). Su presencia ha sido asociada con la densidad de microvasos (MV). El objetivo de este estudio fue determinar el número y la distribución de MCt, MCtq y MV en las zonas peritumoral (ZP) e intratumoral (ZI) de carcinomas de pulmón, para investigar su asociación con la supervivencia global. Para ello, se marcaron cortes histológicos de material de cirugía de 72 casos de NSCLC con anticuerpos anti-quimasa, triptasa y el marcador endotelial CD34. Se cuantificó el número de MC y MV en 5 campos a un aumento de 100X, determinándose el valor promedio por 0,24mm<sup>2</sup> de área. Los recuentos para el total de los pacientes se expresaron por su mediana y rango. Todas las determinaciones fueron superiores en la ZP respecto a la ZI (p<0,05). Se observó correlación positiva entre los MCtq y los MV en la ZI (p<0,05). Luego, se dividió a los pacientes en 2 grupos: con valores altos y bajos respecto a la mediana para cada marcador. No se observaron diferencias entre los grupos en relación a la supervivencia global para el total de los pacientes. Sin embargo, al analizar el subgrupo de pacientes estadio I, el grupo con valores bajos de MCtq en la ZP presentó un peor pronóstico (p<0,05 vs. grupo con valores altos). El estudio multivariado de Cox indicó que este marcador puede considerarse un indicador pronóstico independiente (p=0,05). La correlación observada entre los MC y los MV en la ZI, sugiere la participación de los MC en la angiogénesis. La asociación entre un bajo

número de MC y peor pronóstico podría deberse a la presencia de MC activados y desgranulados, no susceptibles de recuento, que hubieran liberado mediadores favorables para la progresión tumoral.

**0043. (0613) DETECCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GANGLIÓSIDO N-GLICOLIL-GM3 EN MUESTRAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN.** MA Castro<sup>1</sup>, L Giménez<sup>1</sup>, MT Dávila<sup>2</sup>, AM Scursoni<sup>2</sup>, N Pozzo<sup>2</sup>, S Camarero<sup>2</sup>, MR Gabri<sup>3</sup>, DF Alonso<sup>3</sup>

*1 Instituto de Oncología Angel H. Roffo, 2 Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, 3 Universidad Nacional de Quilmes.*

Los gangliósidos son glicolípidos de la superficie celular, con funciones en la adhesión, migración, señalización e inmunidad. Las variantes N-glicosiladas poseen una expresión diferencial en los tumores, siendo blancos de interés para el desarrollo de nuevas terapias y vacunas oncológicas. Se conoce que el gangliósido N-glicolil-GM3 (NGcGM3) se expresa en cáncer de mama y melanoma, pero existe muy escasa información sobre la expresión de gangliósidos glicolilados en otros cánceres humanos. En este trabajo, se investigó la expresión de NGcGM3 en cáncer pulmonar, con especial énfasis en la variante a no pequeñas células (CPNPC). Se realizaron inmunohistoquímicas (IHQ) de muestras fijadas en formalina y procesadas en parafina de 20 pacientes con diagnóstico de diferentes tipos histológicos de CPNPC, cáncer pulmonar a pequeñas células (CPCP) o metástasis en pulmón. Secciones de 5 µm fueron desparafinadas e incubadas durante 1 h con el anticuerpo monoclonal 14F7 (provisito por el Centro de Inmunología Molecular, Cuba), una IgG que reconoce específicamente al NGcGM3. Se reveló con un sistema de polímero a base de peroxidasa (EnVision, Dako) y el sustrato diaminobencidina. La marcación fue graduada con una escala de 0-3 (0: no marcación; 1: < 20%; 2: 20-50%; 3: > 50% de las células marcadas), en 10 campos por muestra por 3 patólogos experimentados como observadores independientes. Los resultados se resumen en la tabla, mostrando el n de tumores en cada nivel de gradación por IHQ de acuerdo con el tipo histológico:

	0	1	2	3
CPNPC Total	3	1	1	11
Escamoso	2	-	1	4
Adenocarcinoma	-	1	-	6
CPCP	2	-	-	-
MTS	-	-	-	2

En los pacientes con la variante histológica adenocarcinoma se observó un patrón de marcación principalmente citoplasmático, siendo de membrana en los de tipo escamoso. El tejido pulmonar vecino a lesión cancerosa resultó negativo en la mayoría de los casos. Se concluye que el gangliósido NGcGM3 tiene una alta expresión en CPNPC, muy especialmente en la variedad adenocarcinoma.

**0044. (0471) ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN CANCER DE MAMA.** V Di Girolamo, J Chambó, S Coronato, G Laguens

*Facultad de Ciencias Médicas UNLP*

Las proteasas de la matriz extracelular (MEC), juegan un papel importante en la progresión tumoral, dado que degradan el colágeno tipo IV de las membranas basales favoreciendo la invasión y metástasis. El factor determinante de la actividad proteolítica, in vivo, estaría dado por el balance entre la producción y activación de las proteasas y la producción de sus inhibidores (TIMPs). El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la actividad proteolítica de la MEC en carcinomas mamarios humanos. En el acto quirúrgico se obtuvieron 23 biopsias de carcinomas mamarios (carcinoma ductal infiltrante=15, recidivas de CDI=4, carcinoma lobulillar infiltrante=3, carcinoma tubular infiltrante=1). Como control se utilizaron 8 biopsias de mama de pacientes sometidas a mamoplastía. Los homogenatos de las muestras fue-

ron procesados para electroforesis en gel de poliacrilamida, conteniendo 0,1% de gelatina. La actividad gelatinolítica de las áreas no coloreadas se evaluó visualmente. El 78,2% de los carcinomas mamarios presentaron actividad gelatinolítica. En los tumores de alto grado histológico, con metástasis ganglionares y en los 4 casos de recidiva la actividad proteolítica fue escasa o nula. En las mamas normales no se detectó actividad proteolítica, salvo 1 caso con vestigios de actividad. **Conclusiones:** La baja actividad encontrada en los tumores de alto grado, con metástasis y en las recidivas muestra una aparente contradicción, teniendo en cuenta el rol de las proteasas en la invasión tumoral y metástasis. Esta correlación inversa ha sido descrita por otros autores. Hay que tener en cuenta la actividad de los inhibidores de proteasas como una posible explicación de la baja actividad proteolítica y nuestro próximo objetivo será la valoración de los inhibidores en la matriz extracelular de tumores mamarios.

**0045. (0193). IDENTIFICACION DE UN POLIMORFISMO EN LA REGION PROMOTORA DEL GEN TFF1 (-125T>C) EN ASOCIACION AL CANCER DE MAMA.** MC Abba<sup>1</sup>, L Cernignani<sup>1</sup>, M Isla-Larrain<sup>1</sup>, M Crespo<sup>1</sup>, A Colussi<sup>1</sup>, CM Aldaz<sup>2</sup>, A Segal-Eiras<sup>1</sup>, MV Croce<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata, 2 Department of Carcinogenesis, MD Anderson Cancer Center Science Park - Research Division, TX - USA.*

TFF1 pertenece a una familia de pequeñas proteínas de secreción denominadas trefoil factors (TFF1, TFF2 y TFF3), originalmente identificado como un gen de respuesta a estrógenos. TFF1 se halla frecuentemente sobre-expresado en carcinomas invasores de mama. Ha sido sugerido que TFF1 se encontraría involucrado en la invasión tumoral. Se ha determinado que este aumento en la expresión de TFF1 se debe principalmente a mecanismos de regulación de la expresión génica. El objetivo del presente estudio fue investigar variaciones en la secuencia promotora proximal (-245 a -29 pb del sitio de inicio de la transcripción) del gen TFF1 en células epiteliales mamarias malignas y normales. Se purificó ADN de 117 muestras mamarias de carcinomas invasores, neoplasias benignas y tejidos normales. El estudio de las variaciones en la región promotora se efectuó por PCR-LIS-SSCP (Low Ionic Strength Single Strand Conformational Polymorphisms). La caracterización de los polimorfismos se realizó por PCR-RFLP y secuenciación directa de cada uno de los patrones hallados por LIS-SSCP. Se identificó un polimorfismo de nucleótido simple localizado a -125T>C pb del sitio de inicio de la transcripción. Las frecuencias alélicas (T=0,67 y C=0,33) en el grupo control se encontraron en el equilibrio de Hardy-Weinberg (p=0.4). Se identificaron tres genotipos (T/T, T/C y C/C) hallándose un enriquecimiento significativo del genotipo homocigotas C/C en el grupo de pacientes con carcinomas ductales infiltrantes de mama (25%) en comparación con el grupo control (4%) (p=0.014). La estimación del riesgo relativo asignado al genotipo C/C en asociación con el cáncer de mama fue OR=8,12 IC95%=1,04-63,4 (p=0.02). Este estudio muestra que el polimorfismo -125T>C, localizado en la región represora del promotor de TFF1 podría constituir un factor asociado al desarrollo de esta neoplasia maligna.

**0046. (0190) SOBRE-EXPRESION DEL GENE RHBDD2 EN CÉLULAS EPITELIALES DEL CANCER DE MAMA.** MC Abba<sup>1,2</sup>, MI Nuñez<sup>1</sup>, MV Croce<sup>2</sup>, A Segal-Eiras<sup>2</sup>, CM Aldaz<sup>1</sup>

*1 Department of Carcinogenesis, MD Anderson Cancer Center Science Park-Research Division, Smithville, TX - USA., 2 Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas - UNLP, La Plata.*

El gen RHBDD2 (rhomboid domain containing 2) localizado en el cromosoma 7q11.23, codifica una proteína de siete pasos transmembrana perteneciente a la familia de genes rhomboid veinlet-like inicialmente descritos en *Drosophila*. Estas proteínas

han sido implicadas en la activación del receptor del factor de crecimiento epidermal. Los objetivos del presente estudio fueron la caracterización de la expresión génica, el análisis de la secuencia promotora, y la identificación de eventos de amplificación génica de RHBDD2 en asociación al cáncer de mama. El estudio de la expresión se abordó por: análisis serial de la expresión génica (SAGE) (n=46), Real Time RT-PCR (Q-RT-PCR) (n=43), inmunohistoquímica (IHQ) (n=84) y western-blot (en líneas celulares de cáncer de mama). La región promotora del gen RHBDD2 se analizó por secuenciación de 600 pb 5' proximal al sitio de inicio de la transcripción para su subsiguiente caracterización *in silico*. Los eventos de amplificación génica se analizaron por las metodologías de RG-PCR (Reference gene PCR) (n=100). La metodología SAGE permitió identificar sobre-expresión del gen RHBDD2 en carcinomas invasores de mama respecto a muestras normales ( $p=0.008$ ). Generamos un anticuerpo policlonal contra RHBDD2 el cual fue utilizado en IHQ y WB validando las observaciones mencionadas ( $p=0.025$ ). El análisis por Q-RT-PCR de carcinomas invasores de mama, demostró una asociación significativa de los pacientes con recurrencia (6 años de seguimiento) y la sobre-expresión de RHBDD2 ( $p=0.002$ ). Se detectó aproximadamente un 15% de carcinomas con amplificación del gen RHBDD2, mientras que no se detectaron muestras amplificadas en tejido mamario normal ( $p<0.05$ ). En conclusión este estudio relaciona por primera vez un miembro de la familia rhomboid veinle-like humano con la sobre-expresión y amplificación génica en el cáncer de mama y como un marcador de pobre pronóstico.

**0047. (0470) UTILIZACIÓN DE HORNO MICROONDAS COMO NUEVO MÉTODO PARA ESTUDIAR LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS EPITELIALES NORMALES O TUMORALES Y EL ESTROMA EN LA REGULACIÓN DE LA MIGRACIÓN CELULAR.** P Sacca<sup>1</sup>, V Pistone Creydt<sup>1</sup>, JC Calvo<sup>2</sup>

*1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, 2 Dto. Química Biológica, FCEN, UBA*

El estroma cumple un papel fundamental de soporte y regulación del crecimiento de células epiteliales. El trabajo experimental con medios condicionados tiene la limitación de contar únicamente con factores solubles, perdiéndose la función del estroma como soporte. El objetivo fue obtener un modelo experimental que mantuviera las características del entorno fisiológico de las células epiteliales mamarias, tanto por los factores como por la estructura estromal. Se cultivaron preadipocitos 3T3-L1 (modelo de células estromales mamarias) y se irradiaron en horno microondas. Sobre este soporte se hicieron crecer células epiteliales murinas normales (NMuMG) y tumorales (LM3). Se midió la proliferación celular por MTS luego de la irradiación; y la migración de las células epiteliales sobre el soporte estromal mediante cicatrización de la herida. La viabilidad de las células 3T3-L1 fue de  $7,8\pm 5,3\%$  respecto al control ( $p<0,05$ ) luego de 48 h de irradiación en microondas. Evaluamos, entonces, la migración celular de las líneas epiteliales creciendo sobre este soporte. Las NMuMG no mostraron diferencias significativas en la cicatrización de la herida 6h después del corte; mientras que con las LM3 la herida se cerró en un  $44\pm 2\%$  respecto a la condición inicial (ci,  $p<0,05$ ). A las 72h, observamos un cierre total de la herida de las LM3 creciendo sobre el soporte estromal, mientras que estas mismas células cultivadas sobre plástico no cubrieron el corte en su totalidad ( $62\pm 3\%$  vs. ci). Esta diferencia entre una y otra condición experimental no fue observada con las NMuMG ( $38\pm 4\%$  en soporte estromal y  $39\pm 3\%$  en plástico vs. ci). Por tanto, consideramos que este es un método experimental nuevo y simple para el estudio de la interacción entre el epitelio y el estroma. El soporte estromal de preadipocitos irradiados reguló de manera diferencial la migración de las LM3 con respecto a las NMuMG, potenciando la capacidad metastásica de las células epiteliales tumorales mamarias.

**0048. (0291) LOS COMPUESTOS ADRENÉRGICOS AUMENTAN LA LIBERACIÓN DE PROLACTINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO IN VITRO.** LF Castillo, A Bruzzone, C Perez Piñero, IA Luthy

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

El diagnóstico y tratamiento de cáncer de mama provocan estrés y hasta depresión en muchas pacientes. Durante el estrés agudo se libera compuestos adrenérgicos y prolactina (Prl). Habíamos demostrado la expresión de receptores adrenérgicos en células tumorales mamarias humanas, asociados a un efecto mitogénico. El objetivo del presente trabajo fue verificar si dicho efecto mitogénico podía estar mediado en parte por la liberación de Prl. Para ello utilizamos el agonista adrenérgico natural epinefrina (Epi) y el agonista específico alfa2-adrenérgico dexmedetomidina (Dex). Se utilizaron varias líneas celulares de cáncer de mama humano cultivadas con medio DMEM-F12 suplementado con 10% SFB. Los medios condicionados (MC) fueron obtenidos al incubar células al 80% de confluencia en medio libre de suero durante 48 hs con Epi o Dex 0.1nM, 1nM y 10nM. Se determinó la concentración de Prl, en los MC mediante el bioensayo de células Nb2: se incubaron estas células con los MC al 25% durante 2 días y se midió incorporación de timidina-[3H]. En todos los casos Epi estimuló significativamente la concentración de Prl liberada al medio de cultivo: Ejemplo: Epi 1 nM: MCF-7=0.36ng/ml vs 6.85pg/ml control; T47D=0.26ng/ml vs 85.5pg/ml control; IBH-4=599ng/ml vs 74.9 ng/ml control, IBH-6=172ng/ml vs 2.6ng/ml control ( $p<0.001$  respecto del control  $\pm$ SD en todos los casos). En las dos primeras líneas celulares el agonista específico Dex tuvo el mismo efecto, por ejemplo: Dex 1 nM: MCF-7=6.8ng/ml vs 0.62ng/ml; T47D=0.17ng/ml vs 38.7pg/ml ( $p<0.001$  en ambos casos). En cambio en la línea celular IBH-4 Dex 1 nM inhibió esta liberación: IBH-4=0.63ng/ml vs 0.94ng/ml ( $p<0.001$ ); por otro lado en para IBH-6 no hubo ningún efecto: IBH-6=0.28ng/ml vs 0.3ng/ml. La estimulación de la liberación de Prl por Epi en células MCF-7 y T47D estaría mediada por un efecto alfa2-adrenérgico, mientras que en las otras células se debería a una estimulación diferente, probablemente beta adrenérgica.

**0049. (0505) PAPEL DE LA HISTAMINA EN LA REGULACIÓN DE LA CARCINOGENESIS MAMARIA.** VA Medina<sup>1</sup>, NA Massari<sup>1</sup>, MA Nuñez<sup>1</sup>, GP Cricco<sup>1</sup>, GA Martin<sup>1</sup>, N Mohamad<sup>1</sup>, EJV Crescenti<sup>2</sup>, RM Bergoc<sup>1</sup>, ES Rivera<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina, 2 Instituto de Inmunooncología, Córdoba 3200, Buenos Aires, Argentina.*

La histamina (HA) modula la proliferación de la línea tumoral mamaria MDA-MB-231 en forma dosis dependiente. La HA 10  $\mu$ M disminuye la proliferación y este efecto se asocia con un arresto del ciclo celular, diferenciación y apoptosis. La HA 0.01  $\mu$ M incrementa la proliferación y migración celular. En este trabajo caracterizamos el patrón de expresión génica asociado a la angiogénesis (OHS-024) y a las principales vías de señalización intracelular (OHS-044) empleando microarreglos (SuperArray,GE) identificando numerosos genes modulados por la HA 10  $\mu$ M. Los resultados fueron confirmados por otras metodologías: RT-PCR, western blot y ELISA. Empleando agonistas y antagonistas específicos de los receptores H3 y H4 (RH3 y RH4) se determinó la participación de los mismos en las respuestas biológicas mediadas por HA. Los resultados indican que la HA regula positivamente la expresión de genes relacionados con la apoptosis y la inhibición del crecimiento: IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ; CDKN1C (p57); BCL-XS; caseína  $\beta$  (3.6; 24.7; 2.1; 2; 2.3; 25.0-veces). Por otra parte, incrementa la expresión de genes asociados a la migración y la angiogénesis: ADAMTS1,8; RNASE4; EDG1; ETS-1; FGF7; VEGFD; ITGB3; PDGFRB (41,3; 84.5; 30.8; 42.2; 8; 40.4; 2.3; 9.0; 24.0-veces) mientras que disminuye la expresión de TGFB3; TGFR1,2; VEGFB. El aumento de la proliferación y migración celular es mediado por el RH3 mientras que ambos procesos son inhibidos vía el RH4 así como también la inducción de la apoptosis determinada por ensayo de TUNEL y Annexin-V ( $p<0.01$ ).

El presente estudio demuestra que la HA ejerce un papel dual en la tumorigenesis mamaria, actuando no solo como antioncogénico disminuyendo la proliferación e induciendo la apoptosis y diferenciación celular, sino también favoreciendo la oncogénesis a través del incremento de la proliferación y migración celular y modulando la angiogénesis. Los RH3 y RH4 son los principales receptores involucrados en la regulación de la carcinogénesis mamaria mediada por HA.

**0050. (0785) PAPEL DE LA HISTAMINA EN PROCESOS INVOLUCRADOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL MAMARIA.** F Genre<sup>1</sup>, NA Mohamad<sup>2</sup>, MA Nuñez<sup>2</sup>, E Valli<sup>2</sup>, LA Sambuco<sup>2</sup>, AS Gutiérrez<sup>2</sup>, VA Medina<sup>2</sup>, NA Massari<sup>2</sup>, ES Rivera<sup>2</sup>, RM Bergoc<sup>2</sup>, GP Cricco<sup>2</sup>, GA Martin<sup>2</sup>

*1 Laboratorio de Radioisótopos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Becaria de la Fundación Avon., 2 Laboratorio de Radioisótopos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA.*

La progresión de las células epiteliales transformadas hacia un estado metastásico se caracteriza por una menor adhesión celular y un aumento en la motilidad celular y en la expresión de proteasas extracelulares que degradan la matriz extracelular. Nuestro objetivo fue estudiar la acción de la HA sobre la adhesión celular, la expresión y actividad de las gelatinasas (MMP2 y MMP9) en cultivos de líneas celulares mamarias MDA-MB-231 (tumorigénica) y HBL100 (no tumorigénica). La adhesión celular se evaluó por el método de adhesión a placa de cultivos, con la posterior coloración de las células adheridas y medición espectrofotométrica. Los niveles de la MMP2 y MMP9 se evaluaron por RT-PCR e inmunocitoquímica y la actividad gelatinolítica por zimografía. Además se determinaron por RT-PCR los niveles de la metaloproteasa MMP7 y los inhibidores tisulares de MMPs (TIMP1 y TIMP2). La línea HBL100 presentó niveles basales de actividad gelatinolítica menores respecto de la otra línea. En las HBL100 la actividad basal de la MMP2 fue mayor que la de MMP9, mientras que en las MDA predominó la actividad de la MMP9. El tratamiento con HA produjo una disminución significativa de aproximadamente el 25% ( $p < 0.05$ ) en la actividad de la MMP2 en ambas líneas, mientras que la MMP9 sólo disminuyó en las MDA en el mismo porcentaje ( $p < 0.01$ ). Estos resultados se corroboraron por RT-PCR revelando la capacidad de la histamina para modular la actividad de las MMPs a través de sus distintos receptores en las dos líneas celulares. Con respecto a la adhesión celular, la histamina la disminuyó en un 30% ( $p < 0.05$ ) en las MDA, mientras que la aumentó en las HBL100 en un 25% ( $p < 0.05$ ). Por RT-PCR se observó que los niveles de MMP7 fueron mayores en las HBL100 respecto de las MDA; mientras que los niveles de TIMP1 y TIMP2 fueron muy altos en ambas líneas celulares. Estos resultados señalan un posible rol de la HA en los procesos involucrados en la progresión del carcinoma mamario.

**0051. (0127) RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINAMICA EN CELULAS TRANSFECTADAS CON EL ONCOGEN H-RAS.** L Rodríguez<sup>1</sup>, G Di Venosa<sup>1</sup>, S Schickinger<sup>1</sup>, A Battle<sup>1</sup>, A MacRobert<sup>2</sup>, A Casas<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET-UBA-Htal. de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, 2 National Medical Laser Centre, Royal Free and University College Medical School, University College London, London, UK*

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento antineoplásico que se basa en la acumulación preferencial de un fotosensibilizante (FS) en el tejido maligno luego de su administración. La iluminación con una luz de longitud de onda adecuada, da lugar a una reacción fotoquímica que produce la destrucción selectiva del tejido tumoral. El objetivo del presente trabajo es comparar la eficiencia de la TFD con FSs de distinta localización subcelular sobre un par de líneas celulares tumoral/normal. Para ello se emplearon células HB4a de epitelio luminal mamario normal y su derivada transfectada con el oncogen H-Ras (VAL/

12 Ras). Se emplearon los siguientes FSs: Verteporfirina, bis (dimetil-1-amino)-naranja de acridina, Foscan, Fotofrin y Merocianina 540. Se cuantificó la acumulación de los 5 FSs en ambas líneas y además se observó la localización subcelular por microscopía confocal. Luego de poner a punto las condiciones de tiempos de incubación y concentraciones óptimas, se llevó a cabo la TFD con cada FS. Se observó que empleándose dosis de FS tales que indujeran igual concentración intracelular en ambas líneas, las dosis letales de luz para matar el 50% de las células son: para Verteporfirina, HB4a:  $1 \pm 0,1$  min, HB4a-Ras:  $2 \pm 0,2$  min ( $p=0,001$ ); Naranja de acridina, HB4a:  $3 \pm 0,2$  min, HB4a-Ras:  $4,2 \pm 0,5$  min ( $p=0,004$ ); Foscan, HB4a:  $4,3 \pm 0,5$  min, HB4a-Ras:  $4,6 \pm 0,3$  min (n.s.); Fotofrin, HB4a:  $4,6 \pm 0,4$  min, HB4a-Ras:  $7,8 \pm 0,8$  min ( $p=0,004$ ) y Merocianina 540, HB4a:  $15 \pm 1,8$  min, HB4a-Ras:  $21,5 \pm 2$  min ( $p=0,003$ ). Esto muestra que las células transfectadas con Ras aumentan significativamente su resistencia al tratamiento fotodinámico con todos los FS excepto Foscan. De los mencionados resultados se puede concluir que el oncogen H-Ras confiere resistencia a la TFD independientemente del FS. Se cree que están involucradas señales de supervivencia que son comunes a ambos tratamientos.

**0052. (0079) CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS DE ÁCIDO AMINOLEVULÍNICO Y DERIVADOS.** G Di Venosa<sup>1</sup>, L Hermida<sup>2</sup>, L Rodríguez<sup>1</sup>, H Fukuda<sup>1</sup>, L Mamone<sup>1</sup>, A Battle<sup>1</sup>, MV Defain<sup>2</sup>, A MacRobert<sup>3</sup>, A Casas<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires. Ciudad de Buenos Aires, Argentina, 2 Centro de Química y Petroquímica (CEQUIPE), Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Buenos Aires, Argentina, 3 National Medical Laser Centre, Royal Free and University College Medical School, University College London, London, UK*

Con el objetivo de aumentar la captación y distribución del ácido aminolevulínico (ALA) y sus derivados ésteres Hexil-ALA (He-ALA) y Undecanoil-ALA (Und-ALA) para su uso en la Terapia fotodinámica (TFD), se desarrollaron liposomas de diferente composición. Para ello se emplearon los siguientes fosfolípidos: fosfatidil colina (PC), ácido fosfático (PA) y fosfatidil glicerol (PG). Se prepararon liposomas pequeños unilaminares de un tamaño igual o menor a  $0,2 \mu\text{m}$  de PC (100), PC:PG (80:20) o PC:PA (80:20) conteniendo ALA o derivados y se purificaron por un método de centrifugación en micolumnas. El porcentaje de incorporación de los liposomas de PC fue del  $5,8 \pm 0,8\%$  para ALA 2 mM,  $13,6 \pm 2,5\%$  para He-ALA 2 mM y  $51,6 \pm 6,7\%$  para Und-ALA 2 mM. La adición de fosfolípidos catiónicos a la formulación de PC produjo un incremento en la eficiencia de incorporación:  $18,7 \pm 2,5\%$  para ALA 2 mM,  $69,5 \pm 5,1\%$  para He-ALA 2 mM y  $87,0 \pm 10,1\%$  para Und-ALA 2 mM en PC:PG (80:20) y  $21,4 \pm 3,4\%$  para ALA 2 mM,  $60,4 \pm 8,9\%$  para He-ALA 2 mM y  $86,7 \pm 10,1\%$  para Und-ALA 2 mM en PC:PA (80:20). Mayores concentraciones de ALA o derivados mostraron menores porcentajes de incorporación. Las tres formulaciones conteniendo ALA o derivados fueron estables luego de ser almacenadas durante una semana a  $4^\circ\text{C}$ . La incubación de liposomas vacíos de las tres composiciones con ALA o con sus derivados mostró una incorporación significativa, lo que demuestra la difusión de dichas moléculas hacia y desde los liposomas.

**0053. (0619) COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES, SU DETECCIÓN EN EL CONDENSADO DE AIRE EXPIRADO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMON.** F Caballero<sup>1</sup>, A Barro<sup>2</sup>, M Guolo<sup>1</sup>, A Battle<sup>1</sup>, J Mazzei<sup>2</sup>

*1 Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), UBA-CONICET, Hospital de Clínicas., 2 1ra Cátedra de Medicina Interna, UBA - Hospital de Clínicas.*

El cáncer de pulmón (CaP) está acompañado de un incremento de estrés oxidativo (EO) e inducción de enzimas del CitP450. Ambos procesos tienen efecto sobre la presencia de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) en el aliento, por cuanto el EO produ-

ce peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados en membranas. En el aire expirado (AE) se detectaron aproximadamente 200 VOCs. Recientemente se identificaron nuevos biomarcadores, alcanos y metilalcanos, que también lo son para EO. Con el fin de establecer y comparar los patrones característicos de los componentes del condensado de AE (CAE), en fumadores y en pacientes cursando EPOC o CaP; se seleccionan pacientes que asisten a la consulta en el Servicio de Medicina Interna del H. de Clínicas, se les colecta CAE, se les hace espirometría y curva de flujo volumen con/sin broncodilatadores. El CAE se analiza en un cromatógrafo gaseoso con muestreador automático Headspace y detector de masas. En el CAE de fumadores se observó un incremento, medido en número de veces (v) con respecto a individuos sanos (is), de butano (2,7v; Vis=1,8±0,7ppm) y decano (1,7v; Vis=152±12ppb). En pacientes EPOC y CaP estos VOCs estaban ausentes o disminuidos; en cambio, presentaron niveles altos de 3-metilpentano (1,5v y 1,8v, respectivamente; Vis = 67±4ppb). En pacientes CaP además se incrementó hexano (4v; Vis=141±13ppb) y 2,4-dimetilheptano (2,8v; Vis=8,2±0,8ppb) y en EPOC 2-metilpentano (8,6 v; Vis=107±17ppm). El análisis de benceno y derivados (BTEX) reveló en pacientes con CaP, a diferencia de los otros grupos, presencia de benceno (VCaP= 2,1±0,9ppb) y niveles aumentados de etilbenceno (3,4v; Vis= 2,9±0,8ppb) y de xileno (4v; Vis=7,5±0,6ppb). Estos resultados muestran un alto nivel de EO en fumadores, EPOC y CaP, y sugieren que el análisis de BTEX podría constituir un importante marcador del daño celular que caracteriza a estos pacientes.

**0054. (0710) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DEL COACTIVADOR DE NF-KB Y RECEPTORES NUCLEARES RAC3.** CV Alvarado, PE Galarza, S Micenmacher, C Escaris, GP Colo, MA Rubio, CE Aguirre, MA Costas

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari*

El coactivador RAC3 se encuentra sobre-expresado en tumores mamarios contribuyendo al desarrollo tumoral vía el aumento de actividad de hormonas esteroideas y en general no se debe a amplificación génica. Demostramos también que es coactivador de NF-kB y es anti-apoptótico. Se describió a su vez su rol en el desarrollo de otros tumores no dependientes de esteroides y su rol proliferativo vía el aumento de actividad AKT. Se quiso determinar las posibles señales involucradas en el control de su expresión y actividad en células de riñón humano. Hipótesis: las mismas señales activadoras de factores que utilizan RAC3 podrían participar del control de su expresión y la vía AKT/mTOR participaría de su acción anti-apoptótica. Para determinar si TNF- $\alpha$  (activador de NF-kB) era capaz de regular la expresión de RAC3, células de riñón embrionario humano HEK293 fueron estimuladas con 10 ng/ml de la citoquina por 24 hs. Se observó un aumento significativo de 40±10% por Western blot respecto de basales. Para el estudio de la participación de mTOR en la acción anti-apoptótica de RAC3, se estudió la muerte celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,5 mM en células con alto nivel de RAC3 (transfectadas con vector de expresión) vs. tipo salvaje (vector vacío) en presencia o ausencia de rapamicina 100 a 400 nM (inhibidor de mTOR). Observamos que la acción anti-apoptótica de RAC3 disminuyó de 82 ± 10,2% a 29 ± 8,4% (respecto de basales) en presencia de rapamicina 100nM. La expresión de RAC3 podría ser regulada al menos por citoquinas inflamatorias y su acción biológica podría ser inhibida por bloqueo de la vía mTOR.

## ONCOLOGÍA II

**0055. (0779) PI3K/AKT Y EL FENOTIPO DE CÉLULAS STEM EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA.** JP Cerliani<sup>1</sup>, R Gargini<sup>2</sup>, JC Calvo<sup>3</sup>, C Lanari<sup>1</sup>, M Izquierdo<sup>2</sup>

*1 IBYME, 2 Instituto Severo Ochoa, UAM, Madrid, 3 Departamento Química Biológica, Fac. Exacta, UBA*

La glándula mamaria es un órgano dinámico que sufre cambios durante la preñez, lactación e involución. Todos los cambios

en el repertorio celular de los distintos estadios son generados en las denominadas stem cells (SC). Por otro lado existen numerosas evidencias que indican que las SC son blanco de la transformación durante la carcinogénesis debido a que tienen una tasa de proliferación baja con lo cual pueden acumular mutaciones a lo largo de los años. Se discute si las SC tumorales son las mismas o no que las SC de tejido normal. En cáncer de mama se las define por presentar los marcadores CD44+/CD24-/low. Dado que la SC tumorales presentan una resistencia innata a la quimio y radioterapia hay mucho interés en conocer su biología. El objetivo de este trabajo fue evaluar las características de SC de dos líneas celulares de cáncer de mama humano, una de ellas receptor de estrógenos positiva, MCF-7 y la otra negativa, MDA-MB 231 (MDA) y evaluar la respuesta de las mismas a inhibidores de la vía de Akt. Se realizaron los cultivos apropiados con medios específicos para favorecer el crecimiento en mamoesferas, crecimiento característico de SC. Luego de varios pasajes en estas condiciones se verificó el fenotipo SC CD44+/CD24-/low por citometría de flujo, y se las incubó con el inhibidor de PI3K, LY 294002 (Ly, 10  $\mu$ M), o con el inhibidor de mTOR, rapamicina (Rap, 10 nM) o combinación de ambos durante una semana. Ambas líneas celulares en presencia de los inhibidores de la vía de Akt cambiaron el crecimiento en mamoesferas por crecimiento en plástico, disminuyendo el crecimiento ( $p < 0,001$ ), la expresión de Bmi, Ciclina D1 y b-catenina y una disminución de fenotipo SC: MDA control: 76,13%, Ly: 67,54%; Rap: 23,98%, Ly+Rap: 26,05%, MCF 7 control: 51,07%, Ly: 20,20%, Rap: 27,87%, Ly + Rap: 33,44% ( $p < 0,05$ ). Estos resultados demuestran por primera vez que la vía de señalización PI3K/Akt está involucrada en la mantención del fenotipo SC en las líneas tumorales.

**0056. (0276) RELACIÓN ENTRE RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP), RECLUTAMIENTO ESTROMAL Y EXPRESIÓN DE CXCL12 EN EL CRECIMIENTO IN VIVO DE UNA LÍNEA DE CARCINOMA MAMARIO MURINO MC4-L5.** CA Lamb<sup>1</sup>, E Salvatierra<sup>2</sup>, VT Fabris<sup>1</sup>, C Lanari<sup>1</sup>, O Podhajcer<sup>2</sup>

*1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, 2 Fundación Instituto Leloir*

Demostramos que la línea celular MC4-L5 transfectada en forma estable con una secuencia shRNA capaz de inhibir al mRNA del RP (O6), detiene su crecimiento in vivo comparada con la línea sin transfectar (Wt) o transfectada con el vector vacío (pCMV). Sólo los tumores Wt o pCMV mostraron además de las células epiteliales tumorales la presencia de células ahusadas entremezcladas. Para investigar las causas de estas diferencias, evaluamos 1) el rol del sistema inmune, 2) la estirpe de la población de morfología ahusada, 3) la expresión del factor CXCL12 y su receptor CXCR4 en extractos tumorales. Se transplantaron los 3 tipos celulares en ratones nude ( $n=12$ ). A los 44 días post-inóculo la línea Wt alcanzó un tamaño tumoral de 62±42 mm<sup>2</sup>, la pCMV 42±17 mm<sup>2</sup> y la O6 estancó su crecimiento en 13±8 mm<sup>2</sup> ( $p < 0,05$ ). Estos resultados fueron similares a los obtenidos en ratones BALB/c. Estudiamos la estirpe de la población ahusada inoculando en ratones BALB/c machos la Wt (hembra) y detectamos el estroma tumoral por FISH usando sondas específicas para el cromosoma Y en conjunción con anticuerpos anti citoqueratina por fluorescencia. El análisis de los resultados por microscopía confocal sugiere que las células ahusadas son del huésped. La expresión de la isoforma de 40 kDa del CXCR4 no varió mientras que, el CXCL12, evaluado por Western blot en extractos tumorales normalizados por contenido de caderina E, fue mayor en la línea O6 ( $p < 0,05$ ) que en las líneas control. Los resultados demuestran que la inhibición del crecimiento tumoral no se debe a la respuesta inmune del huésped. La asociación entre baja expresión de RP, aumento de expresión de CXCL12, falta de reclutamiento de estroma y disminución de crecimiento tumoral sugieren el rol fundamental del RP en el crecimiento in vivo de esta línea celular y que este participaría del reclutamiento estromal regulando la expresión de CXCL12.

**0057. (0299) BLOQUEO DE RECEPTORES PARA FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (RFGF) EN EL CRECI-**

**MIENTO DEL CARCINOMAS MAMARIO MURINO C4-HI.**

JP Cerliani, V Novaro, J Bolado, S Giulaneli, C Lanari

IBYME

Hemos demostrado en carcinomas mamarios murinos hormono-independientes (HI) y hormono-dependientes (HD) creciendo con acetato de medroxiprogesterona (MPA) un incremento de la expresión de los 4 receptores para FGFs, mayoritariamente RFGF-2 y 3. Además, en co-cultivos de fibroblastos asociados a tumor (CAF) y células epiteliales (EPI) de tumores HI pudimos observar que el bloqueo de receptores de progesterona (RP), o del FGF-2 o de los RFGF-2 y 3 inhibió la proliferación celular, específicamente de las EPI. Por otra parte, observamos una interacción nuclear entre RP y RFGF-2 por microscopía confocal y co-inmunoprecipitación de ambos receptores. El objetivo de este trabajo fue realizar una terapéutica in vivo con el inhibidor de los RFGFs, PD 173074 (PD) en los tumores HI. Para ello se evaluó primero el efecto in vitro del PD. Se demostró que 0,1  $\mu$ M PD inhibió la estimulación de EPI inducida por a) 10nM MPA ( $p < 0.001$ ) b) 50ng/ml de FGF-2 ( $p < 0.001$ ) c) co-cultivo con CAF ( $p < 0.001$ ), no afectando a las células EPI control (incorporación de 3H-timidina, o recuento de células citoqueratina positivas que incorporaron bromodeoxiuridina (BrdU). **Resultados** similares se obtuvieron en cultivos en 3D en matrigel. Se realizaron 2 estudios in vivo: ratones hembras BALB/c portadoras de tumor sc C4-HI de (20-40 mm<sup>2</sup>) (n= 6) fueron tratadas en forma diaria con PD (25mg/Kg, ip.) o con vehículo. A las 48 hs, 3 ratones por grupo fueron inyectados con BrdU (4 mg/ratón) por dos horas y sacrificados; el resto se sacrificó a los 10 días. Se observó una disminución del crecimiento tumoral en ratones tratados con PD confirmado por una menor incorporación de BrdU ( $P < 0.001$ ). Estos resultados sugieren que los RFGF-2 son un blanco terapéutico a ser considerado en el tratamiento de cáncer de mama endócrino.

**0058. (0811) SPARC MODULA LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES PERO NO LA DE MELANOMA A MENOS QUE SE LES INHIBA LA EXPRESIÓN ENDÓGENA.** E Salvatierra, C Lopez Haber, V Gottifredi, A Llera, F Prada, O Podhajcer

Lab. Terapia Molecular y Celular-F. Instituto Leloir-IIBBA-CONICET

La interacción de la célula con la matriz extracelular-ECM- tiene una profunda influencia en la progresión del cáncer. Así, las células malignas secretan proteínas que llegan a células no malignas vecinas, como fibroblastos y endotelio, y las pueden inducir a proveer el suelo en el cual el tumor crecerá. SPARC, componente de la ECM secretado por diversas fuentes celulares normales y tumorales, afecta la proliferación de diversos tipos celulares, y modula las características de agresividad de las células malignas. Sin embargo, existe confusión en la literatura sobre la naturaleza de los mecanismos moleculares afectados por SPARC, dada la diversidad de respuestas biológicas descriptas como respuesta a la adición de SPARC purificada. Esta variación podría deberse al uso de fuentes de SPARC diferentes, o a diferencias en la susceptibilidad a SPARC de las células tratadas. Para probar esta hipótesis, se purificó SPARC secretada por células de melanoma (hMel-SP) y se comparó su actividad contra preparaciones recombinantes. Se demostró que todas las especies de SPARC son eficaces por igual en inhibir la proliferación, adhesión y migración de células endoteliales normales y transformadas. Descartadas las diferencias debidas a la fuente de SPARC utilizada, se continuó trabajando con hMel-SP. La misma ejerció un efecto bifásico sobre la proliferación de fibroblastos normales y transformados. Sin embargo no produjo ningún efecto en la proliferación de diferentes líneas tumorales derivadas de melanoma, CA de colon o neuroblastoma, con y sin expresión endógena de SPARC. Interesantemente, la disminución de la expresión de SPARC mediante ARNi o antisentido en células de melanoma las sensibilizo a la presencia de hMel-SP disminuyendo su capacidad de proliferación y migración. Dado que no es un mecanismo

general hacia cualquier agente supresor de la proliferación, esto indicaría que las células malignas desarrollan mecanismos que las vuelven resistentes a los efectos de SPARC.

**0059. (0203) PARTICIPACION DE LA PROTEINA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) EN LA PROGRESION TUMORAL Y LA CAPACIDAD METASTASICA DE LAS CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO MURINO LM3.** V Sundblad<sup>1</sup>, RP Carnevale<sup>1</sup>, MC Diaz Flaqué<sup>1</sup>, A Urtreger<sup>2</sup>, CJ Proietti<sup>1</sup>, W Beguelin<sup>1</sup>, C Rosemblit<sup>1</sup>, M Rivas<sup>1</sup>, EH Charreau<sup>1</sup>, R Schillaci<sup>1</sup>, E Bal de Kier Joffe<sup>2</sup>, PV Elizalde<sup>1</sup><sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, <sup>2</sup> Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"

Estudios recientes demuestran que la activación de Stat3 tendría una participación importante en el establecimiento de metástasis. El objetivo del presente trabajo es evaluar la participación de Stat3 en la proliferación celular, en la actividad de proteasas y en el establecimiento de metástasis de las células de carcinoma mamario murino LM3. Las células LM3 fueron transfectadas en forma transiente con una forma dominante negativa de Stat3 (Stat3Y705-F), la cual inhibe la dimerización y la unión de Stat3 endógena al ADN. En ensayos de Western-blot, se observó una disminución en la fosforilación de Stat3 en el residuo tirosina 705, en las células LM3 transfectadas con Stat3Y705-F (LM3-DN) respecto a las células transfectadas con el vector vacío (LM3-pcDNA3.1) y a las células no transfectadas (LM3wt). En ensayos de incorporación de Timidina <sup>3</sup>H, la transfección con Stat3Y705-F inhibió un 49  $\pm$  4% la proliferación respecto a las células LM3-pcDNA3.1, y un 52  $\pm$  5% respecto a las LM3wt. Además, se analizó la regulación de la actividad del activador de plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) mediante zimografías de caseína y plasminógeno, observándose una disminución del 60,1  $\pm$  9,3% de la actividad de uPA en las células LM3-DN respecto a las controles. Finalmente, se evaluó la capacidad de las células LM3-DN de formar metástasis experimentales in vivo, mediante inyección e.v. y recuento de metástasis pulmonares a los 8 días. La expresión de Stat3Y705-F disminuyó el número de metástasis pulmonares respecto a las LM3wt. Nuestros resultados demuestran que Stat3 participa en la progresión tumoral de las células de carcinoma mamario murino LM3 regulando su proliferación, la actividad de uPA, y la capacidad metastásica de estas células.

**0060. (0231) PARTICIPACION DE LA PROTEINA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) EN LA PROLIFERACION DE CELULAS DE CARCINOMA MAMARIO MURINO LM3.** MC Díaz Flaqué, V Sundblad, CJ Proietti, C Rosemblit, W Beguelin, MA Rivas, M Tkach, EH Charreau, R Schillaci, PV Elizalde, RP Carnevale

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET. Buenos Aires. Argentina

Trabajos previos demostraron que en células de cáncer de mama, Stat3 se encuentra constitutivamente activa, favoreciendo la transformación maligna y la progresión tumoral. En el presente trabajo se estudió el rol de Stat3 en la proliferación celular y la expresión de genes involucrados en el crecimiento tumoral, en células de carcinoma mamario murino LM3. Con el objeto de inhibir la expresión de Stat3, se utilizó una estrategia de ARN de interferencia (siRNA). La proliferación de las células LM3 transfectadas con el siRNA, evaluada por ensayos de incorporación de timidina <sup>3</sup>H, disminuyó un 60% respecto de las células LM3 control. Con el fin de establecer los mecanismos de inhibición de la proliferación, se exploraron genes cuya expresión es directamente regulada por Stat3 a través de la presencia de elementos respondedores a Stat3 en sus promotores. La transfección con el siRNA disminuyó los niveles de las proteínas asociadas al crecimiento y progresión tumoral ciclina D1, c-Myc y ErbB-2. Asimismo, se observó una disminución en la expresión de la proteína

antiapoptótica Bcl-x<sub>L</sub>, cuya expresión también se sugiere directamente regulada por Stat3 a través de un elemento respondedor. Estos resultados demuestran la participación de Stat3 en la proliferación de las células de carcinoma mamario LM3, a través de la regulación de la expresión de genes involucrados en el crecimiento y progresión tumoral.

**0061. (0432) LA TERAPIA METRONÓMICA CON CICLOFOSFAMIDA Y CELECOXIB INHIBE EL DESARROLLO DE METÁSTASIS EN RATONES PORTADORES DE UN ADENOCARCINOMA DE MAMA.** LE Mainetti<sup>1</sup>, A Rossa<sup>1</sup>, VR Rozados<sup>1</sup>, OG Scharovsky<sup>1,2</sup>

*1 Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R., 2 Consejo de Investigaciones, U.N.R. \*contribuyeron igualmente*

La terapia metronómica consiste en la administración de drogas en dosis bajas, a intervalos regulares y sin períodos largos de descanso. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la terapia metronómica con ciclofosfamida (Cy) y celecoxib (Cel) sobre el desarrollo de metástasis experimentales. Para ello, ratones de la línea Balb/c, fueron inoculados con una suspensión del adenocarcinoma de mama M-234p vía i.v. En el día 3 los animales, que se distribuyeron en cuatro grupos (G) experimentales (n=10/grupo), recibieron: G1) Testigos: 0,3 ml de diluyente p.o., 5 días/semana; GII) Cy en el agua de bebida con una ingesta diaria de 20 a 30 mg/kg de peso; GIII) Cel, p.o., 30 mg/kg de peso/día, 5 días/semana; GIV) tratamientos GII + GIII. Se extrajo sangre en los días 0 y 30 para evaluar: glóbulos blancos, fórmula leucocitaria, concentración sérica de GOT, GPT, urea y creatinina; se determinó 2 veces/semana el peso corporal. Los animales se sacrificaron en el día 34, momento en que el primero de ellos presentó signos de enfermedad metastásica. El recuento de metástasis pulmonares mostró valores menores en GIV comparado con G1 (p<0.05), siendo su diámetro promedio significativamente menor para GII, GIII y GIV comparado con G1 (p<0.001). Además, GIV presentó metástasis con un diámetro menor que GIII (p<0.05). El peso pulmonar relativo, respecto al peso corporal del animal, no difirió entre los distintos grupos experimentales. No se observaron efectos tóxicos debidos al tratamiento, evaluados a través de parámetros hematológicos y serológicos y de la evolución del peso corporal. Estos resultados sugieren claramente que el esquema terapéutico metronómico, combinando ciclofosfamida y celecoxib, presenta un efecto inhibitorio del desarrollo de metástasis pulmonares de un adenocarcinoma de mama murino. El efecto antimetastásico y la ausencia de toxicidad general observada aumentan la probabilidad de la utilización de este esquema terapéutico a nivel clínico.

## ENDOCRINOLOGÍA I

**0062. (0071) EL ALCOHOL INHIBE LA SECRECIÓN DE CORTICOSTERONA INDUCIDA POR EL ESTRÉS.** CE Mohn, JP Prestifilippo, C de la Cal, J Fernandez-Solari, A De Laurentiis, V Rettori

*Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CONICET-UBA*

Tanto el estrés neurogénico como el endotóxico inducen la activación del eje HHA aumentando la secreción de esteroides adrenales para recuperar la homeostasis. Por otra parte, las situaciones estresoras cotidianas predisponen al consumo de alcohol (EtOH). Por lo cual, estudiamos el efecto del EtOH en las respuestas generadas por un estrés neurogénico, por inmovilización repetitiva (EIR), y/o endotóxico, por LPS, y la participación de mensajeros intraglandulares como el NO y la prostaglandina E (PGE) en dichos efectos. Realizamos experimentos in vivo, en ratas macho Sprague Dawley adultas (n=6-8). Las ratas fueron sometidas a EIR (2hs, dos veces al día/5 días) y/o administradas con EtOH i.g. (3g/kg, 2 veces al día/5 días). Otro grupo fue so-

metido de igual modo y además recibió LPS i.p (50 µg/kg) el último día y fue sacrificado a la hora post inyección. Determinamos la concentración plasmática de corticosterona (B) (RIA) y en las glándulas adrenales (GA) la actividad de la NOS (Arginina14C), el contenido de PGE (RIA) y la actividad de la ciclooxigenasa (COX) (radioconversión, %cpm PGE2 en placa/100mg de tejido). Los datos fueron analizados con test-t de Student o ANOVA según corresponda. El EtOH previno (p<0.01) el aumento plasmático de B inducido por el EIR (p<0.001), y además de disminuir la actividad de la COX (C=19,1±1, EtOH=12,3±1, p<0.01) previno su aumento producido por el EIR (EIR=32,5±3, EIR+EtOH=12,8±1, p<0.001). La inyección i.p de LPS aumentó la B plasmática, el contenido de PGE (p<0.01) y la actividad de la NOS (p<0.001). El EtOH previno tanto el aumento plasmático de B (p<0.001) y de PGE (p<0.001) inducido por el LPS, como el aumento de PGE producido por EIR+LPS (p<0.001). Dado que la PGE2 regula positivamente la liberación de B por la GA, la inhibición de la síntesis de PGE2 inducida por el EtOH sería responsable, al menos en parte, de la atenuación en la respuesta al estrés neurogénico y endotóxico. (PICT 14264).

**0063. (0265) PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATAS CON DIABETES EXPERIMENTAL POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ).** EM Repetto<sup>1</sup>, R Sánchez<sup>1</sup>, JM Cipelli<sup>1</sup>, F Astori<sup>1</sup>, C Martínez Calejman<sup>1</sup>, JM Di Gruccio<sup>1</sup>, PD Cassaglia<sup>1</sup>, GG Piroli<sup>1</sup>, P Arias<sup>2</sup>, CB Cymeryng<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Endocrinología Molecular (LEM) - Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina, UBA / CEFYBO -CONICET, 2 Departamento de Fisiología - Facultad de Medicina - UBA*

**Introducción:** El estrés oxidativo/nitrosativo participa en el desarrollo y la progresión de las complicaciones asociadas a la diabetes. En experimentos previos demostramos un incremento en la actividad de NOS y del transporte de arginina en células adrenales de ratas con diabetes por STZ. **Objetivo:** Evaluar parámetros de estrés oxidativo/nitrosativo y efectos del tratamiento antioxidante sobre el sistema de NO en la corteza adrenal de ratas diabéticas por STZ. **Metodología:** Ratas Wistar adultas diabéticas por STZ (3 dosis ip de 40 mg/kg) recibieron vitamina E (100 mg/kg vo, STZ-VitE) o melatonina (10mg/kg vo de STZ-Mel) o implantes de insulina (STZ-INS). Los animales, incluyendo un grupo control (C), fueron sacrificados a las 1, 2, 4, 6 y 8 semanas de iniciados los tratamientos. En la corteza adrenal se evaluaron actividad de NOS, parámetros de estrés nitrosativo (nitrosotioles), oxidativo (TBARS y carbonilos) y mecanismos de citoprotección (GSH). **Resultados:** En el grupo STZ aumentó la actividad de NOS a partir de la 2da semana. Este incremento no se observó en los grupos STZ-INS y STZ-Vit E (C: 27.3±1.0, STZ: 40.9±1.2, p<0.05 vs C; STZ-Mel: 39.4±1.0, p<0.05 vs C; STZ-VitE: 33.8±0.7 y STZ-INS: 22.9±4.4 pmol/min/mg prot, p<0.01 vs STZ), en concordancia con los valores de nitrosotioles. A partir de la 4ta semana las ratas del grupo STZ presentaron mayores valores de GSH (C: 57.3±12.6; STZ: 123.6±35.7 nmol/mg prot; p<0.05 vs C). No se registraron cambios significativos en los niveles de TBARS o de carbonilos. **Conclusión:** La diabetes por STZ incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno y derivadas del NO en la corteza adrenal, lo que es prevenido por el tratamiento simultáneo con antioxidantes. Es posible que la activación de mecanismos citoprotectores evite un mayor daño al tejido como lo refleja la falta de variación en diversos parámetros oxidativos.

**0064. (0560) LA HISTAMINA COMO MODULADOR DIRECTO DE LA ESTEROIDOGENESIS EN CÉLULAS CÓRTICOADRENALES.** R Pagotto<sup>1</sup>, C Mondillo<sup>1</sup>, B Piotrkowsky<sup>1</sup>, M Besio-Moreno<sup>1</sup>, C Cymeryng<sup>2</sup>, OP Pignataro<sup>1, 3</sup>

*1 IBYME-CONICET, 2 Depto de Bioquímica Humana-Medicina-UBA., 3 Depto de Química Biológica-FCEN-UBA*

Hay muy pocas evidencias en la literatura acerca de los efectos directos de la histamina (HA) sobre la glándula adrenal y en

particular sobre la esteroidogénesis. Resultados de nuestro laboratorio demostraron que la HA puede modular la síntesis de esteroides en células de Leydig de rata adulta y en la línea celular MA-10 (Mondillo et al, 2005 y 2007), a través de receptores específicos de los subtipos 1 y 2 (HRH1 y HRH2). El objetivo de este trabajo fue evaluar un posible efecto directo de HA sobre la esteroidogénesis en células corticoadrenales. Utilizando como modelo experimental la línea celular Y1, derivada de células tumorales corticoadrenales murinas, se determinó la presencia de receptores para HA por medio de ensayos de unión específicos para HRH1 (con  $^3\text{H}$ -pirilamina) y HRH2 (con  $^3\text{H}$ -tiotidina). Los ensayos de unión por saturación indicaron la presencia de HRH1 ( $K_d = 29.24 \pm 12.71 \text{ nM}$  y  $B_{\text{max}} = 55.84 \pm 13.33 \text{ fmol}/10^6 \text{ cél}$ ) y de HRH2 ( $K_d = 9.213 \pm 3.38 \text{ nM}$  y  $B_{\text{max}} = 2.93 \pm 1.05 \text{ fmol}/10^6 \text{ cél}$ ). Para estudiar los efectos de HA sobre la síntesis de esteroides se realizó una curva con concentraciones crecientes de HA ( $10^{-11} \text{ M} - 10^{-5} \text{ M}$ ) en presencia de una concentración de ACTH de 10 mU/ml, y se determinó progesterona (P4: principal esteroide producido) por RIA. Se observó inhibición en la producción de P4 estimulada por ACTH en presencia de una concentración de HA  $10^{-10} \text{ M}$  ( $67 \pm 5.3\%$  respecto a su control) y de concentraciones mayores. Estos datos constituyen la primera evidencia de la presencia de HRH1 y HRH2 en las células corticoadrenales Y1 y sugieren un rol inhibitorio de la HA sobre la esteroidogénesis de este tipo celular. Subsidios: UBA(06-09:X 814), CONICET(PIP-5525), ANPCYT(PICT-2005-5-38281)

**0065. (0542) EXPRESIÓN DE AROMATASA (ARO), RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (ER-ALFA, ER-BETA Y GPR30), RECEPTOR DE INSULINA (IR, ISOFORMAS A Y B) Y SISTEMA IGFs EN TUMORES ADRENOCORTICALES (TA) PEDIÁTRICOS: IMPLICANCIAS EN EL PERFIL HORMONAL Y EN LA PROLIFERACIÓN TUMORAL MS** Baquedano<sup>1</sup>, G Guercio<sup>1</sup>, M Costanzo<sup>1</sup>, N Saraco<sup>1</sup>, C Pepe<sup>1</sup>, E Berensztein<sup>1</sup>, M Dávila<sup>2</sup>, MA Rivarola<sup>1</sup>, A Belgorosky<sup>1</sup>

*1 Servicio Endocrinología. Hospital Garrahan, Buenos Aires, Argentina, 2 Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Garrahan, Buenos Aires, Argentina*

En tejidos adrenales humanos normales (TAHN), los estrógenos participarían en la diferenciación funcional de la zona reticularis (ZR) en la adrenarca. En niños, los TA generalmente son virilizantes, pero se desconoce si los estrógenos están involucrados en la función de la célula adrenal tumoral. El sistema IGFs y IR median proliferación en ciertas células tumorales, pero en TA no existe demasiada evidencia. Se evaluó el perfil de expresión de ARO (parámetro de secreción local de estrógenos), ER $\beta$ , ER $\alpha$ , GPR30, IRA, IRB, IGFs y IGFR1 por RT-PCR relativa en TA virilizantes (TAV) comparado con TAHN. Analizamos 8 TAV (1,3 a 4,4 años) y 29 adrenales normales como grupo control (GC). En función de edad de inicio de adrenarca (aumento de andrógenos adrenales), se subdividieron en 2 grupos: GC1, 3m a 6a, n=17 y GC2 > 6a, n=12. La expresión de ARNm de ARO, ER $\alpha$  y GPR30 fue mayor en TAV ( $1.48 \pm 0.24 \text{ UA}$ ;  $1.43 \pm 0.38$  y  $1.67 \pm 0.43$ ) que en GC1 ( $1.03 \pm 0.43$ ;  $0.79 \pm 0.28$  y  $1.00 \pm 0.11$ ),  $p < 0.05$  y similar a GC2. ER $\alpha$  fue indetectable. En cultivo de células H295R, E2 estimuló DHEAS e inhibió cortisol y ICI182,780 (antagonista ER $\beta$ ) inhibió este efecto. En TAV, el ARNm de IR, isoformas A ( $1.93 \pm 0.34$ ) y B ( $1.39 \pm 0.28$ ) fue mayor que en GC1 ( $1.19 \pm 0.44$  y  $1.34 \pm 0.35$ ) y GC2 ( $0.52 \pm 0.50$  y  $0.86 \pm 0.43$ ),  $p < 0.05$  y el ARNm de IGFR1 ( $2.14 \pm 0.43$ ) fue mayor que en GC1 ( $1.43 \pm 0.4$ ) y similar a GC2,  $p < 0.05$ . El ARNm de IGF1 ( $0.68 \pm 0.34$ ) fue menor que en GC1 ( $1.26 \pm 0.42$ ) y el de IGF2 ( $1.38 \pm 0.21$ ) fue similar a GC1 y 2. Se observó correlación positiva entre peso tumoral y ARNm de IGFR1 y IRB ( $r = 0.87$  y  $r = 0.75$ ,  $p < 0.05$ ) y entre IGFR1, IRB y IRA (correlación múltiple de Pearson). Dado la capacidad de IGFR1 y IR de heterodimerizar y la muy débil expresión de IGF-R1 en ZR sugerimos que IGFR1 y IR/IGFR1 participarían en la proliferación tumoral. Los estrógenos locales, en forma semejante a lo que ocurre en TAHN, jugarían un rol en el perfil de secreción hormonal tumoral vía ER $\beta$ .

**0066. (0645) ROL DE LA INMUNOFILINA DE ALTO PESO MOLECULAR FKBP51 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN ADIPOCÍTICA.** S Guber, MD Galigniana, G Piwien Pilipuk

*Fundación Instituto Leloir – Instituto de Investigaciones Bioquímicas Buenos Aires – CONICET*

Los glucocorticoides son potentes inductores de la adipogénesis, lo que se evidencia por el aumento de adiposidad visceral en pacientes con hipercorticoidismo. Para ejercer su acción, los glucocorticoides se unen a su receptor (GR) el cual forma complejos con hsp90, hsp70, p23 y una inmunofilina (IMM): FKBP51, FKBP52, PP5 ó, minoritariamente, Cyp40. Las IMMs participan en la regulación del complejo hormona-receptor, sin embargo, nada se sabe acerca de su rol durante la adipogénesis. Por lo tanto, investigamos los niveles de expresión y la distribución subcelular de IMMs durante la diferenciación adipocítica de los fibroblastos 3T3-L1. Encontramos que los niveles de hsp90, hsp70 y Cyp40 permanecen estables a lo largo de la diferenciación. Llamativamente, el nivel de expresión de FKBP51 aumenta alcanzando máxima expresión en el adipocito, mientras que los niveles de FKBP52 disminuyen progresivamente. Analizamos por inmunofluorescencia indirecta la distribución subcelular de FKBP51 y FKBP52. En 3T3-L1, FKBP51 se localiza en las mitocondrias, mientras que FKBP52 se distribuye en citoplasma y núcleo. Durante las primeras 24 hs de inducida la adipogénesis, FKBP51 transloca al núcleo donde colocaliza con GR. Análisis por Western blot de las fracciones mitocondriales, citoplasmáticas y nucleares de 3T3-L1, también demuestran que, luego de gatillarse la adipogénesis, FKBP51 disminuye en la fracción mitocondrial aumentando en la nuclear. La diferenciación adipocítica se induce por tratamiento de las células con dexametasona, insulina, e isobutilmetilxantina (IBMX). Sólo IBMX, agente que aumenta los niveles de AMP cíclico, induce la translocación de FKBP51 a núcleo. Ensayos de gen de reporte demuestran que IBMX o forskolina disminuyen la capacidad transcripcional de GR. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el aumento transitorio de FKBP51 en el núcleo inducido por AMPc participaría en la regulación de la actividad transcripcional de GR durante la adipogénesis.

**0067. (0650) LA EXPOSICIÓN PRENATAL A BISFENOL A (BPA) ALTERA EL MICRO AMBIENTE ENDOCRINO EN LA GLÁNDULA MAMARIA DE LA RATA.** M Durando, V Perdomo, VL Bosquiazzo, EH Luque, M Muñoz de Toro

*Lab de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral*

Previamente demostramos que la exposición in utero a BPA altera el desarrollo normal de la glándula mamaria (GM). Describimos aumento de la relación proliferación/apoptosis, aumento de la angiogénesis, mayor incidencia de lesiones pre-neoplásicas y reacción desmoplásica. Las hormonas ováricas estrógenos (E) y progesterona (P) son esenciales para mantener la plasticidad del desarrollo postnatal de la GM. Nuestro objetivo fue investigar si la exposición prenatal a BPA modifica el micro ambiente endocrino de la GM. Ratas Wistar recibieron desde el día (d) 8 de gestación hasta el parto: vehículo (control) o BPA ( $25 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ ). Las crías hembras se sacrificaron a los 50 d de edad durante el diestro. Por RIA medimos la concentración sérica de  $17 \beta$ -estradiol (E2) y P. Por inmunohistoquímica seguido de análisis digital de imágenes cuantificamos la expresión del receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ), RP y del co-represor SMRT (mediador del silenciamiento del receptor de ácido retinoico y tiroideos) en el parénquima de GM. Los animales expuestos a BPA presentaron menores niveles séricos de P ( $p < 0.05$ ) asociados con una disminución de su receptor (RP) ( $p < 0.05$ ) y un aumento de la expresión del SMRT ( $p < 0.05$ ). La expresión del RE $\alpha$  y los niveles séricos de E2 no fueron diferentes entre los grupos experimentales. Los resultados demuestran que hay menor expresión del RP asociada a mayor expresión del co-represor SMRT, junto con menores niveles cir-

culantes de P. Esto sugiere que la GM a los 50 d en hembras expuestas a BPA presenta una respuesta estrogénica disminuida y un menor estímulo de P. Esta alteración en el micro ambiente endocrino sería responsable de los cambios histofuncionales descritos en la GM de hembras expuestas prenatalmente a BPA.

**0068. (0266) EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS ADRENAL, IMPLICANCIAS DE ROS Y SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE NO Y CO.** F Astort<sup>1</sup>, EM Repetto<sup>1</sup>, C Martínez Calejman<sup>1</sup>, ME Mercáu<sup>1</sup>, M Besio Moreno<sup>2</sup>, O Pignataro<sup>2</sup>, CB Cymering<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de endocrinología molecular (LEM) – Departamento de bioquímica humana – Facultad de Medicina – Universidad de Buenos Aires – CEFYBO – CONICET., 2 IBYME – CONICET*

**Introducción:** La diabetes afecta el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal provocando aumentos en la secreción de ACTH y de esteroides en plasma. A su vez, se vio una desensibilización de la respuesta al ACTH a nivel adrenal. Este fenómeno podría deberse al estrés oxidativo provocado por la hiperglucemia. En este sentido, se ha relacionado el estrés oxidativo con el desarrollo y progresión de las complicaciones vasculares asociadas a la diabetes. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la hiperglucemia sobre la esteroideogénesis adrenal en la línea celular adrenocortical murina (Y1). Protocolo experimental: Las células se incubaron con concentraciones elevadas de glucosa (30 mM: HG) durante 24 hs o 7 días. Se usó RIA para determinar esteroides en el medio. **Resultados:** El tratamiento con HG produjo alteraciones en diversos parámetros de estrés oxidativo como ROS, TBARS, GSH y tioles. La producción de glucocorticoides disminuyó significativamente (HG24h: 1,03 y HG7d: 0,99 vs. 1,61 ng/ml, control;  $p < 0,01$ ) y se observó un incremento significativo en los niveles de ARNm (RT-PCR semicuantitativo) y proteínas (western blot) para la isoforma inducible HO-1 (24h y 7d). Por otro lado, se observó una disminución en el uptake de L-arginina (HG24h: 793 y HG7d: 733 vs. 1157 pmol/min/mg, control;  $p < 0,05$ ) y en la producción de nitritos (HG24h: 8,66 y HG7d: 9,36 vs. 11,97 umoles/mg prot, control;  $p < 0,01$ ), parámetros de la actividad de óxido nítrico sintasa. **Conclusiones:** Las alteraciones provocadas por HG sobre el equilibrio redox, los sistemas antioxidantes y los de producción de NO y CO correlacionan con una disminución en la producción de esteroides basal. En suma, los resultados obtenidos en células adrenales aisladas reproducen algunos de los efectos observados en animales diabéticos. Las diferencias obtenidas en cuanto a la esteroideogénesis sugieren la participación de factores adicionales en la modulación de la función adrenal en esta patología.

**GASTROENTEROLOGÍA I/FARMACOLOGÍA I**

**0069. (0393) EP-CAM ES UN MARCADOR DE CÉLULAS TRONCALES/PROGENITORAS HEPÁTICAS EN FETOS DE RATÓN.** JH Torres Fuenzalida, AS Lorenti

*ICBME, Hospital Italiano de Buenos Aires*

Durante el desarrollo embrionario del hígado, las células troncales hepáticas dan origen a los hepatoblastos, los progenitores bipotenciales que, a su vez, dan origen a hepatocitos y colangiocitos. En el adulto estas células troncales son las encargadas de la regeneración hepática luego de un daño grave y/o reiterado. Descritas hace más de 50 años, aun no es posible identificarlas como una población única ni siquiera dentro de una misma especie. Lo más cerca que se ha llegado es a definir un compartimiento de células troncales/progenitoras (CTPH) que expresan una variedad de marcadores compartidos con células hepáticas maduras y con células hematopoyéticas. Esto dificulta su aislamiento y estudio. Ep-CAM (molécula de adhesión celular epitelial) es una proteína primero identificada como un antígeno tumor-específico y que ahora se acepta como un marcador de li-

naje epitelial, la cual está presente en células troncales hepáticas humanas. Thy1 es un marcador de células troncales restringido a células capaces de auto-renovarse. **Materiales y Métodos:** Hígados de fetos de ratones C57BL/6 de 14.5 dpc fueron digeridos con colagenasa. Células Ep-CAM+ fueron aisladas utilizando perlas magnéticas unidas a anticuerpos específicos (MACS). Luego fueron cultivadas sobre placas cubiertas con colágeno 4, en medio D-MEM: F12 suplementado. **Resultados:** El hígado fetal de ratón contiene células Ep-CAM+. Las células Ep-CAM+ forman colonias in-vitro y co-expresan Thy1. **Conclusión:** Ep-CAM es un marcador de células troncales/progenitoras hepáticas en ratón, así como ya se ha demostrado en humanos. La utilización de anticuerpos anti-Ep-CAM nos permitió identificar y aislar las CTPH de una forma rápida y con una alta eficiencia. El próximo paso es caracterizar citológica y molecularmente esta población para diseccionar algún o algunos marcadores que nos permitan definir inequívocamente a las CTPH y posteriormente evaluar su potencial uso en terapias celulares para el tratamiento de afecciones hepáticas.

**0070 (0207) EL KNOCKDOWN DE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINA-8 INHIBE LA SECRECIÓN CANALICULAR DE AGUA EN CÉLULAS HEPG2.** MC Larocca, LR Soria, RA Marinelli

*Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, CONICET, Universidad Nacional de Rosario*

La formación de la bilis canalicular depende del transporte osmótico de agua a través del hepatocito. En estudios previos demostramos que aquaporina-8 (AQP8) se expresa en la membrana canalicular de hepatocitos de rata y que sus niveles proteicos se correlacionan con la permeabilidad osmótica al agua de la misma. Sin embargo, no existe evidencia concluyente sobre el rol de AQP8 en la secreción de agua al canalículo. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la disminución en la expresión de AQP8 sobre la secreción canalicular de agua en células derivadas de hepatocitos humanos (HepG2). Los estudios de PCR, inmunoblotting y microscopía confocal indicaron que AQP8 se expresa en células HepG2, localizándose en vesículas intracelulares y en membrana canalicular. Usando ARN de interferencia generamos células AQP8- con niveles de expresión proteica de AQP8 significativamente disminuidos (-60% a -80%). El análisis morfométrico indicó que las células AQP8- poseen un volumen canalicular disminuido respecto a las controles (C) ( $C: 113 \pm 11 \mu m^3$ , AQP8-:  $34 \pm 4 \mu m^3$ ;  $p < 0,01$ ). Analizamos los cambios en el volumen canalicular de estas células en condiciones que favorecen el pasaje de agua hacia el canalículo. El análisis de las imágenes obtenidas por microscopía de contraste de fase indicó que la exposición a un gradiente osmótico de -200 mosM provocó un rápido aumento del volumen canalicular en células C (+ 46%;  $p < 0,01$ ), pero no en las AQP8-. Del mismo modo, la incubación durante 5 min con el agente colerético dibutiril AMP cíclico indujo una expansión canalicular en células C (+31%;  $p < 0,01$ ), que no se observó en las AQP8-. Estos resultados indican que la expresión de AQP8 es necesaria para el transporte osmótico de agua al canalículo, y son coherentes con la hipótesis que postula que AQP8 media la secreción canalicular de agua, y que, por lo tanto, una disminución en sus niveles proteicos conduce a una secreción biliar defectuosa.

**0071. (0734) CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD DE LA GLUTAMINO SINTETASA EN CORTEZA PREFRONTAL E HIPOCAMPO EN RATAS HIPERTENSAS PORTALES PREHEPÁTICAS.** S Tallis<sup>1</sup>, K Balestrasse<sup>2</sup>, MG Cheluja<sup>1</sup>, F Eizayaga<sup>1</sup>, S Romay<sup>1</sup>, DM Roselló<sup>1</sup>, CT Coll<sup>1</sup>, A Lemberg<sup>1</sup>, ML Tomaro<sup>2</sup>, JC Perazzo<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Hipertensión Portal, Cát. de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

**Introducción:** La hipertensión portal es una de las principales complicaciones de la cirrosis, la cual forma parte de las enfermedades de mayor incidencia a nivel hepático. Según demostramos en trabajos anteriores la Encefalopatía Hepática subclínica asociada a la Hipertensión Portal cursa con disminución del uptake de glutamato, hiperamonemia, y alteraciones morfofuncionales: astrogliosis con angiogénesis. La Glutamina Sintetasa (GS) es una enzima de localización exclusivamente astrocitaria, y la única vía de metabolización del glutamato a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), la cual se halla involucrada en la depuración de amonio. **Objetivos:** Estudiar la actividad de la glutamina sintetasa en dos regiones Corteza Prefrontal e hipocampo en ratas hipertensas portales prehepáticas. **Materiales y Métodos:** Se utilizaron 14 ratas Wistar, machos (250-300 g), divididas en dos grupos: Hipertensas portales (n=7), a través de una estenosis calibrada de la vena porta y Controles (n=7) con operación simulada. Se estudiaron dos zonas del SNC: Corteza prefrontal e hipocampo. Luego de 14 días se sacrificaron y se midió la actividad de la GS espectrofotométricamente, en dichas zonas. **Resultados**

	μ mol/mg de proteína
Hipocampo Control*	51.4 ± 5.5
Hipocampo HP*	98.4 ± 8.5
Corteza prefrontal Control*	78.9 ± 6.3
Corteza prefrontal HP*	46.9 ± 7.7

(X ± SD; \*p<0.001)

**Conclusiones:** La actividad de la GS se ve significativamente aumentada en hipocampo y disminuida en corteza prefrontal en ratas hipertensas portales prehepáticas. Esto sugiere distintos mecanismos adaptativos como respuesta a la disminución del uptake de glutamato, y a la hiperamonemia evidenciada en este modelo.

**0072. (0462) 7,8-DIHIROXI-4-METILCUMARINA INDUCE APOPTOSIS MODULANDO DISTINTAS VIAS DE SEÑALIZACION EN CELULAS LEUCEMICAS.** ME Riveiro<sup>1,2</sup>, R Vazquez<sup>1</sup>, N Gomez<sup>2,3</sup>, A Moglioni<sup>3</sup>, A Baldi<sup>1</sup>, C Davio<sup>2</sup>, C Shayo<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME, 2 Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA, 3 Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA

La utilización de agentes pro-apoptóticos es una opción promisoría para el tratamiento de leucemias humanas. Previamente, estudiamos la relación estructura-actividad de hidroxycumarinas, describiendo que los grupos oxidrilos fenólicos libres son necesarios para la actividad apoptótica en la línea celular promonocítica U937. Asimismo, determinamos que la producción de radicales libres estaría implicada en dicha actividad. Con el objetivo de profundizar sobre el mecanismo de acción de la hidroxycumarina 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (DHMC) en la inducción de apoptosis, evaluamos distintas vías de señalización relacionadas a la apoptosis en células hematopoyéticas. DHMC induce apoptosis en U937 y HL60 (líneas leucémicas p53 negativas), en forma dosis y tiempo dependiente, determinado por fragmentación de ADN y tinción nuclear con Hoescht 33342 e iodo de propidio; presentando mayor citotoxicidad en células leucémicas que en monocitos normales. DHMC 250 μM induce luego de 3 h una disminución de los niveles de pro-caspasa 3 y un incremento de caspasa 3 y de PARP clivada (western blot). Los niveles de c-Myc disminuyen a las 3 h mientras que los de p21<sup>WAF1/CIP1</sup> se incrementan a las 6 h (western blot). El pretratamiento con el antioxidante N-acetil-L-cisteína retrasó la disminución de los niveles de c-Myc hasta las 24 h. DHMC modula en forma tiempo dependiente la vía de MAPKs y PI3K/Akt., observándose activación de la vía de JNK e inactivación de las vías de ERK y de Akt, sin modificar la vía de p38 (western blot con anticuerpos para las proteínas fosforiladas y totales). Estos resultados indican que DHMC modula las vías de ERK, JNK y Akt, los genes c-myc y p21<sup>WAF1/CIP1</sup> induciendo apoptosis de manera caspasa dependiente posiblemente debido a generación de radicales libres. La in-

ducción de apoptosis independiente de p53 señala a las hidroxycumarinas como apropiados prototipos farmacológicos para el desarrollo de nuevos agentes para el tratamiento de leucemias.

**0073. (0257) MANEJO HEPÁTICO, INTESTINAL Y RENAL DEL XENOBIÓTICO 1-CLORO-2,4-DINITROBENCENO (CDNB) EN RATAS TRATADAS CON ETINILESTRADIOL (EE).**

SSM Villanueva, ML Ruiz, A Arias, MG Luquita, JM Pellegrino, VA Catania, AD Mottino

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET) - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario).

Los estrógenos inducen colestasis reduciendo tanto el flujo biliar dependiente de sales biliares como el independiente de sales biliares. Esto último se lo atribuyó en parte a una alteración a nivel pos transcripcional de Mrp2, proteína involucrada en la excreción canalicular de xenobióticos conjugados. La presencia de este transportador en la membrana apical de enterocitos y células renales puede representar caminos alternativos para la excreción de dichas sustancias en condiciones de colestasis. El presente estudio evaluó el efecto del tratamiento con el estrógeno sintético EE (5 mg/kg s.c./5 días consecutivos) en ratas Wistar macho adultas sobre la expresión y actividad de Mrp2 en hígado, yeyuno y corteza renal (n=3-4). La expresión de Mrp2, evaluada por western blotting, disminuyó en hígado (-46%) e intestino (-91%) en EE respecto de los controles (C) (p<0.05), mientras que permaneció inalterada en riñón. La actividad de Mrp2 fue evaluada in vivo, por administración de 30 μmoles de CDNB/kg i.v. y posterior detección de los derivados dinitrofenil glutation (DNP-SG) y dinitrofenil cisteinilglicina (DNP-CG) por HPLC. La excreción acumulativa (μmoles en 90 min/g tejido) resultó disminuida en bilis en EE (0.174±0.029) respecto de C (0.383±0.060) (p<0.05), en perfusado intestinal (perfusión con buffer PBS, 0.4 ml/min) no se modificó en EE (0.038±0.005) respecto de C (0.034±0.002) y, por el contrario, aumentó en orina en EE (0.877±0.106) respecto de C (0.310±0.036), p<0.05. Se estudió además el contenido tisular de DNP-SG a los 5 min pos-inyección de CDNB, el cual disminuyó en hígado (-29%) y aumentó en intestino (+87%) y en corteza renal (+86%) del grupo EE respecto de C (p<0.05). Los resultados indican que ante una deficiente actividad depuradora hepática, los riñones cumplirían un rol compensador, facilitando la excreción de xenobióticos hidrofóbicos en condiciones de colestasis, contrariamente al intestino cuyo rol sería mínimo en dicha patología.

**0074. (0317) MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) POR ETINILESTRADIOL (EE) EN EL EPITELIO INTESTINAL.** A Arias, SSM Villanueva, ML Ruiz, MG Luquita, VA Catania, AD Mottino

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET) - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario).

Mrp2 es un transportador de membrana apical de epitelios secretores que se asocia a enzimas de biotransformación de fase II para eliminar derivados conjugados de xenobióticos, desconociéndose el efecto del estrógeno sintético EE sobre su expresión y actividad en el epitelio intestinal. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas tratadas con EE a una dosis diaria de 5 mg/kg (EE) o con su solvente (C), administrados s.c. durante 5 días. La expresión de Mrp2, evaluada por western blotting en membranas aisladas de ribete en cepillo de yeyuno proximal, mostró una disminución del 91% en EE respecto de C, p<0.05 (n=3). También se evaluaron posibles efectos de deslocalización subcelular por microscopía de fluorescencia confocal, sin observarse modificaciones en EE. La actividad transportadora de Mrp2 se ensayó in vitro en saquitos intestinales aislados, en presencia de una solución 100 μM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno del lado seroso y se midió por HPLC la aparición de dinitrofenil-glutation (DNP-SG, sustrato específico de Mrp2 generado endógenamente) en el lí-

quido mucoso. Se observó disminución de la excreción acumulativa del conjugado (nmoles/30 min x g tejido) en EE (36,4±12,7) respecto de C (147,0±65,4),  $p < 0.05$  (n=3). La medición de la actividad de la enzima Glutathion S-transferasa en citosol permitió descartar una falla en la formación de DNP-SG en el grupo EE. Por último, se evaluó la capacidad de Mrp2 como barrera contra la absorción de su sustrato específico en saquitos intestinales evertidos, que se incubaron en presencia de DNP-SG 100  $\mu$ M del lado mucoso. Los resultados (nmoles/30 min x g tejido) indicaron un aumento en la acumulación serosa del sustrato de Mrp2 en EE (124,1±30,4) respecto de C (13,2±2,7),  $p < 0.05$  (n=3). En conclusión, la expresión y actividad intestinal de Mrp2 se ven afectados en el tratamiento con EE, con una consecuente disminución en la capacidad de actuar como barrera de permeabilidad frente a xenobióticos dietarios o drogas.

**0075. (0620) EFECTO DEL UROGUANYLIN (UGN), UN AGONISTA ENDÓGENO DE LA TOXINA TERMOESTABLE DE ESCHERICHIA COLI, SOBRE EL PH INTRACELULAR Y LA SECRECIÓN DE FLUIDO EN UN MODELO CELULAR DE INTestino HUMANO.** R Toriano<sup>1</sup>, MA Curto<sup>2</sup>, M Parisi<sup>3</sup>

*1 Lab. de Biomembranas, Dpto. de Fisiología y Biofísica, Fac. de Medicina, UBA., 2 Lab. de Biol. Mol. de la Enfermedad de Chagas, INGENI, UBA-CONICET, 3 Unidad de Biomembranas, Univ. Favaloro.*

Los intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) constituyen una familia de genes que codifican para diferentes isoformas que se localizan de manera diferencial en las distintas membranas celulares. En el caso particular del intestino de mamíferos NHE, además de ser actor principal en la regulación del pH intracelular (pHi) interviene en la absorción de Na<sup>+</sup> y, por ende, en el movimiento transepitelial de fluido (Jw). Los objetivos de este trabajo fueron: a) elucidar la expresión y localización de las posibles isoformas de NHE presentes en las células T84 y b) estudiar la acción de UGN sobre el pHi y el Jw. Las diferentes técnicas utilizadas en este estudio (microscopía electrónica, RT-PCR y Western Blot (WB), espectrofluorometría y mediciones de Jw y parámetros eléctricos) nos permitieron responder las preguntas planteadas. La actividad de NHE en la membrana basolateral se inhibió tanto en ausencia de Na<sup>+</sup> seroso, cuanto en presencia de EIPA ( $p < 0.001$  vs control, en ambos casos). La presencia de HOE-694 en la misma membrana tanto 1  $\mu$ M cuanto 10  $\mu$ M, inhibió la recuperación del pHi ( $p < 0.02$  vs control). Con las mismas condiciones, del lado apical, se observó: en ausencia de Na<sup>+</sup> una ligera recuperación del pHi, aunque diferente del control ( $p < 0.01$ ); en presencia de EIPA, una inhibición de la recuperación del pHi ( $p < 0.001$ ) y en presencia de HOE-694, solo 10  $\mu$ M fue capaz de inhibir la recuperación del pHi ( $p < 0.001$ ). En presencia de UGN, el pHi mostró una fuerte alcalinización y el Jw secretor aumentó significativamente ( $p < 0.001$  vs control). Los resultados reseñados más los de RT-PCR y WB nos permitieron concluir que: 1) Las células T84 poseen actividad de NHE, tanto en la membrana apical en la que se localiza NHE2, cuanto en la basolateral que expresa NHE1. 2) Ambas isoformas juegan roles diferentes en T84: NHE1 es la principal responsable de mantener el pHi del estado estacionario, y NHE2 esta implicada fundamentalmente en la homeostasis de Na<sup>+</sup>.

**0076. (0272) ROL DE LAS ISOFORMAS CA<sup>2+</sup>-DEPENDIENTES DE PROTEÍNA QUINASA C (CPKC) EN LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRADIOL 17 $\beta$ -D-GLUCURÓNIDO (E17G) EN LA RATA.** FA Crocenzi<sup>1</sup>, EJ Sánchez Pozzi<sup>1</sup>, ML Ruiz<sup>1</sup>, AE Zucchetti<sup>1</sup>, MG Roma<sup>1</sup>, AD Mottino<sup>1</sup>, M Vore<sup>2</sup>

*1 Instituto de Fisiología Experimental, CONICET-UNR, Argentina, 2 Graduate Center for Toxicology, University of Kentucky, E.E.U.U.*

E17G induce colestasis aguda en la rata debido en parte a endocitosis de las bombas exportadoras canaliculares de sales biliares (Bsep) y de otros aniones orgánicos (Mrp2). Dado que se demostró que la activación de cPKC afecta la formación de bilis

y la localización de transportadores canaliculares, evaluamos el rol de cPKC en las alteraciones colestásicas inducidas por E17G. Se perfundieron hígados aislados de ratas hembras, adicionándose al perfusato el inhibidor selectivo de cPKC Gö6976 (500 nM). Evaluamos los cambios inducidos por E17G en el flujo biliar, la excreción total de glutathion (GSH) y de tritio-taurocolato (TC). Se recogió bilis antes y después de administrar E17G (2  $\mu$ mol, intraportal). E17G indujo una disminución rápida (20 min) del flujo biliar (-61%) y de la excreción biliar de GSH (-62%) y de TC (-79%) ( $p < 0.05$  vs basal). Gö6976 previno parcialmente la disminución del flujo biliar (-15%), de la excreción de GSH (-23%) y de la excreción de TC (-20%;  $p < 0.05$ ). En otro grupo de animales se tomaron muestras de hígado a los 20 min de administrado E17G para evaluar la localización de Bsep y Mrp2 por inmunofluorescencia confocal. Este estudio demostró endocitosis de Bsep y Mrp2, la cual fue totalmente prevenida por Gö6976. Para evaluar si E17G indujo activación de cPKC, un cultivo primario de hepatocitos fue expuesto a E17G (50  $\mu$ M) durante 5-20 min. La activación (translocación a membranas) de una isoforma de cPKC (PKC $\alpha$ ) y de una isoforma de PKC calcio-independiente (PKC $\epsilon$ ) se evaluó por western blotting de fracciones citosólica y de membrana total. E17G incrementó un 60% la PKC $\alpha$  unida a membrana a los 5 min ( $p < 0.05$ ), persistiendo por 15 min y retornando a valores basales a los 20 min. E17G no modificó la proporción de PKC $\epsilon$  unida a membrana. Concluimos que E17G activa selectivamente cPKC en minutos, y que estas isoformas cumplen un rol central en esta colestasis por un mecanismo que involucra endocitosis de transportadores canaliculares.

## VISIÓN Y OFTALMOLOGÍA I

**0077. (0625) RESPUESTA DE LA PROLIFERACIÓN VITREORETINAL AL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES ENDOTELINÉRGICOS.** M Iribarne, AV Torbidoni, MM Castañeda, AM Suburo

*Facultad de Cs Biomédicas, Universidad Austral*

**Introducción:** En la PVR se produce una intensa remodelación glial. Previamente demostramos que los astrocitos expresan normalmente endotelina-1 (ET-1) y el receptor endotelinergico B (ETR-B) y que ambos se sobre-expresan en la PVR experimental del ratón. En consecuencia, estudiamos el efecto de tezosentan, un bloqueante de receptores endotelinergicos, sobre los fenómenos característicos de la PVR: plegamientos retinales y crecimiento de membranas epi- y subretinales. **Métodos:** Se indujo PVR en ratones C57Bl/6 (n=20) mediante inyección intravítrea de dispa. Los ratones recibieron 10 mg/kg/día de tezosentan (salina, en los controles). Los ratones fueron sacrificados una semana después. Se obtuvieron cortes seriados para obtener muestras de toda la retina. Todos los cortes fueron clasificados (en forma ciega) según la presencia de los siguientes signos de PVR: plegamiento de la retina, membrana epiretinal, tamaño de la membrana epiretinal, membrana subretinal. Los datos fueron transformados en una escala numérica y analizados estadísticamente mediante ANOVA de dos vías y post-tests de Bonferroni. **Resultados:** Los animales controles presentaron grandes desprendimientos y plegamientos retinales, así como extensas membranas epi- y subretinales. Los animales tratados con tezosentan mostraron una significativa reducción del plegamiento retinal y crecimiento de membranas epiretinales. No se detectaron diferencias en las membranas subretinales.

Lesiones	Salina	Tezosentan
Pliegues retinales	0.73 ± 0.13	0.14 ± 0.07
Membranas epiretinales	0.78 ± 0.22	0.10 ± 0.07
Membranas subretinales	0.62 ± 0.13	0.41 ± 0.14

**Conclusión:** Demostramos que tezosentan redujo el plegamiento de la retina y el crecimiento de membranas epiretinales. El bloqueo de los receptores endotelinergicos probablemente re-

duciría la activación glial, disminuyendo así los cambios fenotípicos característicos de la PVR.

**0078. (0139) MODELO EXPERIMENTAL DE UVEÍTIS FELINA.** MJ Del Sole<sup>1</sup>, PH Sande<sup>2</sup>, AE Felipe<sup>1</sup>, D Fernandez<sup>2</sup>, MA Aba<sup>1</sup>, RE Rosenstein<sup>2</sup>

*1 Laboratorio de Fisiología del Sistema Nervioso y Endocrinología, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina, 2 Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEFyBO, Conicet, Buenos Aires, Argentina.*

La uveítis es una de las principales causas de ceguera en gatos, que mayoritariamente se asocia a enfermedades sistémicas prevalentes. Los tratamientos actuales para la uveítis felina son sólo relativamente efectivos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo experimental de uveítis en gatos. Para ello, se realizó una inyección intravítrea (i.v.) de 30 µg de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en un ojo de 7 gatos y vehículo en el contralateral (día 0). Se realizó un examen oftalmológico durante 45 días, a cada signo clínico se le asignó un puntaje de acuerdo a su intensidad y se evaluó la suma de estos parámetros (score). La presión intraocular (PIO) se determinó hasta el día 25 por tonometría. Entre los días 2 y 28 se extrajeron muestras de humor acuoso (HA) de ambos ojos y se determinó la concentración de proteínas (Lowry) y el número de células infiltradas. El día 30 se realizaron electroretinogramas (ERG) escotópicos. El estudio histopatológico se efectuó en 2 animales sacrificados a los 45 días. Sólo los ojos inyectados con LPS desarrollaron signos clínicos de uveítis. El score clínico alcanzó valores máximos durante 12 días y permaneció elevado hasta el día 45 ( $p < 0.01$ , respecto al control en todos los intervalos). En los ojos inyectados con LPS, la PIO fue significativamente menor hasta el día 12 ( $p < 0.01$ ), la concentración de proteínas en el HA fue mayor a lo largo de todo el estudio ( $p < 0.01$ ) y se observó un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en el número de células en el HA en los días 2 y 7 ( $p < 0.01$ , y  $p < 0.05$ , respectivamente). Las amplitudes de las ondas a y b del ERG fueron significativamente menores en los ojos inyectados con LPS ( $p < 0.01$ ) y se observó una pérdida marcada de fotorreceptores e infiltración celular en las capas medias de la retina. Estos resultados indican que la inyección i.v. de LPS provoca alteraciones clínicas, bioquímicas, funcionales y estructurales que reproducen aspectos centrales de la uveítis felina.

**0079. (0657) SOBREEXPRESIÓN DE ENDOTELINA-1: IMPACTO EN LA RETINA MURINA.** V Torbidoni<sup>1</sup>, F Amiri<sup>2</sup>, EL Schiffrin<sup>2</sup>, AM Suburo<sup>1</sup>

*1 Facultad de Ciencias Biomédicas - Universidad Austral, Argentina, 2 Sir Mortimer B. Davis-Jewish General Hospital, Canada*

**Introducción:** Endotelina-1 (ET-1) es un péptido producido por el endotelio y diversas células neuronales y gliales. Previamente demostramos que en la retina los astrocitos almacenan gran cantidad de ET-1 y además expresan el receptor B (ETR-B). Estudiamos ahora la retina de ratones con sobreexpresión endotelial de ET-1, para evaluar si la mayor disponibilidad de ET-1 modifica los niveles de ET-1 en los astrocitos y/o afecta a otras células de la retina. **Métodos:** Los ratones C57BL6/J transgénicos contenían la secuencia codificante para Prepro-ET-1 regulada por el promotor de Tie-2, específico del endotelio. Se estudiaron ojos fijados de ratones TG (n=8) y WT (n=9). En cada caso se evaluó la expresión de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y ET-1 mediante inmunohistoquímica cuantitativa, en preparaciones enteras y cortes transversales de retina. **Resultados:** En los animales WT se detectó el patrón normal de expresión de GFAP y ET-1 en los astrocitos perivasculares. En las retinas TGs se observó hipertrofia de los astrocitos y sus prolongaciones, demostrándose un aumento significativo en el área de inmunoreactividad para ET-1 y GFAP.

Los cortes transversales mostraron aumento e hipertrofia de las prolongaciones astrocíticas perivasculares positivas para ET-1 y para GFAP. Además, mostraron activación de las células de Muller en los márgenes ciliares de la retina. **Conclusiones:** El aumento de la inmunoreactividad ET-1 indica que los astrocitos de los animales TGs almacenarían más ET-1 que en los WT. Sin embargo, la actividad de captación astrocitaria no sería suficiente para proteger completamente a la retina, tal como lo demuestra la activación de las células de Müller.

**0080. (0226) EL LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO COMO INDICADOR DE PROTECCIÓN FRENTE AL DAÑO ISQUÉMICO RETINIANO.** PJ Franco<sup>1</sup>, DC Fernandez<sup>1</sup>, PH Sande<sup>1</sup>, D Saenz<sup>1</sup>, JO Croxatto<sup>2</sup>, RE Rosenstein<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de neuroquímica retiniana y oftalmología experimental, depto de bioquímica, Facultad de Medicina, UBA, 2 Laboratorio de patología ocular, Fundación Oftalmológica Argentina*

La isquemia es un componente central de diversas enfermedades retinianas, como la retinopatía diabética, la trombosis de la vena central de la retina e incluso el glaucoma, que constituyen las causas más frecuentes de ceguera irreversible. Al presente, no se dispone de estrategias eficaces para la prevención o terapéutica del daño isquémico retiniano. Frente a esta vacancia terapéutica, se ha sugerido como estrategia alternativa y/o complementaria, el uso de mecanismos endógenos de neuroprotección. El preconditionamiento isquémico (PI) es un mecanismo de resistencia transitoria frente a una injuria isquémica deletérea, que se produce como consecuencia de la aplicación previa de un insulto moderado/subletal y de corta duración. Se ha demostrado que el tratamiento con dosis subumbrales de lipopolisacárido bacteriano (LPS) reduce la injuria cerebral inducida por hipoxia-isquemia. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del LPS como estrategia de protección isquémica retiniana. Para ello, se inyectó LPS (0.1, 1, 5 µg) intravítrea en un ojo y vehículo en el contralateral de ratas Wistar macho adultas. Luego de 24 h, ambos ojos se sometieron a isquemia severa (por hipertensión ocular de 130 mm Hg durante 45 min). A los 7 días de la isquemia, se evaluó la función retiniana por electroretinografía (ERG) y la histología retiniana. Los resultados (tabla) indican que la dosis de 0.1 µg de LPS careció de efecto, la de 1 µg redujo y la de 5 µg aumentó el daño isquémico retiniano. Los resultados funcionales correlacionaron con la histología retiniana.

	Onda b del ERG
Control	308±20
Isquemia	85±14**
Isquemia + 0.1 µg LPS	79±10**
Isquemia + 1 µg LPS	281±25
Isquemia + 5 µg LPS	20±3**

\*\*  $p < 0.01$  vs control.

Estos resultados indican que una dosis subumbral de LPS induce tolerancia isquémica. La caracterización de este fenómeno permitirá desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de la isquemia retiniana.

**0081. (0162) ESTUDIO DEL EFECTO DE LA NEUROTOMÍA ÓPTICA RADIAL SOBRE LA NEUROPATÍA GLAUCOMATOSA.** N Belforte<sup>1</sup>, PH Sande<sup>1</sup>, DC Fernandez<sup>1</sup>, HJ Aldana<sup>2</sup>, RE Rosenstein<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Depto de Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA, 2 Universidad de Morón*

El glaucoma de ángulo abierto es una disfunción ocular prevalente, caracterizada por la pérdida progresiva de las funciones visuales que correlaciona con la muerte de células ganglionares retinianas y excavación papilar con atrofia de la cabeza del nervio óptico. En nuestro laboratorio, hemos desarrollado

un modelo experimental de glaucoma en ratas a través de la administración semanal de ácido hialurónico (AH) en la cámara anterior del ojo. Las inyecciones de AH inducen aumento de la presión intraocular (PIO), una disfunción retiniana progresiva y una pérdida significativa de células ganglionares y de fibras de la cabeza del nervio óptico. La neurotomía óptica radial (NOR), una estrategia quirúrgica que se utiliza para el tratamiento de la trombosis de la vena central de la retina, consiste en la sección en profundidad de la cabeza del nervio óptico, con el objeto de descomprimir el canal escleral y mejorar el flujo sanguíneo arterial y venoso. El objetivo de este trabajo fue analizar los beneficios terapéuticos de la NOR en el modelo de glaucoma experimental en ratas inducido por AH. Se inyectó semanalmente AH (25 µl, 10 mg/ml) en la cámara anterior de ambos ojos de ratas Wistar macho adultas. A las 3 semanas de hipertensión ocular se realizó la NOR en un ojo de cada animal y en el ojo contralateral se realizó una operación simulada. Se evaluó la función retiniana (por electroretinografía escotópica y determinación de potenciales occipitales evocados (VEP)) y se cuantificó el número de células ganglionares en ambos ojos a las 10 semanas de tratamiento. La NOR redujo la caída en la amplitud de la onda a ( $p<0.05$ ) y b ( $p<0.05$ ) del ERG, en la onda 4 del VEP ( $p<0.01$ ) y en el número de células ganglionares ( $p<0.05$ ). Estos resultados indican que la NOR revertió las alteraciones histológicas y funcionales inducidas por hipertensión ocular y avalan la potencialidad del uso de la NOR como nueva estrategia quirúrgica en el tratamiento del glaucoma.

**0082. (0604) ESTUDIO TEMPORAL DEL EFECTO DE LA ASFIXIA PERINATAL EN LA EPIRETINA Y LA APLICACIÓN DE HIPOTERMIA COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA.** M Rey Funes, ME Ibarra, CF Loidl

*Instituto de Biología Celular y Neurociencia "Prof. De Robertis" Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

La asfixia perinatal (AP) puede dejar secuelas en la epirretina, región muy sensible a la hipoxia-isquemia, que comprende las capas de células ganglionares, fibras del nervio óptico y membrana limitante interna. En estudios previos utilizando un modelo de AP (por inmersión transitoria de fetos a término en agua), hemos observado gliosis y neovascularización. En este trabajo, evaluamos los cambios en la glía epirretinal a lo largo del tiempo en 3 grupos experimentales; controles (CTL), grupo AP (agua a 37°C) y grupo HIP (AP en condiciones de hipotermia en agua a 15°C). Los animales fueron sacrificados a los 21, 30 y 60 días de vida, enucleados y sus retinas procesadas para inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para la proteína glifibrilar ácida (GFAP). Además, se realizó morfometría midiendo el espesor de la capa limitante interna y su densidad óptica relativa (DOR) utilizando el programa ScionImage. En el grupo AP se observó en los tiempos estudiados un aumento significativo del espesor y la DOR, al ser comparado con los grupos CTL e HIP. Se observó leve inmunorreactividad para GFAP en la limitante interna y glía perivasculares en el CTL e HIP, mientras que en AP fue significativamente mayor, evidenciándose además reacción en los procesos internos de las células de Müller. Estos resultados demuestran que en AP, tanto el espesor de la epirretina como la inmunomarcación para GFAP, aumentan en el tiempo. Así, la marca es positiva en la limitante interna y glía perivasculares a los 21 días, extendiéndose a los procesos internos de Müller a los 60 días. Estas alteraciones no se evidenciaron en el grupo HIP, por lo que este trabajo avala nuevamente el potente efecto protector de la hipotermia como estrategia terapéutica para abolir y/o disminuir el daño por retinopatía hipoxico-isquémica.

**0083. (0164) LA MELATONINA PRESERVA LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATO-OCULAR EN UN MODELO DE UVEÍTIS EXPERIMENTAL EN EL HÁMSTER.** DC Fernández<sup>1</sup>, PH Sande<sup>1</sup>, HJ Aldana<sup>2</sup>, RE Rosenstein<sup>1</sup>, D Sáenz<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina, 2 Universidad de Morón, Buenos Aires, Argentina*

En trabajos previos, hemos desarrollado un modelo de uveítis experimental en el hámster dorado a través de la administración intravítrea de lipopolisacárido (LPS), que reproduce características centrales de la uveítis humana. La disrupción de la barrera hemato-ocular es un aspecto clave en el desencadenamiento del proceso inflamatorio característico de la uveítis. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del pretratamiento con melatonina (Mel) sobre las alteraciones retinianas en el modelo experimental de uveítis. Para ello, se inyectó 1 µg de LPS en un ojo de hámsteres dorados macho y vehículo en el ojo contralateral. Un grupo de animales recibió el implante de un pellet subcutáneo de Mel (5 mg), 2 h antes de la inyección de LPS o vehículo. Se determinó la concentración de proteínas (método de Lowry) y el número de células en el humor vítreo, el grado de hemorragia (tinción con alizarin red S) y el estado de la barrera hemato-retiniana interna y externa mediante el análisis de la traza de lantano. A las 24 h de la inyección, el LPS provocó un aumento significativo en la extravasación de células y proteínas en el cuerpo vítreo, y en el grado de hemorragia retiniana, respecto al control ( $P<0.01$ ). La Mel redujo significativamente todos estos parámetros ( $P<0.01$  vs. LPS). El tratamiento con Mel previno el daño ultraestructural de las barreras hemato-retiniana interna y externa causado por LPS. La microscopía electrónica indicó una marcada alteración estructural de los segmentos externos de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario, a los ocho días de la inyección de LPS. La administración de Mel preservó en forma evidente la estructura celular retiniana. En suma, estos resultados indican que el tratamiento con Mel redujo significativamente las alteraciones provocadas por el LPS en una fase temprana y tardía de la inflamación. Por lo tanto, la Mel podría ser considerada una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de la uveítis.

## NEFROLOGÍA I

**0084. (0165) EL ÓXIDO NITRICO Y LA EDAD MODULAN LA REABSORCIÓN TUBULAR DE AGUA DURANTE EL ESTADO HIPOVOLÉMICO.** A Fellet<sup>1</sup>, N Arreche<sup>1</sup>, JJ Lopez Costa<sup>2</sup>, M Lopez<sup>2</sup>, C Arranz<sup>1</sup>, AM Balaszczuk<sup>1</sup>

*1 Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 2 Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

El óxido nítrico (NO) está involucrado en la patogenia del shock hemorrágico. Previamente, demostramos que la activación heterogénea y dependiente del tiempo de la óxido nítrico sintasa estaría involucrada en la regulación cardiovascular luego de una hemorragia aguda. Dado que el envejecimiento está asociado a cambios fisiológicos que afectan la capacidad de mantener el balance hídrico, nuestra hipótesis es que el NO renal dispararía una respuesta adaptativa dependiente de la edad luego del inducido el estado hipovolémico. **Objetivo:** Evaluar el efecto del NO sobre los canales de agua AQP2 en ratas de 2 meses y 12 meses de edad sometidas a hemorragia. **Métodos:** Grupos de animales (n=8): C:control; H:hemorragia del 20% volemia; L:infusión de L-NAME (1mg/kg iv seguido de 0.5 mg/kg.h iv=100µl/h); LH:infusión de L-NAME+hemorragia. A los 120 min del sangrado, se estudió la expresión (Western Blot) y la inmunoreactividad de AQP2 (inmunofluorescencia-confocal). La localización de AQP2 se determinó mediante la inmunomarcación con partículas de oro y la observación con microscopía electrónica. **Resultados:** La H aumentó la expresión de AQP2 en ratas jóvenes y adultas. La inmunomarcación se localizó en el citoplasma de las células de los túbulos colectores de los animales sometidos a la H. El L-NAME aumentó los niveles proteicos de AQP2, encontrándose

éstos asociados a la membrana apical en ratas jóvenes; en ratas adultas se asociaron a vesículas intracelulares. El L-NAME aumentó la expresión de AQP2 inducido por la H. Este aumento fue más evidente en ratas jóvenes que en adultas. Conclusiones: El NO estaría involucrado en la expresión y redistribución de las AQP2 en respuesta a la hemorragia tanto en ratas jóvenes como adultas. La pérdida aguda de sangre desencadenaría un mecanismo adaptativo dependiente de la edad modulando la reabsorción de agua en los túbulos colectores renales.

**0085. (0209) ROL DEL POLIPÉPTIDO TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS OATP1 EN LA ELIMINACIÓN RENAL DE BROMOSULFOFTALEÍNA (BSF) EN RATAS CON COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA.** A Brandoni, AM Torres

Área Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. CONICET.

Se han demostrado modificaciones en la expresión hepática de Oatp1 en diferentes modelos de colestasis en ratas. Oatp1 se expresa también en riñón, en membrana apical de células del segmento S3 del túbulo proximal. Entre los sustratos de este transportador se encuentra BSF, anión orgánico de excreción preferencial biliar. En ratas con colestasis extrahepática (CEH) hemos descrito una menor depuración sistémica de BSF, habiéndose evidenciado un aumento en la cantidad de este anión excretado en orina, de manera tal de compensar la deficiencia excretora hepática existente en estos animales. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar, mediante técnicas convencionales, el clearance renal de BSF y la expresión renal de Oatp1 en ratas con CEH de 21 h (n= 6). Se procesó, además, un grupo de ratas Sham (S, n= 6). Se determinaron las cargas ( $\mu\text{g}/\text{min}/100\text{g p.c.}$ ) excretadas (C.E.) y secretadas (C.S.), y el clearance renal (Clr,  $\mu\text{L}/\text{min}/100\text{g p.c.}$ ) de BSF. Se evaluó la abundancia (%) renal de Oatp1 en homogenados (h) y en membranas apicales (m) mediante electroforesis y Western Blotting. Además se realizó un estudio de inmunohistoquímica para Oatp1 en tejido renal. C.E.: S=  $0.039 \pm 0.007$ , CEH=  $1.180 \pm 0.130^*$ ; C.S.: S=  $0.006 \pm 0.005$ , CEH=  $0.518 \pm 0.065^*$ ; Clr: S=  $13.53 \pm 2.42$ , CEH=  $24.39 \pm 2.69^*$ ; Oatp1(h): S=  $100 \pm 5$ , CEH=  $94 \pm 5$ ; Oatp1(m): S=  $100 \pm 3$ , CEH=  $131 \pm 6^*$  (\* $p < 0.05$ ). El estudio de inmunohistoquímica reveló un aumento en la expresión de Oatp1 en membrana apical de células de túbulo proximal de ratas colestásicas. En trabajos anteriores hemos demostrado un aumento en la expresión de algunos transportadores basolaterales involucrados en la secreción renal de BSF. El aumento observado, en este trabajo, en la expresión renal de Oatp1 en membranas apicales de ratas con CEH contribuiría, junto al proceso de captación basolateral, al aumento detectado en la eliminación renal de BSF, demostrando así un componente apical importante involucrado en esta respuesta.

**0086. (0390) RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D1 REDUCEN LA EXPRESIÓN DE NADPH-DIAFORASA (NADPH-D) EN MÁCULA DENSA (MD) DE RATAS CON DIETA HIPERSÓDICA.** ME Ibarra<sup>1</sup>, CF Loidl<sup>1</sup>, L Di Ciano<sup>2</sup>, M Rey Funes<sup>1</sup>, JJ López Costa<sup>1</sup>, V De Luca Sarobe<sup>2</sup>, EE Arrizurieta<sup>2</sup>, FR Ibarra<sup>2</sup>

1 Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E de Robertis", Facultad de Medicina, UBA, 2 Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, Facultad de Medicina, UBA

La dopamina (DA) renal y la óxido nítrico sintasa (NOS) son importantes reguladores de la hemodinamia renal y la excreción hidroelectrolítica. La dieta hipersódica aumenta la producción renal de DA y disminuye la expresión de NADPH-d en mácula densa (índice de actividad de nNOS, SAIC 2006). Este trabajo explora la vinculación entre ambos sistemas. Material y Métodos: se estudiaron 4 grupos de ratas Wistar de 250-300 g pc. Control (C); HiperNa<sup>+</sup> (Na<sup>+</sup>) NaCl 1% en agua de bebida por 5 días; C+SCH 23390 (CS) bloqueante específico de receptores dopaminérgicos D1, 1 mg/kg 3 dosis por día, (días 4 y 5) y Na<sup>+</sup>+SCH 23390 (Na<sup>+</sup>S). Resultados: (X $\pm$ ES, ajustados por 100g pc) C, DA urinaria (UDAV)  $569 \pm 60$  ng/d; diuresis (V)  $3.83 \pm 0.24$  ml/d; UNa<sup>+</sup>V

$0.1 \pm 0.009$  mEq/d; filtrado glomerular (FG)  $0.60 \pm 0.08$  ml/min; flujo plasmático renal (FPR)  $2.37 \pm 0.28$  ml/min; FF  $0.23 \pm 0.01$ ; NADPH-d en MD  $44.9 \pm 1.99$  UDO, nNOS en MD  $50 \pm 2$  UDO, presión sistólica (PAS)  $104 \pm 5$  mmHg. En el grupo Na<sup>+</sup> UDAV  $1162 \pm 170$ , ( $p < 0.05$  vs C), V  $8.33 \pm 1.95$  ( $p < 0.05$  vs C), UNa<sup>+</sup>V  $2.53 \pm 0.28$  ( $p < 0.01$ ), FG  $0.46 \pm 0.04$ , FPR  $2.13 \pm 0.3$ , FF  $0.21 \pm 0.02$ , NADPH-d  $24.76 \pm 1.55$  ( $p < 0.01$  vs C), nNOS sin cambios, PAS  $103.5 \pm 4.9$ . En el grupo Na<sup>+</sup>S: V y UNa<sup>+</sup>V disminuyeron 50% vs Na<sup>+</sup>, el FG, FPR y FF aumentaron a  $0.78 \pm 0.06$ ,  $2.93 \pm 0.21$  y  $0.29 \pm 0.02$ , respectivamente (todos  $p < 0.05$  vs Na<sup>+</sup>) y NADPH-d  $49.27 \pm 1.92$  ( $p < 0.01$  vs Na<sup>+</sup>), nNOS sin cambios y PAS  $93.05 \pm 7.97$ . En CS solo disminuyó UNa<sup>+</sup>V a  $0.05 \pm 0.05$  ( $p < 0.05$  vs C). Conclusión: en dieta hipersódica la DA renal cumpliría un doble rol aumentando la excreción hidroelectrolítica y disminuyendo la actividad de nNOS (expresada por NADPH-d) en MD mediante receptores D1. De esta forma contribuye en la regulación a largo plazo del feedback tubuloglomerular y la hemodinamia renal.

**0087. (0730) DIMORFISMO SEXUAL EN EL SISTEMA KALIKREÍNA KININA RENAL. MODULACIÓN POR ALDOSTERONA Y HORMONAS SEXUALES.** NL Corbera, PJ Azurmendi, FR Ibarra, RS Martin, EM Oddo, EE Arrizurieta

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA

Estudios previos efectuados en nuestro laboratorio han mostrado que la gonadectomía prepuberal (Gx) disminuye la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) e induce un aumento, aldosterona dependiente, de la kalikreína urinaria (KU) demostrado tras la administración de bloqueantes específicos. Para profundizar el conocimiento sobre los mecanismos que regulan la actividad del sistema kalikreína kinina se estudió en animales de la misma cepa y de distinto sexo, en un diseño similar, el contenido renal de kalikreína (KR) y la síntesis de kalikreína (KLK). La mitad de los animales se gonadectomizaron al destete y tanto los animales controles como los Gx se estudiaron a las 12 semanas de vida tomándose muestras de orina de 24hs para medir KU y de corteza renal para determinar KR y KLK usando los métodos amidolítico y de RT-PCR, respectivamente. En las ratas SHR la KU (nKat/d/100g pc) fue mas alta en hembras que en machos enteros:  $44.8 \pm 2.43$  vs  $29.4 \pm 1.92$  ( $p < 0.05$ ) aumentando tras la Gx a  $91.4 \pm 5.73$  y  $89.4 \pm 4.86$  ( $p < 0.01$ , en ambos casos), respectivamente. KR (nkat/g riñón) en cambio, fue más bajo en hembras enteras que en machos:  $8.6 \pm 0.02$  vs  $21.8 \pm 2.07$  ( $p < 0.05$ ). Después de la Gx, los niveles de KR no fueron diferentes entre machos y hembras. KLK (expresado como la relación kalikreína/ $\beta$ -actina) fue mas alta en hembras intactas que en machos:  $0.82 \pm 0.012$  vs  $0.60 \pm 0.027$  ( $p < 0.01$ ) y no se observaron cambios significativos después de la Gx. Se observó que la KU, KR y KLK eran diferentes en hembras y machos denotando la existencia de un dimorfismo sexual en el sistema kalikreína kinina. Al desaparecer dicho dimorfismo después de la Gx es posible sugerir que, además de la ya conocida influencia de la aldosterona, las hormonas sexuales podrían también participar en la modulación del sistema.

**0088. (0219) DIFERENCIA LIGADA AL SEXO EN LA EXPRESIÓN RENAL DE LOS TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS, OAT1 Y OAT3, EN RATAS ADULTAS TARDÍAS.** A Brandoni, AM Torres

Área Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. U.N.R. CONICET.

En ratas adultas tardías se han descrito diferencias relacionadas al sexo en los parámetros cinéticos de transporte renal del anión orgánico modelo p-aminohipurato (PAH), tanto en membrana basolateral como apical de células del túbulo proximal. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la expresión de los transportadores basolaterales OAT1 y OAT3, involucrados en la secreción renal de PAH en ratas Wistar de 365 días de edad, machos (M, n= 5) y hembras (H, n= 5). Mediante técnicas convencionales de clearance, se determinó la carga excretada de PAH (C.E. PAH,  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{g}$  riñón). A partir de corteza renal se pre-

pararon homogenados. Además se obtuvieron membranas basolaterales por técnica de centrifugación diferencial y gradiente de Percoll. Se estudiaron las expresiones (%) de OAT1 y OAT3 en homogenados corticales (h) y en membranas basolaterales (m) mediante técnica de electroforesis y Western Blotting. Se obtuvieron los siguientes resultados: C.E. PAH: M= 231 ± 10, H= 181 ± 5\*; OAT1(h): M= 100 ± 6, H= 30 ± 3\*; OAT1(m): M= 100 ± 6, H= 62 ± 8\*; OAT3(h): M= 100 ± 5, H= 60 ± 6\*; OAT3(m): M= 100 ± 5, H= 79 ± 3\* (\*p<0.05). En comparación a las ratas macho, las hembras adultas tardías presentaron una disminución en las abundancias de OAT1 y OAT3 en membrana basolateral, donde estos transportadores son funcionales. Además se encontró una disminución en la expresión de ambas proteínas en los homogenados corticales de las ratas hembras. Esto indicaría una disminución en la síntesis y/o un aumento en la degradación tanto de OAT1 como de OAT3. Las hembras también presentaron una disminución en la excreción renal de PAH. Esta diferencia se podría explicar a expensas de una disminución en el proceso de secreción del anión que se debería, al menos en parte, a una diferencia en la captación basolateral dada por la disminución detectada en la expresión de los transportadores estudiados.

**0089. (0184) ESPACIOS PERITONEALES: VALORES DE SUS SUPERFICIES VISCERAL, PARIETAL Y TOTAL.** AM Albanese<sup>1</sup>, EF Albanese<sup>1</sup>, JH Miño<sup>1,2</sup>, EE Gómez<sup>1</sup>, M Gómez<sup>1</sup>, AB Merlo<sup>1</sup>

*1 Facultad de Medicina. Universidad del Salvador, 2 Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA*

El conocimiento de los valores de superficie de cada espacio de la cavidad peritoneal puede ser útil en la diálisis y en el tratamiento de procesos infecciosos o tumorales. No hallamos en la bibliografía tales valores. **Objetivo:** Determinar la superficie de los espacios que componen la cavidad peritoneal y sus respectivas porciones visceral y parietal. **Material y método:** En 10 cadáveres femeninos (edad media±ES 75.88 ± 2.99 años) sin patología abdominal, fijados en formaldehído y sin evisceración, se midió la superficie peritoneal de los espacios por un método desarrollado en nuestro laboratorio (Medicina 66:165-66, 2006). **Resultados:** Los valores se expresan como media±ES. La superficie peritoneal total fue de 14323.62±824.37 cm<sup>2</sup>. La de cada espacio y su contribución al total fue: Visceral o Retroepiploico (RE) 7767.82±646.70 cm<sup>2</sup> y 53.70±1.65%; Previsceral o Preepiploico (PE) 1637.05±110.24 cm<sup>2</sup> y 11.45±0.54%; Subfrénico derecho (SFD) 1078.32±68.85 cm<sup>2</sup> y 7.67±0.57%; Subhepático izquierdo (SHIZ) 1009.01±50.51 cm<sup>2</sup> y 7.12±0.30%; Subfrénico izquierdo (SFIZ) 828.58±48.22 cm<sup>2</sup> y 5.87±0.37%; Subhepático derecho (SHD) 790.69±37.92 cm<sup>2</sup> y 5.64±0.36%; Transcavidad (TC) 780.85±48.90 cm<sup>2</sup> y 5.49±0.27%; Pelviano (P) 431.30±41.62 cm<sup>2</sup> y 3.06±0.3%. Los aportes porcentuales visceral y parietal al peritoneo total fueron: 78.76±1.06 y 21.24±1.06 y la de cada espacio: RE 64.77±1.62 y 12.25±1.14; PE 8.66±0.45 y 21.76±1.38; SFD 4.86±0.42 y 18.08±1.07; SHIZ 6.54±0.37 y 9.41±0.61; SFIZ 3.15±0.31 y 16.12±1.12; SHD 2.78±0.26 y 16.26±0.54; TC 6.31±0.27 y 2.59±0.55; P 2.93±0.33 y 3.53±0.42. **Conclusiones:** El trabajo aporta los valores de superficie de los espacios peritoneales. Uno de los ocho, el Visceral o Retroepiploico, con casi 2/3 de superficie visceral, que contiene las asas del intestino delgado, representa más del 50% de la superficie peritoneal total, mientras que cerca del 60% de peritoneo parietal total lo aportan los espacios Subfrénicos y Subhepáticos.

**0090. (0068) SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE LA PROSTACICLINA SINTASA EN RIÑÓN DE RATAS COLINA-DEFICIENTES.** VC Denninghoff<sup>1,2</sup>, GP Ossani<sup>1</sup>, A Avagnina<sup>2</sup>, B Elsnér<sup>2</sup>, AJ Monserrat<sup>1</sup>

*1 Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, 2 Servicio de Patología. CEMIC.*

La colina cumple diversas funciones en los organismos vivos. Ratas macho recién destetadas, alimentadas con dieta deficiente

en colina (CD), con aceite de maíz (AM) y aceite vegetal hidrogenado (AVH) como lípidos, desarrollan insuficiencia renal aguda (IRA) dentro de los siete días posteriores a iniciada dicha alimentación carencial, pudiendo morir como consecuencia del daño renal. La patogenia de la IRA por CD es controvertida, uno de los mecanismos patogénicos propuestos es el vasomotor. La prostaciclina es una de las moléculas que regula el tono vascular. Diferentes autores describen una relación entre el Número Variable de Repeticiones en Tandem (VNTR) en la región promotora del gen de la prostaciclina sintasa (prPGIS) y diferentes patologías. El objetivo fue verificar la secuencia del prPGIS. Se purificó ADN a partir de riñón incluido en parafina de 10 ratas Sprague-Dawley (SD) alimentadas con dieta CD con AM y AVH: 6/10 murieron por IRA y 4/10 sobrevivieron a los 21 días y al ser sacrificadas tenían reparación renal. Se amplificó mediante PCR un fragmento del prPGIS con primers diseñados para flanquear el VNTR de secuencia: PGIS F (5'-CGCCTCCCCAATCCCCTCTC-3') y PGIS R (5'-CGGCTCAGCAGCAGCAGCAA-3'). Para verificar la presencia de dicho VNTR, se secuenciaron los fragmentos de PCR obtenidos. No encontramos diferencias entre los alelos encontrados en la población de ratas que murieron por IRA y aquellas que sobrevivieron a los 21 días y al ser sacrificadas tenían reparación renal. La secuencia encontrada concordó con NCBI Reference Sequences: NW\_047660.1 (Rattus norvegicus chromosome 3 genomic contig, reference assembly). La secuencia obtenida del prPGIS confirma la presencia del VNTR en ratas y de ello se desprende que no existe relación entre la reparación renal de la IRA inducida por con dieta deficiente en colina, en la rata SD, y las variaciones en la secuencia de la región 5' del gen de la prostaciclina sintasa.

**0091. (0780) LA MELATONINA ATENÚA LA ACTIVIDAD PRO-OXIDANTE DEL ALUMINIO (AL) SOBRE TEJIDO RENAL: INFLUENCIA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ATPASA NA/K.** S Mahieu, M Contini, F Zacarias, M Gonzalez, N Millen

*Laboratorio Investigaciones Fisiológicas Experimentales (LIFE). UNL*

En trabajos previos hemos demostrado que la intoxicación crónica con Al en ratas machos induce un aumento en la excreción urinaria de agua y Na, así como estrés oxidativo en tejido renal. Nuestro objetivo fue estudiar la protección ejercida por la melatonina (MEL) durante un tratamiento prolongado con lactato de aluminio. Se trabajó con ratas Wistar machos distribuidas en 4 grupos (c/u n=6): Control (C), MEL (vía ip con melatonina: 10 mg/Kg peso, 5 días por semana, por 3 meses), Al (0,62 mg Al/100 g peso, vía ip, 3 veces por semana, por 3 meses) y Al+MEL. Se efectuaron balances de agua y sodio, y obtuvo la capacidad de concentración urinaria con DDAVP. Se determinó la actividad de enzimas en membranas plasmáticas totales (ATPasa Na/K y GGT) y parámetros vinculados al estrés oxidativo (LPO: lipoperoxidación, GSH: glutatión, GSH-Px: glutatión peroxidasa, GR: glutatión reductasa y CAT: catalasa). El Al aumenta la actividad ATPasa Na/K (umol Pi/ h/mg prot.). C: 18.4±0.69; MEL:19.23±0.86; Al:25.53±0.58\*; Al+MEL:20.65±0.30 la excreción urinaria de Na y la concentración sérica de Aldosterona. Además reduce la capacidad para concentrar la orina: [U]osm (mOsm/Kg agua) C: 2413± 74; Mel 2519± 45; Al 1876± 63\* MEL+Al 2062 ± 50\*. El Al aumenta la LPO con reducción de GSH y de la actividad de GSH-Px, sin cambios significativos en GR y CAT. La MEL estimula la actividad de GSH-Px, GR, CAT y el contenido de GSH, con reducción de la LPO. Se observa además la normalización de la actividad de ATPasa Na/K y de los niveles de aldosterona, si bien persiste el aumento en la excreción de sodio y el defecto en la concentración urinaria. Nuestros resultados sugieren que la MEL por sus efectos antioxidantes protege contra el daño oxidativo inducido por el Al, si bien no tiene efecto sobre las funciones renales de excreción de agua y sodio.

**0092. (0250) EFECTO DE LA ENDOTELINA-3 SOBRE LA EXPRESIÓN Y TRANSLOCACIÓN DE ACUAPORINA-2 EN MÚDULA RENAL DE RATA.** MF Albertoni Borghese, MP

Majowicz, MR Passalacqua, RG Fiorenzano, C Josefkowicz, MC Ortiz, NA Vidal

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

Se investigó el efecto de la endotelina-3(ET3) sobre la expresión y translocación de acuaporina-2(AQP2) en médula renal de rata (MR). Las MR provenientes de ratas Wistar machos se dividieron en 6 grupos, se cortaron en slices y se incubaron a 37° C durante una hora según: A: Control (Krebs), B: ET3 (0.09 µM), C: BQ610 (0.55 µM), D: ET3 + BQ610, E: BQ788 (1 µM) y F: ET3 + BQ 788. Los inhibidores se agregaron 15 minutos antes que la ET3. Luego de la incubación, el tejido se homogeneizó en un buffer apropiado; las proteínas se separaron electroforéticamente y se transfirieron a membranas de PVDF sobre las que se realizó un western blot para detectar AQP2 y determinar si al incubar con ET3 se producían cambios en la expresión de la proteína. El efecto de ET3 sobre la translocación de AQP2, se determinó midiendo AQP2 en vesículas apicales (HD) y subapicales (LD) obtenidas mediante centrifugación diferencial. Las proteínas de las muestras fueron separadas electroforéticamente y transferidas a membranas de PVDF para detectar AQP2 por western blot. Los inmunoblots se cuantificaron analizando la DO de las bandas y determinando la relación HD/LD. ET3 aumentó los niveles de AQP2 (1.00 ± 0.12 vs 2.14 ± 0.24 para A y B respectivamente). El aumento se revirtió mediante la incubación con BQ610, bloqueante específico de los receptores ETA (D: 0.936 ± 0.20), pero no se vio afectado por la incubación previa con BQ788, bloqueante específico de los receptores ETB (F: 2.29 ± 0.55\*). Los antagonistas no tuvieron efecto por sí mismos sobre la expresión de AQP2 (1.19 ± 0.16 y 0.97 ± 0.14 para C y E respectivamente) \*p<0.05 vs A. ET3 no produjo cambios significativos en la translocación de AQP2 hacia membrana (0.41±0.06 vs 0.49±0.13; n=6). **Conclusiones:** ET3 aumentaría la expresión de AQP2 in vitro por medio de los receptores ETA, pero no produciría cambios en la distribución de la proteína entre la membrana plasmática y las vesículas intracelulares.

**0093. (0551) ESTADO DE ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA FASE AGUDA DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO.**  
V Ferraris<sup>1</sup>, L Fernández Abuyé<sup>2</sup>, JR Ferraris<sup>1</sup>, CF Mendez<sup>2</sup>

1 Sección de Nefrología Pediátrica, Hospital Italiano de Buenos Aires, 2 Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas. Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se caracteriza por microangiopatía trombótica, lesiones isquémicas y fallo renal. Niveles aumentados de estrés oxidativo (EO) se detectan durante la evolución de diversas enfermedades y se ha postulado su participación en el fallo renal agudo y crónico. El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el estado de EO y su evolución durante el curso del SUH. Se realizó la determinación plasmática del grado de peroxidación lipídica (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBARS) y la capacidad antioxidante no enzimática total (TRAP) diariamente durante la fase aguda del SUH de 18 pacientes y de individuos sanos (control). TBARS se determinó fluorométricamente y TRAP a partir de la quimioluminiscencia inducida por un dador de especies activas del oxígeno usando un análogo de la vitamina E (Trolox) como estándar. Los valores de TBARS reflejaron la evolución del SUH con valores al ingreso y alta significativamente mayores que los registrados en controles (1,3 ± 0,2 y 1,3 ± 0,1 vs. 0,48 ± 0,1 µM respectivamente, p<0,01). Los valores de TRAP resultaron elevados al ingreso, permanecieron elevados durante el curso del SUH retornando a valores normales al alta (675 ± 51; 657 ± 60 y 325 ± 33 al ingreso, máximo y alta respectivamente vs. control 317 ± 30, µM Trolox, p<0,01). Demostramos un aumento en los niveles de EO en la fase aguda del SUH producido por un desbalance entre la injuria oxidativa y las defensas antioxidantes no enzimáticas, sugiriendo que la determinación de parámetros relacionados con el EO podría ser útil como marcador de la severidad de la enfermedad.

**0094. (0384) ALTERACIONES RENALES INDUCIDAS POR LA DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC DURANTE EL CRECIMIENTO.** C Arranz<sup>1</sup>, A Tomat<sup>1</sup>, C Vallone<sup>2</sup>, L Veiras<sup>1</sup>, E Prentki Santos<sup>1</sup>, S Finella<sup>1</sup>, F Inserra<sup>1</sup>, AM Balaszczuk<sup>1</sup>, MA Costa<sup>1</sup>

1 Cát. Fisiología, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA. IQIMEFA-CONICET, 2 IUCLS, Fundación Barceló

La deficiencia moderada de zinc durante el crecimiento post destete aumenta la presión arterial, altera la función renal en el adulto, disminuye la actividad del sistema del óxido nítrico y aumenta el estrés oxidativo sistémico. **Objetivo:** Estudiar los efectos de la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y crecimiento post-destete sobre la presión arterial sistólica (PAS), función y morfología renal y estrés oxidativo renal. Ratas Wistar recibieron desde la preñez y durante la lactancia: Dieta baja (B, 8 ppm zinc) o Dieta control (C, 30 ppm zinc). Las crías macho recién destetadas de B y C continuaron con: dieta baja (Cb y Bb) o dieta control (Cc y Bc) durante 60 días. Se determinó: PAS, clearance de creatinina (Ccr), proteinuria y, en riñón: fibrosis (α-actina), células apoptóticas (TUNEL), TBARS, superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT) y morfología. **Resultados:** Bb y Bc mostraron signos de fibrosis renal. Se detectó mayor número de células apoptóticas en los grupos con deficiencia (Cb=20.9±5.4\*;Bc=14.1±4.2\* y Bb= 50.3±4.1\* & ; Cc=5.2±2.8). \*p<0.01 vs Cc; #p<0.001 vs Cb; &p<0.01 vs Bc. **Conclusión:** La deficiencia de zinc durante el crecimiento disminuiría la superficie de filtración renal y el volumen de filtrado glomerular con el consecuente aumento de la presión arterial. La activación de mecanismos apoptóticos y el aumento del estrés oxidativo podrían explicar las alteraciones morfológicas observadas

	Cc	Cb	Bc	Bb
PAS,mmhg	126±3	147±4*	145±5*	145±4*
Ccr,mil/min.100g	0.56±0.08	0.29±0.04*	0.32±0.01*	0.26±0.06*
N°glomerulos,xarea	7.6±0.2	5.7±0.2*	5.6±0.2*	5.5±0.1*
Area glomerular total,um²	19240±416	14600±478*&	16490±462*	14140±404*&
Area capilar glomerular,um²	13830±331	8671±358*&	11150±407*	7977±276*&
Proteinuria,mg/24h	3.09±0.86	2.73±0.54	5.26±0.74	14.5±2.09*&#
TBARS,nmol/mg.prot	0.16±0.02	0.46±0.02*&	0.38±0.05*	0.66±0.08*&
SOD,U/mg.prot	10.3±1.7	11.2±1.5	10.7±1.5	12.1±1.1
CAT,pmol/mg.prot	2.1±0.4	1.2±0.1*&	2.6±0.1	1.4±0.4*&

**0095. (0769) ACCIÓN CITOTÓXICA DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 SOBRE CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS ENDOTELIALES DE CORDON UMBILICAL HUMANO.** E Gerhardt, E Zotta, C Silberstein, C Ibarra

Laboratorio de Fisiopatogenia - Depto. de Fisiología - Facultad de Medicina - UBA

El principal factor de virulencia para el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es la toxina Shiga (Stx) liberada por Escherichia coli enterohemorrágica (STEC). Si bien las infecciones por STEC están asociadas a Stx1, Stx2 o ambas, la producción de Stx2 aumenta el riesgo de SUH. La base patogénica del SUH está determinada por el daño de las células endoteliales de los pequeños vasos del colon, riñón y sistema nervioso central. Se postula que el daño endotelial es una consecuencia directa de la acción de Stx que, liberada por STEC atraviesa la barrera intestinal y gana acceso a la circulación sanguínea. El objetivo de este trabajo fue estudiar la citotoxicidad de Stx2 en un modelo in vitro de cultivo de células endoteliales para entender el mecanismo de acción que produce el daño endotelial. Para ello se obtuvieron las células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) provenientes de partos realizados en el Instituto Médico de Obstetricia, y se cultivaron sobre soporte fijo en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino. Las HUVEC se crecieron en monocapas confluentes durante 48 hs y la actividad citotóxica de Stx2 se midió por incorporación de rojo neutro dentro de las 72 hs de incubación con la toxina. Se observó que HUVEC fue sensible a Stx2 entre el primero y quinto pasaje (P < 0,01). Co-cultivos de células epiteliales y endoteliales se están poniendo a punto para investigar la participación de cada tipo celular en el daño inducido por la toxina en tejido colónico y re-

nal in vivo. En conclusión las HUVEC son un buen modelo para estudiar in vitro los efectos citotóxicos de Stx2.

**0096. (0112) MUERTE CELULAR INDUCIDA POR LA ADAPTACIÓN A LA ALCALOSIS EN CÉLULAS DE TÚBULO COLECTOR RENAL.** V Rivarola, MP Flamenco, L Galizia, P Ford, C Capurro

*Lab. Biomembranas, Depto de Fisiología y Biofísica, Fac Medicina, Univ de Buenos Aires, Argentina.*

La homeostasis ácido-base del organismo es mantenida en gran medida por los túbulos colectores del riñón de mamífero (CD). Sin embargo, existen varias patologías que producen un desbalance crónico del equilibrio ácido-base. Previamente demostramos que las células RCCD<sub>1</sub>, modelo de CD, son capaces de adaptarse a una alcalosis de 48 h reestableciendo su pH<sub>i</sub> a pesar de la existencia de una alcalosis extracelular continua. Recientemente demostramos, que las células RCCD<sub>1</sub> responden a la alcalosis crónica con una disminución en el número de células, un aumento de su área celular y su contenido de ADN. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si esta alteración del crecimiento se debía a un aumento de la muerte celular. Para estos estudios se cultivaron monocapas de células RCCD<sub>1</sub> durante diferentes tiempos de alcalosis (24 a 96 horas) y luego se evaluaron diferentes parámetros de muerte celular. Nuestros resultados muestran que la exposición a un medio alcalino por agregado de NaHCO<sub>3</sub> durante 48 h, induce un aumento de la muerte celular por tinción con Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio (% células muertas: Alcalosis = 6.74±2.37 vs Control = 1.42±0.31, n=12, p<0.05). Esta muerte podría ser apoptótica dado que, en geles de agarosa con ADN cromosómico de células cultivadas en las mismas condiciones, se observó la fragmentación de ADN. Por otra parte se procedió a evaluar el contenido de ADN hipodiploide por citometría de flujo en células teñidas con iodo de propidio. Aquí no se observó muerte celular a las 24 h pero sí a las 48 h (alcalosis 26±3% con respecto al control, n=4, p<0.01). Además al adaptar las células RCCD<sub>1</sub> durante un tiempo mayor, el % de muerte celular fue incrementándose (~ 56% y 74% con respecto al control a las 72 h y 96 h respectivamente). Por lo tanto concluimos que, en las células RCCD<sub>1</sub>, la disminución del crecimiento celular luego de adaptarse a la alcalosis podría ser el resultado de una mayor tasa de apoptosis.

**0097. (0070) ¿CUANTOS GLOMÉRULOS SON NECESARIOS MEDIR PARA ESTIMAR EN FORMA ADECUADA EL ÁREA GLOMERULAR?** NI Castiglia<sup>1</sup>, GP Ossani<sup>2</sup>

*1 Hospital de Clínicas. Departamento de Docencia e Investigación. Sección de Asesoría Científica, 2 Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.*

La medición del área glomerular es una variable relevante en la investigación básica, en situaciones patológicas y no patológicas. El tamaño muestral tiene una relación directamente proporcional con la representatividad, a mayor tamaño muestral mayor grado de representatividad de la muestra. Sin embargo, existe un punto óptimo en el cual una vez alcanzado ese número de casos, aunque se incremente el número de observaciones, no se incrementa en forma considerable la representatividad. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue estimar el tamaño muestral adecuado para alcanzar el mayor grado de representatividad del área glomerular (yuxtamedular y subcapsular) en ratas. El diseño de este estudio fue descriptivo, prospectivo, observacional y longitudinal. El área glomerular fue medida con analizador de imágenes en riñones de ratas Wistar hembras de 2, 4, 8 y 10 meses, fijados en formol, Bouin, por perfusión con formol y preservados en nitrógeno líquido. Para la estimación del tamaño muestral se aplicó la siguiente fórmula:  $[1.96 * \text{desvio estándar} / \text{amplitud del intervalo de confianza del 95\% de área glomerular}]^2 = \text{número de casos (tamaño muestral)}$ . Los datos obtenidos de la medición de 7778 glomérulos teniendo en cuenta los fijadores empleados, la localización y la edad de la rata fueron utilizados

para alimentar la fórmula y permitir la estimación del tamaño muestral adecuado. Para estimar la mayor amplitud esperada del área glomerular en la población, se estimó el intervalo de confianza del 95% del desvío estándar para cada uno de los grupos. El mayor valor hallado del límite superior del IC95% del desvío estándar fue 4872. Por definición la amplitud esperada en la población fue  $4872 / 2 = 2436$ . Una vez obtenido el valor de la amplitud esperada se estimó para cada grupo el tamaño muestral necesario para alcanzar el mayor grado de representatividad muestral. El tamaño muestral necesario para la estimación del área glomerular en la población fue de 13 glomérulos.

**0098. (0069) ALTERACIONES FUNCIONALES Y MORFOLÓGICAS DEL RIÑÓN DE LA RATA SENIL. MICROSCOPIA DE LUZ, ÓPTICA DE ALTA RESOLUCIÓN, ELECTRÓNICA Y MORFOMETRÍA.** GP Ossani<sup>1</sup>, MC Fiori<sup>2</sup>, N Lago<sup>1</sup>, AJ Monserrat<sup>1</sup>

*1 Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, 2 Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de General San Martín. Provincia de Buenos Aires.*

Con el envejecimiento las ratas desarrollan frecuentemente una nefropatía progresiva crónica (NPC) que ha sido descrita en la mayoría de las ratas albinas, siendo la incidencia dependiente del sexo y de la cepa. El objetivo fue estudiar los cambios renales de ratas seniles. Se emplearon ratas Wistar macho: seniles (18-26 meses) y controles (3 meses de edad). Los riñones fueron estudiados por microscopía de luz, microscopía óptica de alta resolución (MOAR) y microscopía electrónica de transmisión (MET). En las ratas seniles vs controles la proteinuria (mg/24hs; X±DS: 454.4±279.7 vs 32.2±17.6) y la creatinemia (mg/dL X±DS: 0.8±0.1 vs 0.6±0.1) fueron significativamente mayores (p=0.0026 y p=0.005), no observándose diferencia en la presión arterial (mmHg X±DS: 110.3±12.3 vs 121.3±3.1). El estudio morfológico mostró ensanchamiento del mesangio y de la membrana basal glomerular, fusión de los pedicelos con eventual degeneración y atrofia, adhesiones de las asas capilares a la cápsula de Bowman, acúmulos subendoteliales y eventualmente esclerosis glomerular focal y segmentaria o global. Los túbulos mostraron incremento de gránulos densos o atrofia con engrosamiento de la basal y el intersticio fibrosis y escasos infiltrados mononucleares. En la morfometría se observó una curva bifásica (incremento inicial, luego disminución) en el área de los glomérulos, hasta llegar a la esclerosis global y engrosamiento de las arterias de pequeño calibre (espesor  $\mu\text{m}$  X±DS: 12±3 vs 9±3, superficie  $\mu\text{m}^2$  X±DS: 1800±406 vs 1347±338). La MOAR y la MET mostraron además de los cambios descriptos, ocasional hialinosis o fibrosis de los vasos de pequeño calibre. La curva bifásica glomerular, el engrosamiento de los vasos de pequeño calibre y la hialinosis o fibrosis de los vasos de pequeño calibre son descripciones originales. La NPC puede estar asociada a una serie de cambios morfológicos, que sugieren que los mismos no son atribuibles a una lesión vascular primaria y si a una glomerular.

**0099. (0012) SUPERFICIE PERITONEAL: CORRESPONDENCIA ENTRE SU ESTIMACIÓN POR FÓRMULAS UTILIZADAS EN CLÍNICA Y SU MEDICIÓN DIRECTA.** AB Merlo<sup>1</sup>, AM Albanese<sup>1</sup>, EE Gomez<sup>1</sup>, M Gomez<sup>1</sup>, JH Miño<sup>1,2</sup>, EF Albanese<sup>1</sup>

*1 Facultad de Medicina. Universidad del Salvador, 2 Facultad de Farmacia Y Bioquímica. UBA*

La estimación de la superficie peritoneal (SP) por fórmulas utilizadas para obtener la superficie corporal (SC) se basa en que se acepta que dicha superficie es equivalente a la superficie corporal. **Objetivo:** Determinar la correspondencia entre valores de SP obtenidos por fórmulas utilizadas en clínica para la estimación de la SP y valores de SP medidos con un método desarrollado en nuestro laboratorio (Medicina 66:165-66, 2006). **Material y método:** Se utilizaron los valores de SP de 10 casos femeninos medidos en nuestro laboratorio cuya media ± ES fue de 1.43 ±

0.08 m<sup>2</sup>. Con los valores de peso y altura se calcularon superficies mediante las fórmulas para estimar la SC de DuBois and DuBois (1916), Boyd (1935), Gehan and George (1970), Haycock et al. (1978) y Mosteller (1987). **Resultados:** Las medias  $\pm$  ES de las superficies calculadas resultaron (m<sup>2</sup>): 1.50 $\pm$ 0.08; 1.48 $\pm$ 0.10; 1.49 $\pm$ 0.09; 1.47 $\pm$  0.10 y 1.48 $\pm$ 0.09 respectivamente. No difieren significativamente (ANOVA) entre sí ni con la SP medida y muestran altos y significativos coeficientes de correlación de Pearson. La diferencia porcentual en valor absoluto (media $\pm$ ES) entre la superficie medida y calculada por las respectivas fórmulas fue de 6.38 $\pm$ 1.22; 5.90 $\pm$ 1.27; 6.05 $\pm$ 1.21; 5.95  $\pm$ 1.28 y 6.05 $\pm$ 1.16. Estos valores no difieren significativamente entre sí (ANOVA). **Conclusión:** La similitud entre las superficies peritoneales medidas y calculadas con escasa diferencia porcentual individual entre ambas y la alta correlación significativa entre las superficies peritoneales medidas y calculadas, permitiría usar las fórmulas destinadas a determinar la superficie corporal para estimar la superficie peritoneal medida.

**0100. (0728) EFECTO DE LA DESPOLARIZACIÓN DE LA MEMBRANA BASOLATERAL EN EL TRANSPORTE DE SODIO EN PIEL DE RANA.** A Bagdadi, A Altamirano, C Amorena

CESyMA, ECyT Universidad Nacional de General San Martín

El transporte transepitelial de sodio (Na<sup>+</sup>) en anfibios puede ser descrito como una conductancia en serie con una fuente de corriente, que corresponde a la bomba de Na<sup>+</sup>. El análisis del transporte de Na<sup>+</sup> mediante corrientes de cortocircuito (I<sub>sc</sub>) implica tratar a estos dos sistemas como una "caja negra". El objetivo de este trabajo fue comparar la cinética del transporte de Na<sup>+</sup> en condiciones de despolarización de la membrana basolateral y con polarización normal. La I<sub>sc</sub> se midió de manera clásica, en cámara de Ussing. Se analizó la cinética del transporte de Na<sup>+</sup> sobre piel abdominal de Rana Catesbeiana aumentando la concentración de sodio en el lado apical de la membrana, de 14 mM a 88,4 mM, en pasos discretos, con la membrana basolateral expuesta a soluciones con 5 mM o 75 mM de K<sup>+</sup>. Los resultados de la cinética de la I<sub>sc</sub> fueron analizados con el programa Nfit (Island Software, Galveston, TX). En condiciones en que la membrana basolateral se encontraba polarizada, los datos se ajustaron a una cinética michaeliana, en donde  $J_{Na^+} = J_{MAX} \times [Na^+] / (k + [Na^+])$  ( $r = 0.998$ ). Cuando los experimentos se realizaron con alto K<sup>+</sup> basolateral el ajuste obedeció a una cinética de Hill, donde  $J_{Na^+} = J_{MAX} \times [Na^+]^n / (k' + [Na^+]^n)$ , siendo  $n = 2$  ( $r = 0.998$ ). La despolarización transepitelial redujo la I<sub>sc</sub> de 30 a 17  $\mu$ A. Dadas las características electrogénicas de la bomba, es posible que la despolarización aumente la actividad de la misma, con disminución de ATP y aumento en la formación de CO<sub>2</sub> lo que llevaría a una disminución de los valores de pH intracelular, que es un importante regulador del transporte transepitelial de Na<sup>+</sup> (LG Palmer, J. Memb. Biol 184, 305: 2001).

**0101. (0309) EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE ANIONES ORGÁNICOS OAT1 Y OAT3 EN RATAS DEPLETADAS DE GLUTATIÓN.** G Di Giusto<sup>1</sup>, AM Torres<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Área Farmacología, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, <sup>2</sup> Área Farmacología, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. CONICET.

Oat1 y Oat3 son proteínas transportadoras involucradas en la secreción tubular de aniones orgánicos endógenos y exógenos. Oat1 se encuentra en corteza renal, localizada en membrana basolateral de células epiteliales del túbulo proximal; mientras que Oat3 posee una distribución más extendida encontrándose tanto en corteza como en médula y localizándose en membrana basolateral de células de los túbulos proximal, distal, colector y en asa ascendente de Henle. Los riñones son altamente dependientes del adecuado suplemento de glutatión (GSH) para mantener tanto su estructura como su función normal. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la expresión de Oat1 y Oat3

en ratas tratadas con dietilmaleato (DEM), un potente agente depletor de GSH. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas controles (S, n=7) y tratadas con una dosis única de DEM (T, 4 mmol/kg p.c., i.p., n=6) 2 h antes del experimento. En homogenados de corteza (C) y de médula (M) renal se evaluaron los niveles de GSH por espectrofotometría y la abundancia de Oat1 y Oat3 mediante Western blotting. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (\* P < 0,05). Los niveles de GSH ( $\mu$ mol totales) se encontraron disminuidos en el grupo de ratas T en C (S: 5.92  $\pm$  0.21, T: 1.61  $\pm$  0.15\*) y en M (S: 0.570  $\pm$  0.088, T: 0.185  $\pm$  0.069\*). La abundancia (%) determinada para Oat1 fue la siguiente: S: 100  $\pm$  11, T: 267  $\pm$  30\*. Para Oat3 se detectaron dos bandas inmunoreactivas, una de 77 kDa (C: S: 100  $\pm$  3, T: 113  $\pm$  8; M: S: 100  $\pm$  12, T: 128  $\pm$  10) y otra de 130 kDa (C: S: 100  $\pm$  6, T: 239  $\pm$  18\*; M: S: 100  $\pm$  9, T: 180  $\pm$  11\*). Ante un descenso significativo en los valores de GSH se observa, en las ratas tratadas con DEM, un aumento en la abundancia de Oat1 y en la banda de 130 kDa de Oat3, tanto en C como en M. La banda de 77 kDa de Oat3 no presenta diferencias significativas entre grupos. Estos datos indicarían que la disminución en los niveles de GSH ejercería una diferente regulación de la expresión de ambas proteínas.

**0102. (0418) RELACIÓN ENTRE EL ESTADO TIROIDEO, LA EXPRESIÓN DEL CITOCROMO P450 RENAL (CYP4A) Y LA EXCRECIÓN DE SODIO SECUNDARIA A LA EXPANSIÓN DEL VOLUMEN EXTRACELULAR (VEC).** CA Kirchheimer, S Nowicki

CEDIE-CONICET

Hemos reportado que el ácido 20-hidroxiicosatetraenoico (20-HETE), el principal producto del metabolismo del ácido araquidónico por del CYP4A participa en la excreción renal de Na<sup>+</sup> secundaria a la expansión del VEC. Se ha propuesto que las hormonas tiroideas modularían la expresión de ciertas isoformas del CYP4A. En este trabajo se estudió el efecto del hipotiroidismo sobre la expresión de las isoformas 4A1, 4A2, 4A3, y 4A8 del CYP4A y la excreción de Na<sup>+</sup> provocada por la expansión del VEC. Se estudiaron ratas Wistar macho de 8 sem, controles (C), Sham, tiroidectomizadas (Tx), y Tx tratadas con el inhibidor del CYP4A, 1-aminobenzotriazol (ABT, 50 mg/kg, i.p.) (Tx+ABT). Los niveles de expresión del ARNm para las isoformas del CYP4A se determinaron en células proximales aisladas (c-TCP) por RT-PCR semicuantitativa. En las ratas Tx se observó un incremento de la expresión del CYP4A (en % del control: 4A1: 150, 4A3: 200 y 4A8: 180. Los estudios de clearance se realizaron en animales anestesiados. Se estudiaron los períodos basal (B), expansión (E, 5% PC/h con solución de NaCl 0.9%, 60 min), y recuperación (R). No se observaron diferencias en el período B en la diuresis (V,  $\mu$ L/min/100g), natriuresis (UNaV,  $\mu$ Eq/min/100g) ni en la excreción fraccional de sodio (EFNa, %) entre los cuatro grupos (V: 1.35 $\pm$ 0.16; UNaV: 0.09 $\pm$ 0.03; EFNa: 0.057 $\pm$ 0.012). Estos parámetros aumentaron durante E, donde se observaron diferencias entre C y Tx (V; C: 15,20 $\pm$ 1.68, TX: 25.28 $\pm$ 3.24\*, UNaV; C: 5.84 $\pm$ 0.85, TX: 9.68 $\pm$ 0.97\*, EFNa; C: 2.46 $\pm$ 0.33, TX: 4.75 $\pm$ 0.94\*), efecto revertido por ABT (TX+ABT: V; 7.13 $\pm$ 0.73\*#; UNaV: 1.86 $\pm$ 0.17\*#; EFNa: 1,12 $\pm$ 0.27#). Todos los valores tendieron a normalizarse durante R. No hubo diferencias entre C y Sham en ningún período. \* p < 0.05 vs C; # p < 0.05 vs TX. Nuestros resultados muestran una mayor expresión del CYP4A en c-TCP de ratas TX, que podría ser responsable de la mayor respuesta natriurética a la expansión del VEC, actuando probablemente a nivel tubular.

**SISTEMA CARDIOVASCULAR I**

**0103. (0448) ESLABONES DEL SISTEMA  $\beta$ -ADRENÉRGICO CARDÍACO INVOLUCRADOS EN LA GÉNESIS DE LA MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA.** MS Lo Presti<sup>1</sup>, HW Rivarola<sup>1</sup>, AR Fernández<sup>1</sup>, J Enders<sup>1</sup>, R Fretes<sup>2</sup>, G Levin<sup>3</sup>, P Paglini<sup>1</sup>

1 *Cátedra de Física Biomédica. Fac Cs Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.*, 2 *Cát. Histología, Embriología y Genética II, Fac Cs Médicas. Universidad Nacional de Córdoba*, 3 *Centro de Investigaciones Endocrinológicas - CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.*

La cardiopatía chagásica es la más frecuente y severa consecuencia clínica de la infección por *Trypanosoma cruzi*. Esta miocardiopatía puede considerarse una cardioneuropatía en la que se halla comprometido tanto el sistema nervioso simpático como el parasimpático. En el presente trabajo se estudiaron algunos eslabones del sistema  $\beta$ -adrenérgico de transducción de señales en corazones de ratones (n=178) infectados con 50 tripomastigotes de *T. cruzi* (aislamiento SGO-Z12) en la etapa crónica temprana (135 días post infección - d.p.i.) y crónica tardía (365 d.p.i.) de la infección experimental. Se determinó: adrenalina (A) y noradrenalina (NA) en plasma por HPLC-DE; afinidad y densidad de receptores  $\beta$ -cardíacos por binding con dihidroalprenolol tritido; funcionalidad de los receptores en respuesta a A y NA (en presencia y ausencia de Propranolol o Cafeína); niveles de AMPc cardíaco por ELISA y contractilidad cardíaca como respuesta final del sistema. Un grupo sin infección (SI) también fue estudiado (n=45). A y NA disminuyeron desde la etapa crónica temprana (A: 6,94 $\pm$ 1,06 ng/ml; NA: 8,65 $\pm$ 0,99 ng/ml) a la crónica tardía (A: 0,44  $\pm$ 0,14 ng/ml; NA: 0,58 $\pm$ 0,14 ng/ml; p<0,01); la afinidad de los receptores se mantuvo disminuida a lo largo de la etapa crónica al compararla con SI (p<0,05) mientras que la densidad de los mismos disminuyó desde la etapa crónica temprana (184,1 $\pm$ 2,1 fmol/mg prot) a la crónica tardía (128,59 $\pm$  3,94 fmol/mg prot; p<0,001); el AMPc estuvo aumentado con respecto a SI (p<0,01); sin embargo, la respuesta a A y NA se encontró disminuida (p<0,05) y la contractilidad se mantuvo dentro de los valores de SI. Los presentes resultados demuestran alteraciones en la transducción de señales del sistema  $\beta$ -adrenérgico cardíaco en la etapa crónica, que se profundizan a medida que evoluciona la infección por *T. cruzi*, hasta la etapa crónica tardía.

**0104. (0194) LA MIOCARDIOPATÍA CHAGÁSICA TIENE MITOCONDRIAS CON ALTERACIONES DIFERENTES DE ACUERDO A LA CEPA DE TRYPANOSOMA CRUZI QUE INFECTE AL HUÉSPED.** A Báez<sup>1</sup>, S Lo Presti<sup>1</sup>, W Rivarola<sup>1</sup>, P Pons<sup>2</sup>, C Díaz<sup>2</sup>, R Fretes<sup>2</sup>, P Paglini<sup>1</sup>

1 *Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba*, 2 *Cátedras de Histología y Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.*

El ingreso del *T. cruzi* en los miocardiocitos genera procesos inflamatorios crónicos que producen stress oxidativo constante y de diferente magnitud que daña las mitocondrias altamente sensibles a los radicales libres del oxígeno lo que provocaría la disminución de la génesis de energía con pérdida de la capacidad contráctil del corazón generando la insuficiencia cardíaca, característica de la enfermedad de Chagas. Estudiamos entonces desde el punto de vista estructural y funcional, las mitocondrias de corazones de ratones infectados con diferentes cepas de *T. cruzi* a los 365 días post-infección (d.p.i.) (etapa crónica). Se utilizaron ratones Albino Suizos G1= sin infectar (n= 30); e infectados con 50 tripomastigotes de *T. cruzi* G2 = cepa Tulahuen (n= 30) y G3= con aislamiento SGO Z12 (n= 30). Muestras de miocardios de todos los grupos a los 365 d.p.i. se analizaron en microscopio electrónico Zeiss. El aislamiento mitocondrial se realizó por fraccionamiento subcelular determinándose actividad enzimática de la Citrato sintasa (enzima del ciclo de Krebs) y de los complejos I-IV de la cadena respiratoria, por espectrofotometría. Estructura mitocondrial: Disrupción de membranas, dilatación de crestas y aumento de matriz más frecuentes en G2 y disminución del tamaño en G3 (p<0.0001). Actividad enzimática: ( $\mu$ moles.min<sup>-1</sup>/ mg prot): G1= la Citrato sintasa fue de 0.29 $\pm$ 0.04 y en G2 y G3 aumentó (p<0.05); CI en G1=0.04 $\pm$ 0.02 en G2 y G3 disminuyó (p<0.05); CII en G1=1.1 x 10<sup>-9</sup>  $\pm$ 5.7 x 10<sup>-11</sup>, G2 y G3 disminuyó (p<0.05); CIII en G1 fue de 0.17 $\pm$ 0.03, G2 y G3 disminuyó

(p<0.0001); CIV en G1 fue de 0.11 $\pm$ 4.4 x 10<sup>-3</sup>, G2 y G3 aumentó (p<0.0001). Las alteraciones estructurales y funcionales de las mitocondrias demuestran que éstas contribuyen a explicar la fisiopatogenia de la miocardiopatía chagásica crónica.

**0105. (0122) IMPACTO HEMORREOLÓGICO DE LA CARGA ANIÓNICA ERITROCITARIA EN VASCULOPATIAS.** N Lebensohn<sup>1</sup>, A Re<sup>1</sup>, F Filippini<sup>1</sup>, L Carrera<sup>2</sup>, A D'Ottavio<sup>2</sup>, J Valverde<sup>1</sup>, M D'Arrigo<sup>1</sup>, P Foresto<sup>1</sup>

1 *Lab. Inmunohe. y Hemorreol. Depto. Bioquímica Clínica. Fac. Cs. Bioq. y Farm UNR*, 2 *Depto Fisiología Fac. Cs. Méd. UNR*

La carga aniónica eritrocitaria (CAE) obedece mayoritariamente al ácido siálico (AS), oligosacárido terminal de membranas celulares. El AS interviene en el mecanismo de agregación de glóbulos rojos. Ha sido reportado su vinculación en la patogénesis de vasculopatías como la diabetes e hipertensión. El objetivo de este trabajo fue estudiar el nivel de ácido siálico sérico, la CAE y la agregación eritrocitaria, en 3 grupos, 20 controles normales (CN), 20 diabéticos (DBT) y 21 hipertensos (HTA). Se determinó el AS sérico por método colorimétrico de Erlich y la carga aniónica eritrocitaria por unión al colorante Alcian Blue y por método de reparto en sistemas bifásicos (P). La agregación se estudió por estudio digitalizado de la forma de los agregados a través de un parámetro de forma (ASP).

Parámetro	CN	HTA	DBT
AS sérico micromol/l	5.7 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 0.2	6.8 $\pm$ 0.3
CAE (%)	98 $\pm$ 1	59 $\pm$ 3	49 $\pm$ 2
P	0.95 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.12	0.55 $\pm$ 0.10
ASP	0.25 $\pm$ 0.07	0.61 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.08

Del análisis estadístico de los resultados se observan diferencias significativas (p<0.0001) entre controles y ambos grupos para los parámetros estudiados. La reducción de la carga negativa en las membranas en los pacientes estudiados, contribuye a las alteraciones en la agregación eritrocitaria, participando en el desarrollo y complicaciones microvasculares. De acuerdo a estos resultados, se observa deficiencia de carga aniónica eritrocitaria que obedecería a distintos mecanismos: desialización en hipertensos con incremento del ácido siálico sérico y glicosilación no enzimática en diabéticos. Estas alteraciones se reflejan en un incremento de la agregación celular contribuyendo a alteraciones en el flujo vascular. El estudio de estos parámetros podrían tener relevancia como marcadores de presencia de complicaciones microvasculares.

**0106. (0023) ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LAS FRECUENCIAS GENOTÍPICAS DE POLIMORFISMOS DE APOE, MTHFR (C677T) Y ENOS (G894T) EN DOS POBLACIONES.** G Gerrard<sup>1</sup>, S Lioi<sup>1</sup>, C Zumoffen<sup>1</sup>, A Ensinnck<sup>1</sup>, J Beloscar<sup>2</sup>, M D'Arrigo<sup>1</sup>, I Rosillo<sup>1</sup>

1 *Area Química Analítica. Depto de Bioquímica Clínica. Fac. de Ciencias Bioq. y Farm. UNR*, 2 *Carrera de Cardiología. Fac. de Ciencias Médicas. UNR*

La presencia de polimorfismos de MTHFR(C677T); eNOS (G894T) y apoE pueden causar hiperhomocisteinemia en la forma T+; reducción de óxido nítrico endotelial en sujetos T+ y alteraciones en el metabolismo de lipoproteínas en presencia del alelo e4, respectivamente. Considerando la escasa información sobre la prevalencia de estos polimorfismos en nuestro medio el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio descriptivo de las frecuencias genotípicas de polimorfismos de apoE, MTHFR(C677T), eNOS(G894T) en dos poblaciones: caucásica (PC n:87) y aborigen nacidos en la provincia de Chaco y emigrados a Rosario (PA n:39). Las muestras fueron reclutadas en forma aleatoria entre individuos que aceptaron participar previo consentimiento firmado. Se trabajó con sangre periférica. La caracterización molecular de apoE se realizó por ASA-PCR y la de MTHFR y eNOS por PCR-RFLP.

Población	apoE	MTHFR (CT)	MTHFR (TT)	eNOS(GT)	eNOS(TT)
PC	E3/E4	0.11 (0.05-0.18)	0.02(0.00-0.05)	0.05(0.01-0.10)	0.01(0.00-0.03)
	E4/E4	0.00	0.00	0.00	0.00
	E2/E4	0.02(0.00-0.05)	0.00	0.011(0.00-0.033)	0.00
PA	E3/E4	0.19(0.06-0.29)	0.00	0.13(0.02-0.23)	0.04(0.00-0.07)
	E4/E4-E2/E4	0.00	0.00	0.00	0.00

Para comparar las frecuencias alélicas de las poblaciones PA vs PC, se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal. Los resultados (IC 95%) muestran diferencias marginalmente significativas entre ambas poblaciones en la copresencia de alelos e4 de apoE y alelos T de MTHFR y eNOS. El impacto metabólico de las variantes de apoE, MTHFR y eNOS se comportan como factores de riesgo independientes, la presencia conjunta de tales polimorfismos podría potenciar el desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

#### 0107. (0501) DESARROLLO DE CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS. SG

Miriuka, HO Grancelli, V Heyd, G Sevlever

FLENI, Buenos Aires

**Introducción:** El desarrollo de cardiomiocitos a partir de células embrionarias humanas ha sido recientemente descrito. Poco se sabe de los mecanismos inductores de la misma. **Objetivos:** Comparar el desarrollo de cardiomiocitos de dos líneas de CEH diferentes (H5 y H16). **Métodos:** Las CEH fueron cultivadas como ha sido descrito previamente. Las colonias indiferenciadas se mantuvieron en co-cultivo con fibroblastos embrionarios de ratón hasta el momento de diferenciación en medio DMEM conteniendo KSR y bFGF. Para diferenciarlas, las células fueron despegadas y colocadas en suspensión en DMEM+FBS 20% por 4-5 días para la formación de cuerpos embrionarios. Posteriormente los cuerpos fueron pasados a platos adherentes cubiertos de gelatina al 0.2%. Luego se realizó la observación diaria para la observación de zonas contráctiles. **Resultados:** Las células H5 y H16 fueron observadas por un tiempo de un mes. No se observó diferenciación espontánea a cardiomiocitos en las células H16. En cambio, en las células H5, zonas contráctiles aparecieron luego del quinto día, aumentando su número paulatinamente. Sin embargo, solo un mínimo número (6%) de los cuerpos embrionarios presentó zonas contráctiles. La observación directa mostró que estas zonas permanecieron con un latido constante y sin variación de su frecuencia por el correr de las semanas (total 60 días). **Conclusiones:** La diferenciación espontánea de células embrionarias humanas a cardiomiocitos ocurre con frecuencia variable en las líneas celulares analizadas. Nuevos experimentos están en curso para cuantificar este fenómeno en otras líneas celulares.

#### 0108. (0405) PACIENTES HIPERTENSOS CON ALTA RESISTENCIA A FÁRMACOS HIPOTENSORES Y POLIMORFISMOS C677T EN EL GEN DE LA ENZIMA METILTETRAHIDROFOLATORREDUCTASA (MTHFR). M Sosa<sup>1</sup>, V Gregoret<sup>1</sup>, F Tedeschi<sup>1</sup>, N Nejman<sup>1</sup>, A Gaydou<sup>2</sup>, F Zalazar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Práctica Profesional, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, U N. L., <sup>2</sup> Sección Hipertensión. Hospital JM Cullen. Santa Fe

Entre los pacientes hipertensos existe una población resistente a la terapia y con necesidades farmacológicas aumentadas. Dentro de los mecanismos que dan origen al aumento persistente de la presión arterial, habría una contribución importante de origen genético, relacionada con alteraciones metabólicas y una fuerte interrelación genético-ambiental. La asociación de los niveles séricos de homocisteína (Hcy) con el polimorfismo genético C677T de la enzima MTHFR, que se manifiesta con actividad disminuida de la misma, es de interés por su potencialidad para interferir en el mecanismo de vasodilatación. **Objetivo:** Evaluar, en pacientes hipertensos con necesidad de más de dos fármacos hipotensores, la presencia del polimorfismo C677T para el gen de la enzima MTHFR y relacionarlo con los niveles de Hcy. Se estudiaron 23 pacientes hipertensos que estaban recibiendo 3 o más

drogas hipotensoras y se compararon con un grupo control constituido por 48 pacientes hipertensos con menores requerimientos farmacológicos para su tratamiento. Se realizó la genotipificación de MTHFR, por PCR-RFLP. Hcy se cuantificó empleando un inmunoensayo con polarización de la fluorescencia. Para la comparación de medias se usó ANOVA, utilizando el programa SPSS 7.5 para Windows. Cuando se compararon los niveles de Hcy para el grupo en estudio (11.1±4.5 mM) y para el grupo control (8.3±2.6 mM) se obtuvo un p<0.001. Hubo correspondencia entre la presencia del polimorfismo y los valores de Hcy, no obstante, la frecuencia genotípica (FG) fue: CC, 0,4783; CT: 0,4783 y TT: 0,0435. Hemos encontrado valores significativamente superiores de Hcy en pacientes con resistencia farmacológica. Considerando además la FG hallada debe tenerse en cuenta, en estos pacientes, la interrelación genético ambiental implicada en la regulación del tono vascular por intermedio del aumento de Hcy y evaluar, en la intervención clínica rutinaria de los pacientes resistentes al tratamiento, una dieta enriquecida con folatos.

#### 0109. (0643) ESTUDIO DE LA REACTIVIDAD AORTICA EN EL MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE FABRY. D Procopio<sup>1</sup>, PN De Francesco<sup>1</sup>, CA Fossati<sup>1</sup>, PA Rozenfeld<sup>1</sup>, G Rinaldi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> LISIN, Facultad Ciencias Exactas, UNLP, <sup>2</sup> Centro de Investigaciones Cardiovasculares (Facultad de Ciencias Médicas), UNLP

La Enfermedad de Fabry es un error innato del metabolismo de los glicoesfingolípidos, debido a la deficiencia de la enzima lisosomal  $\alpha$ -galactosidasa A (AGA), lo que produce acumulación de globotriaosilceramida (Gb3) principalmente en el endotelio vascular. Se analizó la reactividad aórtica en ratones knockout para el gen de AGA (RF), en comparación con sus controles normales (RC). Anillos de 2 mm de longitud de aorta de RF y RC fueron suspendidos de un transductor de fuerza, dentro de un baño de solución de Ringer a 37° C. Luego de la estabilización se provocó contracción con fenilefrina 1  $\mu$ M (PE), y posterior relajación con cantidades crecientes de acetilcolina (ACh) ( $10^{-11}$  -  $10^{-5}$  M), con o sin el agregado de diferentes inhibidores de la relajación (Indometacina (I); KCl 15 mM (K) y L-NAME (L)). Las relajaciones se expresaron como porcentaje de la contracción previa. La contracción desarrollada con fenilefrina por las aortas de RF y RC fue del mismo orden (1,152  $\pm$  0,118 y 1,251  $\pm$  0,158 g respectivamente; p = 0,32). La relajación con ACh fue significativamente mayor en RF que en RC (37%  $\pm$  2% y 50%  $\pm$  5%, p<0,05). En ambas cepas de ratón, la Indometacina no logra inhibir la relajación (p>0,18), en cambio L y K mostraron una inhibición de la relajación (p<0,02), siendo más importante el efecto del L-NAME (RF: 81%  $\pm$  3%; RC: 83%  $\pm$  4%) que el del KCl (RF: 62%  $\pm$  3%; RC: 62%  $\pm$  5%). En conclusión, la relajación del músculo liso vascular dependiente del endotelio es mayor en RF que en RC. El mediador principal en la relajación mediada por acetilcolina sería el óxido nítrico. La acumulación de glicolípidos en el sistema vascular estaría causando alteraciones en los mecanismos fisiológicos que controlan el estado de contracción del mismo.

#### 0110. (0177) EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) EN RATAS WISTAR SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y LA VISCOSIDAD SANGUÍNEA. A Dominighini<sup>1</sup>, M Ferrero<sup>1</sup>, J Gonzalez<sup>1</sup>, D Crosetti<sup>1</sup>, MT Ronco<sup>2</sup>, L Alvarez<sup>2</sup>, M Wagner<sup>3</sup>, A Gurni<sup>3</sup>, CE Carnovale<sup>2</sup>, A Luquita<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biofísica, Facultad Ciencias Médicas, UNR, <sup>2</sup> Fisiología, Cs. Bioquím y Farm-UNR-CONICET, <sup>3</sup> Farmacobotánica-Farmacología y Bioquímica-UBA

Lc o "muérdago criollo", su infusión es utilizada en medicina popular para dar mayor fluidez a la sangre disminuyendo el exceso de colesterol plasmático. Anteriormente demostramos que ratas tratadas con extracto crudo de Lc por vía intraperitoneal (i.p.), disminuye el colesterol (Co) plasmático y aumenta la visco-

sidad sanguínea. Del extracto crudo se purificó Proantocianidina (PLc). **Objetivo:** analizar el efecto del tratamiento de PLc sobre la concentración plasmática de Co y la viscosidad sanguínea. **Métodos:** Se utilizaron ratas Wistar machos adultos Control (C) (n=6) inyectadas i.p. con Solución Fisiológica y Tratadas (T) (n=12) inyectadas i.p. con PLc 3 mg/100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 días. Al cuarto día las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal, i.p.), obteniéndose sangre por punción cardíaca. Se determinaron en plasma: Co (por método enzimático de esterasa-oxidasa), CoHDL, y CoLDL. En sangre: viscosidad sanguínea y plasmática con viscosímetro rotacional Wells- Brookfield LVT- a una velocidad de cizallamiento de 230 s<sup>-1</sup>, a 37 °C. La viscosidad sanguínea relativa estandarizada a un hematocrito (Visc. Rel.Hto) del 45%, se calculó como= (Viscosidad sanguínea/Viscosidad plasmática)45/ Hto. **Resultados:** ( media ± ES). Co plasmático (mg %): C: 89,66 ± 3,10, T: 70,81 ± 3,70\*; Co HDL: C: 67,75 ± 1,06; T: 72,50 ± 2,90; CoLDL: C: 18,50 ± 1,44; T: 11,36 ± 0,59\* (\*p<0,05). Viscosidad sanguínea (mPa.s): C: 4,87 ± 0,37, T: 5,15 ± 0,18 NS; Viscosidad plasmática (mPa.s): C: 1,17 ± 0,03, T: 1,16 ± 0,02 NS. Visc. Rel. Hto: C: 5,34 ± 0,33, T: 5,95 ± 0,20 NS (NS:p>0,05). **Conclusión:** El tratamiento con PLc (dosis 3 mg%) produce un descenso de Co plasmático y CoLDL, sin modificar la viscosidad sanguínea ni plasmática. La diferencia encontrada entre PLc y el extracto crudo de Lc, podrían atribuirse a que se logró aislar el principio activo que descendiendo el LDL- Co y Co plasmático sin alterar la fluidez de la sangre.

**0111. (0195) EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DEL ANION SUPEROXIDO POR ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA ESTIMULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA NADPH OXIDASA SE DEBE A LA LIBERACIÓN/PRODUCCIÓN DE ENDOTELINA-1.** AM Yeves, CI Calzid, MV Correa, IL Ennis, CD Garcíarena, HE Congolani, GE Chiappe de Cingolani

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

La producción del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) por angiotensina II (Ang II) es a través del aumento de la actividad de la NADPH oxidasa. Dicho efecto depende de la dosis y mediado por los receptores AT<sub>1</sub> se detectó en cortes de tejido cardíaco de gato por luminiscencia con lucigenina 5 μM. La producción de superóxido aumentó (43±8, n=34) y (117±21%, n=14) con 1nM y 100 nM de Ang II respectivamente (p<0.05) y se canceló con losartan 1 μM. Previamente demostramos en miocitos cardíacos de gato que la Ang II a la dosis de 1 nM induce un efecto inotrópico positivo a través de la liberación y/o producción de endotelina (ET-1) y que depende de un aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno. El aumento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducido por dicha dosis de Ang II en cortes de tejido cardíaco se suprimió con apocinina 300 μM (-6±14%, n=9) y por los bloqueantes de ET-1 inespecífico (TAK044=14±12%, n=10) y específico (BQ123=12±7%, n=9) respectivamente. Más aun, la incubación durante 15 min. con Ang II 1 nM aumenta el mRNA de prepro-ET-1 (142±40%, n=4, p<0.05) posiblemente para restablecer el depósito intracelular de ET-1. El efecto de ET-1 (5 nM) homóloga el aumento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> que produce Ang II 1nM y también es inhibida por apocinina 300 μM, TAK044 5 μM y BQ123 10 μM. Los inhibidores 5-HD (100 μM) y glibenclámda (50 μM) de los canales KATP mitocondriales suprimen la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducido por Ang II y ET-1. Los resultados nos permiten concluir que el efecto estimulante de la Ang II sobre la actividad de la NADPH oxidasa, a dosis pequeñas de Ang II, se debe enteramente a la liberación/producción de ET-1, la que a su vez activa la NADPH oxidasa. El mecanismo por el cual el bloqueo de los canales KATP mitocondriales elimina el aumento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducido por Ang II/ET-1 aun permanece sin dilucidar.

**0112. (0595) EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS ANF Y BNP Y FUNCIONALIDAD VENTRICULAR EN LA HIPERTROFIA DE MIOCARDIO EN MODELOS CRÓNICOS DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL RENOVASCULAR (RV) Y**

**DOCA-SAL (DS).** CS Cerrudo<sup>1</sup>, CS Cavallero<sup>1</sup>, GE González<sup>2</sup>, I Seropian<sup>2</sup>, CM Hertz<sup>3</sup>, RJ Gelpi<sup>2</sup>, BE Fernández<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. INFIBIOC, 2 Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, 3 INGEBI*

Caracterizamos modelos combinados de RV y DOCA-sal de 2 y 4 semanas. El ARNm-ANF aumentó en DS y el incremento de ARNm-BNP fue moderado en RV. Para exacerbar los efectos de la sobrecarga de presión, estudiamos ratas con tratamiento crónico de 6 (RV6, DS6) y 12 semanas (RV12, DS12), grupos combinados (RV6/DS6, DS6/RV6) y sham. Evaluamos presión sistólica indirecta (PS), cociente peso corazón/peso corporal (PC/Pc), ARNm de ANF y BNP en ventrículo izquierdo (VI) y función ventricular in vivo (PSVI y su derivada dP/dtmáx). La PS se elevó de manera similar en RV y DS (mmHg±ES, Sh6: 120±7; Sh12: 119±2; RV6: 178±6\*; DS6: 178±9\*; RV12: 183±11#; DS12: 178±6#; \*p<0,001 vs Sh6, #p<0,001 vs Sh12). Los grupos combinados y puros mostraron niveles comparables (RV6/DS6: 178±3#, DS6/RV6: 180±6#; #p<0,001 vs Sh12). El índice PC/Pc aumentó más a las 12 semanas (% RV12: 147,0±10,1#; DS12: 148,8±25,7\*#; \*p<0,001 vs Sh12, #p<0,05 vs. RV6; &p<0,05 vs DS6). n= 6-12. El ARNm-ANF en VI aumentó en todos los grupos, siendo mayor en DS (% n=2-4, RV6: 3,6±0,8#; DS6: 4,8±0,7#; RV12: 5,1±0,6\*; DS12: 5,8±1,0\*; RV6/DS6: 3,5±0,4, DS6/RV6: 4,9±0,8; #p<0,05 vs Sh6; \*p<0,01 vs Sh12) mientras que el ARNm-BNP aumentó 100% en RV y DS. La PSVI aumentó en RV12 (mmHg±ESM, Sh6: 126,4±6,6; Sh12: 113,0±5,5; RV6: 134,1±2,6; RV12: 175.3±7.1\*#; RV6/DS6: 132,9±2,0, \*p<0,001 vs Sh12; # p<0,05 vs RV6/DS6) y disminuyó en DS12 (mmHg±ESM, Sh6: 126,4±6,6; Sh12: 113,0±5,5; DS6: 107,6±4,0; DS12: 84,5±7,6\*#; DS6/RV6: 131,5±5,4, \*p<0,05 vs. Sh12; # p<0,01 vs DS6/RV6). La dP/dtmáx fue mayor en RV12 y disminuyó en DS (Sh6: 3894±515; Sh12: 2686±249; DS6: 2127±111\*; DS12: 1492±167\*; \*p< 0,05 vs Sh). Los resultados confirmarían que el ANF sería la hormona endócrina de defensa ante el aumento de la precarga y marcador de la sobrecarga de volumen. La función cardíaca en modelos combinados depende de la secuencia de las sobrecargas, siendo la última sobrecarga instaurada la que determina la evolución del proceso hipertrófico.

**0113. (0073) PARÁMETROS DE FUNCIÓN VENTRICULAR SISTÓLICA Y DIASTÓLICA EN MODELOS COMBINADOS DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL.** S Cavallero<sup>1</sup>, GE González<sup>2</sup>, I Seropian<sup>2</sup>, C Cerrudo<sup>1</sup>, J Palleiro<sup>2</sup>, RJ Gelpi<sup>2</sup>, BE Fernández<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Fisiopatología, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, 2 Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina. UBA- CONICET.*

Continuamos caracterizando modelos de hipertensión renovascular (RV) y DOCA-sal (DS) asociados sucesivamente en diferentes secuencias. Evaluamos función ventricular in vivo con catéter (n=5-8) y su relación con péptidos natriuréticos y parámetros morfométricos en ratas RV y DS de 2 semanas (RV2 y DS2), 4 semanas (RV4 y DS4), combinados RV2/DS2 y DS2/RV2 y sus sham (Sh2 y Sh4). Demostramos incremento de la presión sistólica del ventrículo izquierdo (VI) en RV de 2 y 4 semanas, sin cambios de presión diastólica final. La presión desarrollada del VI (PDVI) aumentó en RV2 y RV4 mientras que en RV2/DS2 no alcanzó diferencia significativa (Sh2: 101,2±4,1; Sh4: 114,4±6,1; RV2: 152,0±10,9\*; RV4: 178,8±18,2#; RV2/DS2: 141,3±8,6; \*p<0,05vsSh2, #p<0,01vsSh4). En los grupos DS no hubo cambios en la PDVI. La PDVI correlacionó con el ARNm ventricular de BNP en RV (r= 0,914; p<0,05) pero no en DS. La dP/dtmáx no varió a las 2 semanas en RV ni DS pero a las 4 semanas aumentó en RV y disminuyó en DS (Sh4: 3183±162; RV4: 4883±566#; DS4: 2333±248#; &p<0,05 y #p<0,01vsSh4), mientras que en los grupos combinados mostró el perfil característico de la última sobrecarga (RV2/DS2: 3472±131\*; DS2/RV2:

3593±286@; \*p<0,01vsRV4; @p<0,05vsDS4). Hubo una tendencia al deterioro de la relajación evaluada a través del T1/2 en RV2, que se normalizó en RV4 y RV2/DS2. En cambio, el T1/2 aumentó progresivamente en DS2 y DS4 y se normalizó en DS2/RV2 (T1/2: mseg±ESM, Sh2: 8,16±0,25; Sh4: 7,98±0,26; RV2: 10,76±0,68; RV4: 8,01±0,38; RV2/DS2: 7,03±0,28; DS2: 9,42±0,40; DS4: 9,87±0,59#; DS2/RV2: 8,35±0,34@; #p<0,01vsSh4; @p<0,05vsDS4). T1/2 correlacionó positivamente con la longitud de los miocitos en DS (r=0,877, p<0,05) pero no en RV. **Conclusión:** en el modelo DS la función ventricular se ve más afectada que en RV, que se evidencia por menor contractilidad y aumento del tiempo de relajación. En los modelos combinados la última sobrecarga instaurada determina la evolución de los parámetros funcionales.

**0114. (0327) EL SODIO AGRAVA LA INFLAMACIÓN TUBULAR RENAL AGUDA PROVOCADA POR ANGIOTENSINA II EN RATAS NORMALES.** SL Della Penna<sup>1</sup>, MI Rosón<sup>1</sup>, G Cao<sup>2</sup>, S Gorzalczy<sup>3</sup>, M Pandolfo<sup>4</sup>, JE Toblli<sup>2</sup>, BE Fernández<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán, 3 Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 4 Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

La angiotensina II (Ang II) es uno de los principales responsables del estrés oxidativo, inflamación y fibrosis presente en la hipertensión arterial. La sobrecarga salina en humanos y animales incrementa progresivamente la presión arterial (PA) y el daño renal. Nuestro objetivo fue analizar si el sodio es capaz de potenciar la inflamación tubular renal provocada por la administración aguda de dosis no hipertensoras per se de Ang II en ratas normales. Ratas Sprague-Dawley fueron infundidas durante 2 hs (0,04 mL.min<sup>-1</sup>) con y sin Ang II 0,1 y 5 µg.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Ang 0,1 y 5, respectivamente) junto con cuatro concentraciones sodio (Na 0.15M, Na 0,5M, Na 1,0M y Na 1,5M). Se estudió por inmunohistoquímica la expresión de marcadores de inflamación en corteza y médula renal. Se evaluaron PA media y parámetros de función renal. Los grupos Ang 0,1 fueron normotensos mientras que los grupos Ang 5 desarrollaron hipertensión-sodio-dependiente. Los resultados (X±ES) mostraron un aumento en la reabsorción tubular de sodio (RTNa) (mEq.min<sup>-1</sup>) versus su respectivo control, en los grupos: Ang II 0.1-Na 0.5 (516±99 vs 263±19, p<0.05) y Ang II 0.1-Na 1 (425±70 vs 289±18, p<0.05). La excreción urinaria disminuyó en los grupos Ang II 5-Na 0.5 (3.9±1.4 vs 10.8±1.7, p<0.05) y Ang II 5-Na 1 (14.1±3.1 vs 32.8±3.7, p<0.05). La PA media aumentó en los grupos Ang II 5-Na 1 (112±5 vs 85±1, p<0.05) y Ang II 5-Na 1,5 (139±7 vs 90±5, p<0.05). La inmunoexpresión tubular de Ang II, HIF-1α, RANTES y TGF-β1 aumentó en los grupos Ang II-Na respecto de los grupos Na (p<0.001). Este efecto estuvo asociado a un mayor filtrado glomerular y mayor RTNa. **Conclusión:** El sodio agrava la inflamación tubular renal provocada por Ang II, asociada a un mayor transporte tubular de sodio, independientemente del desarrollo de hipertensión. La inflamación tubular renal-sodio dependiente previa al desarrollo de hipertensión sería un factor potenciador para el desarrollo de la misma.

**0115. (0337) LA INFLAMACIÓN VASCULAR RENAL PROVOCADA POR ANGIOTENSINA II EN RATAS NORMALES ES POTENCIADA POR UNA SOBRECARGA SALINA.** SL Della Penna<sup>1</sup>, MI Rosón<sup>1</sup>, G Cao<sup>2</sup>, S Gorzalczy<sup>3</sup>, M Pandolfo<sup>4</sup>, JE Toblli<sup>2</sup>, BE Fernández<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán, 3 Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 4 Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Observamos previamente que una sobrecarga salina aguda produce la sobreexpresión de marcadores de inflamación en glomerulos, túbulos y vasculatura renales en ratas normales. Sien-

do la angiotensina II (Ang II) uno de los principales responsables de la inflamación vascular presente en la hipertensión arterial, nos propusimos analizar si una sobrecarga de sodio afecta la inflamación vascular renal provocada por la administración aguda de Ang II. Se infundieron ratas Sprague-Dawley durante 2 hs (0,04 mL.min<sup>-1</sup>) con y sin dosis no hipertensoras per se de Ang II en dos concentraciones: 0,1 y 5 µg.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> (Ang 0,1 y 5, respectivamente) junto con cuatro concentraciones de sodio (Na 0.15M, Na 0.5M, Na 1.0M y Na 1.5M). Se estudió por inmunohistoquímica la expresión de marcadores de inflamación en corteza y médula renal. Se evaluaron la presión arterial media (PAM) y parámetros de función renal. Los resultados (X±ES) mostraron un aumento (vs el respectivo control) en la reabsorción tubular de sodio (RTNa) (mEq.min<sup>-1</sup>), en los grupos: Ang II 0.1-Na 0.5 (516±99 vs 263±19, p<0.05) y Ang II 0.1-Na 1 (425±70 vs 289±18, p<0.05). La excreción urinaria disminuyó en los grupos Ang II 5-Na 0.5 (3.9±1.4 vs 10.8±1.7, p<0.05) y Ang II 5-Na 1 (14.1±3.1 vs 32.8±3.7, p<0.05). La PA media aumentó en los grupos Ang II 5-Na 1 (112±5 vs 85±1, p<0.05) y Ang II 5-Na 1,5 (139±7 vs 90±5, p<0.05). Los grupos Ang 0,1 fueron normotensos mientras que los grupos Ang 5 desarrollaron hipertensión de manera sodio-dependiente. La inmunoexpresión vascular de Ang II, HIF-1α, RANTES y TGF-β1 aumentó en los grupos Ang II-Na respecto de los grupos Na (p<0.001). **Conclusión:** La sobrecarga de sodio agrava la inflamación vascular renal provocada por Ang II, independientemente del desarrollo de hipertensión. La inflamación vascular renal-sodio dependiente, sumada a la inflamación tubular, previas al desarrollo de una hipertensión serían factores potenciadores del desarrollo de la misma.

**0116. (0155) EFECTO DE LOS HIDROLIZADOS PROTEICOS DE AMARANTO SOBRE LA PRESION ARTERIAL EN RATAS.** M Fritz<sup>1</sup>, B Vecchi<sup>1</sup>, MC Añon<sup>2</sup>, GJ Rinaldi<sup>3</sup>

*1 CIDCA - CONICET, 2 Facultad de Ciencias Exactas - UNLP - CIDCA - CONICET, 3 Facultad de Ciencias Exactas - UNLP - CIC - CONICET*

**Objetivos:** las proteínas presentes en los granos de amaranto mantegazianus podrían presentar péptidos inhibidores de la Enzima Conversora de Angiotensina (ECA). Intentamos poner de manifiesto el efecto hipotensor en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). **Métodos:** en 6 SHR y 6 Wistar se tomó la presión sistólica indirecta (PSI) durante 5 días, luego se les dio hidrolizado de amaranto (HA) (con alcalasa 4 Hs; 0,4 a 2,4 g/kg) por sonda orogástrica. Se midió la PSI antes y después del HA durante 6 horas. Adicionalmente se anestesiaron 11 SHR con pentobarbital sódico I.P. 50 mg/kg, colocando un catéter carotídeo para medir presión arterial directa media (PAM) y una gastrostomía para administración gástrica. Recuperadas de la anestesia (24 hs), se administró el HA por la sonda gástrica sin provocar alarma en el animal, y se midió la PAM periódicamente. Se realizaron además ensayos de inhibición enzimática utilizando ECA purificada en la cual se determinó la competencia ejercida por el HA con un sustrato sintético sobre su sitio activo. **Resultados:** en ratas Wistar no hubo cambios significativos en la PSI ni con HA. En las SHR se vio un descenso promedio de PSI de 30 mmHg a la tercer hora de administrar 2,4g/kg rata de HA (p<0.05). En las SHR instrumentadas crónicamente se vieron los siguientes efectos con HA:

Dosis gástrica (g/kg)	n	Caída de PAM (mmHg)	%
1,5 blanco fosfato	3	-15	-14
1,0 HA	2	-22	-17
1,5 HA	4	-51 (*)	-38
2,4 HA	2	-49 (*)	-36

(\*)= p<0.05

**Conclusiones:** la toma de PAM permitió confirmar un efecto hipotensor que con el control de PSI parecía menor. Los ensayos in vitro mostraron que aislados proteicos de amaranto tienen una capacidad moderada de inhibición de ECA, que se incrementa considerablemente luego de la hidrólisis con alcalasa. Estos re-

sultados apoyan el mecanismo de acción propuesto pero no descartan efectos cardíacos de los HA.

**0117. (0447) EL BLOQUEO DE LOS CANALES MITOCONDRIALES DE POTASIO SENSIBLES AL ATP (K-ATP) AUMENTA LA APERTURA DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (PTPM) EN CORAZONES PROVENIENTES DE RATAS AYUNADAS (AY) SOMETIDOS A ISQUEMIA (I)-REPERFUSIÓN (RP).** MG Marina Prendes, M González, ME Torresín, R Herman, E Keifman, N Infante, E Savino, A Varela

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

Trabajos anteriores demostraron que el 5-hidroxicoleico 100  $\mu$ M (HD), bloqueante de los K-ATP disminuye la recuperación funcional de corazones provenientes de ratas AY (24 hs) sometidos a I (25 min)-RP (30 min) sin modificar la viabilidad celular. En corazones provenientes de ratas alimentadas ad libitum, el HD no produce ningún efecto. El objetivo fue evaluar si los efectos del bloqueante en AY se acompañan de una mayor apertura del PTPM y de cambios en la actividad de la citrato sintetasa mitocondrial (CS) Para evaluar la apertura del PTPM se empleó el método de atrapamiento de 3H-desoxiglucosa (DG). Los corazones perfundidos Langendorff (n=8/grupo) fueron cargados 30 min con DG 0.5 mM (0.1  $\mu$ Ci/mL) seguidos de 13 min de perfusión sin DG previos a la I-RP. La DG entra al miocito, es convertida en DG-6P y no es metabolizada. Sólo penetra a la mitocondria cuando ocurre apertura del PTPM y sólo abandona la célula cuando ocurre necrosis. El HD fue administrado 13 min previos a la I hasta el final de la RP. Los corazones se homogeneizaron en Tris-ClH-sacarosa-EGTA-BSA, pH 7,4. El EGTA impide la liberación de DG en el proceso de aislamiento mitocondrial. La CS fue medida por método cinético. Los resultados fueron analizados con ANOVA. La captación mitocondrial de DG al finalizar la I-RP fue mayor en los corazones tratados con HD (83 $\pm$ 7vs69 $\pm$ 6 dpm mitocondrial x 105/ unidad de CS x dpm totales/gh p<0,05). La actividad de la CS no mostró diferencias significativas (HD: 12.75 $\pm$ 1.99 vs Control: 15.77 $\pm$ 2.01 UI/gh). El contenido celular de DG al final de la RP disminuyó en similar proporción en ambos grupos (Control: pre-isquémico: 138,14 $\pm$ 11,64, fin de RP 45,37  $\pm$ 3,47; HD: pre-isquémico: 106.62 $\pm$ 9,66, fin de RP: 29.07 $\pm$ 2.47 dpm totales x 103/gh). Los resultados sugieren que la menor capacidad de recuperación funcional en presencia de HD se acompaña de mayor apertura del PTPM. Los datos también indican que la mayor apertura del PTPM no necesariamente está asociada a una mayor necrosis celular.

## NEUROCIENCIAS I

**0118. (0850) ESTUDIO DE SINTOMAS DEPRESIVOS ANTENATALES Y FACTORES DE RIESGO PSICOSOCIALES EN SECTORES POPULARES.** SA Gobbi<sup>1</sup>, F Archuby<sup>1</sup>, NM Zelaschi<sup>1</sup>, LM Zieher<sup>2</sup>

*1 Hospital Dr. Alejandro Korn (Melchor Romero), 2 CONICET*

**Objetivo:** Estimar la prevalencia de síntomas depresivos en el embarazo en un grupo de mujeres de sectores populares que concurren al control prenatal y examinar si existen indicadores de relación. **Método:** 104 pacientes completaron la escala Hospitalaria de ansiedad (HAD)(Zigmong 1983) y se obtuvieron datos de las Historias Clínicas del Programa Materno Infantil de la Pcia. de Bs. As. 70 pacientes correspondían al Consultorio de Obstetricia y 34 al Consultorio de Embarazo de Alto Riesgo. Se utilizó métodos estadísticos no paramétricos de comparación de variables como prueba de Chi Cuadrado e índice de Spearman. **Resultados:** a) Consultorio de Obstetricia (n=70): edad promedio fue 23,56 años, DS: 5,46; la prevalencia estimada 40% (n=28); la ansiedad apareció comorbida en el 85% (n=24). La depresión aparece relacionada al embarazo no deseado (n=13) X2: 29,30

p<0,005. b) Consultorio de Alto Riesgo (n=34): edad promedio 27,35 años; DS:6,29; la prevalencia para depresión fue de 26,47% (n=9) y la ansiedad estuvo asociada en el 77,77% (n=7). El embarazo no deseado aparece relacionado con la depresión (n=8) X2: 22,96 p<0,005. Otros factores estudiados como el número de hijos anteriores no mostró diferencias significativas. **Conclusión:** Algunas variables psicosociales como el embarazo no deseado pueden ser considerados como predictores de morbilidad para el desarrollo de depresión antenatal

**0119. (0638) ACCIÓN DEL G-CSF SOBRE LA REVASCULARIZACIÓN POST-LESIONAL EN LA CORTEZA CEREBRAL DEL RATÓN.** MM López Vicchi, MM Castañeda, M Iribarne, AV Torbidoni, AM Suburo

*Facultad de Cs Biomédicas, Universidad Austral*

**Introducción:** Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que los ratones sometidos a lesiones devascularizantes de la corteza cerebral se recuperan más rápidamente cuando son tratados con granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). Entre otros efectos, este factor podría regular la revascularización de la zona isquémica. En consecuencia, estudiamos la organización vascular en la zona perilesional 5 días después de la devascularización, cuando ya se detectan diferencias en la recuperación motora de ratones tratados y controles. **Métodos:** Se utilizaron ratones C57Bl/6 que fueron sometidos a devascularización de las áreas M1, M2 y S1 de la corteza cerebral. Los ratones tratados (n = 5) recibieron 50mg/kg/día de G-CSF durante los 5 días posteriores a la cirugía. Los ratones controles (n = 4) recibieron idénticas inyecciones de solución salina. Los animales fueron sacrificados y se obtuvieron cortes por congelación del cerebro que fueron utilizados para detectar NADPH diaforasa. **Resultados:** La zona lesionada contenía gran número de perfiles vasculares carentes de media y adventicia, indicando un gran aumento de los trayectos vasculares con respecto al hemisferio contralateral. Además, el endotelio de los vasos perilesionales presentaba mayor actividad NADPH diaforasa que los contralaterales. En los controles, estos vasos eran de calibre muy grande e irregular, siendo su trayecto muy tortuoso. Después de G-CSF, los vasos perilesionales eran de calibre normal y trayecto recto. **Conclusión:** La lesión devascularizante resultó en un aumento de la formación de vasos perilesionales. La presencia de capilares de estructura normal en los animales tratados sugiere un mejor proceso de revascularización, probablemente debido a la llegada de precursores endoteliales liberados por G-CSF. El efecto neuroprotector también disminuiría la liberación local de las citoquinas pro-inflamatorias y pro-angiogénicas circulantes responsables de la aparición de neovasos irregulares.

**0120. (0529) EFECTO DE 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) SOBRE LA APOPTOSIS DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS.** D Radl, J Ferraris, S Zárate, G Jaita, G Eijo, V Zaldívar, A Seilicovich, D Pisera

*Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Hemos observado que la dopamina (DA) induce apoptosis de células adenohipofisarias previamente sensibilizadas por los estrógenos. La auto-oxidación de DA podría conducir a la formación de 6-OHDA, un metabolito oxidativo que induce muerte celular. La participación del transportador de DA (DAT) en la muerte inducida por 6-OHDA es controvertida. Con el objeto de evaluar si este metabolito está involucrado en la muerte de células adenohipofisarias inducida por DA, estudiamos la acción apoptótica de 6-OHDA (determinada por TUNEL) en cultivos primarios provenientes de ratas ovariectomizadas incubadas en presencia de vehículo (VEH) o 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10-9 M). 6-OHDA (10-6 M, 4 h) aumentó el porcentaje de células TUNEL positivas independientemente de la presencia de estrógenos (VEH: 2.2 % vs VEH+6-OHDA: 17.7, p<0.01; E2: 5.1 vs E2+6-OHDA: 10.3, p<0.01, chi2). Por otro lado evaluamos la participación de DAT en este efecto. El bloqueo de DAT (GBR12909, 10-8 M) inhibió

la apoptosis inducida por 6-OHDA (CONTROL: 3.5% vs 6-OHDA: 7.8,  $p < 0.01$ ; GBR: 3.1 vs 6-OHDA+GBR: 2.1, n.s,  $\chi^2$ ). Ha sido reportado que la DA induce apoptosis de células GH3 luego de su internalización por DAT. Por ello, estudiamos la participación de este transportador en la apoptosis de células adenohipofisarias (TUNEL) inducida por DA (10-6 M, 4 h). El bloqueo de DAT, no afectó la acción proapoptótica de la DA (CONTROL: 1.4% vs DA: 7.2,  $p < 0.01$ ; GBR: 1.2 vs GBR+DA: 6.4  $p < 0.01$ ,  $\chi^2$ ). A diferencia de lo que hemos observado con DA, el efecto proapoptótico de 6-OHDA es independiente de la presencia de estrógenos. Por otra parte, la internalización mediada por DAT es un proceso necesario para la inducción de apoptosis por 6-OHDA, mientras que este transportador no estaría involucrado en los efectos proapoptóticos de la DA. Estos resultados sugieren que la auto-oxidación a 6-OHDA no estaría involucrada en la apoptosis inducida por DA en células adenohipofisarias.

**0121. (0751) POSIBLE EFECTO TERAPÉUTICO DE LA MELATONINA EN EL DETERIORO COGNITIVO MÍNIMO: UN ESTUDIO RETROSPECTIVO.** AM Furio<sup>1</sup>, LI Brusco<sup>2</sup>, DP Cardinali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Neurociencias. Facultad de Medicina. UBA, <sup>2</sup> Facultad de medicina. UBA

El Deterioro Cognitivo Mínimo (DCM) es un síndrome caracterizado por alteraciones en la memoria que preceden a la demencia. Aproximadamente el 20% de los pacientes que presentan DCM progresan hacia Enfermedad de Alzheimer. En este estudio retrospectivo se evaluaron las funciones cognitivas de 50 pacientes, la mitad de los cuales habían recibido 3-9 mg de melatonina diaria 30 min antes del horario del sueño durante 9 a 18 meses, además de la medicación habitual. Los pacientes fueron evaluados inicialmente y al fin del tratamiento mediante una batería de test neuropsicológicos que incluyeron: Mini Mental test, Dígito Símbolo, ADAS, Trail A Y B y Rey Verbal. También se administró un inventario de Beck para evaluar depresión y un cuestionario de sueño y vigilia. Con excepción de Dígito Símbolo, los test neuropsicológicos mostraron una mejoría significativa  $p < 0.001$  después del tratamiento con melatonina y en comparación con el grupo control. (test no paramétrico Mann-Whitney U-test). De manera concomitante disminuyó el puntaje del inventario de Beck y de la escala de somnolencia ( $p < 0.01$ ) lo que indica una mejoría significativa del estado anímico y de la calidad sueño-vigilia. Estos resultados indican que la melatonina podría ser utilizada dentro del tratamiento del DCM como medicación adyuvante.

**0122. (0185) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE BCL-2 Y BAX EN NEUROBLASTOMAS HUMANOS SH-SY5Y TRATADOS CON ROTENONA. EFECTOS NEUROPROTECTORES ANEMOPOEGMA MIRANDUM (CATUABA).** D Valverde Gomes de Andrade<sup>1</sup>, D Oliveira<sup>1</sup>, GE Sampaio<sup>1</sup>, VR Boti<sup>2</sup>, E Saraceno<sup>3</sup>, H Coirini<sup>2,3</sup>, F Capani<sup>3</sup>, L Giraldez Alvarez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil., <sup>2</sup> Lab. Neurobiología, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CABA, Argentina, <sup>3</sup> Lab. Neurobiología, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, Argentina

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto neuroprotector de un extracto de Anemopoegma mirandum (CATUABA), en un modelo experimental de la Enfermedad de Parkinson (EP) mediante el análisis de la expresión de las proteínas Bcl-2 involucradas en procesos apoptóticos. El modelo de EP utilizado se basa en la aplicación del herbicida rotenona en cultivos de neuroblastomas humanos (NB-SY5Y). Las células fueron cultivadas a 37 °C en DMEM/F12 durante 72 horas a una densidad de 20.000 células/pozo y luego tratadas por 48 horas con rotenona 300 nM y/o el extracto de CATUABA disuelto en dimetilsulfóxido a las concentraciones de 0.031; 0.625 y 1.25 mg/μl. La viabilidad celular fue cuantificada usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-

il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT). Para evaluar la apoptosis se analizó la expresión de las proteínas Bcl-2 y Bax mediante immunoblotting. Cuando los NB-SY5Y fueron tratados con rotenona 300 nM se observó una mortalidad del 35% respecto a los controles. Cuando los NB-SY5Y fueron tratados con rotenona en presencia del extracto de CATUABA no se observó mortalidad celular o cambios morfológicos estadísticamente significativos con respecto a los controles tanto al microscopio óptico como electrónico ( $p < 0,01$ , control vs. tratados). El extracto de catuaba no causó efectos citotóxicos significativos en las concentraciones estudiadas. Nuestros resultados también mostraron una regulación negativa de Bax y una regulación positiva de Bcl-2, indicando que los extractos de Anemopoegma mirandum (CATUABA) podrían presentar un posible potencial farmacológico para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson que involucre procesos apoptóticos mediados por la familia de proteínas Bax o Bcl-2. Supported by PRODOC/FAPESB 016/2004, FAPESB/CNPq 159/2003, M020, ANPCYT 15001, PID 5784.

**0123. (0305) ALTERACIONES EN EL RECEPTOR DOPAMINERGICO DE TIPO 1 EN MÉDULA ESPINAL CERVICAL DE RATAS SOMETIDAS A HIPOXIA-ISQUEMIA PERINATAL.** VB Dorfman, MC Vega, J Barutta, H Coirini

Laboratorio de Neurobiología, Instituto de Biología y Medicina Experimental

Alteraciones en la vías dopaminérgicas han sido descritas en individuos con fenómenos hipóxico-isquémicos cerebrales y/o que presentan trastornos espásticos. Ratas sometidas a hipoxia neonatal presentan en edad adulta una reducción en el número de receptores para dopamina D1 (RD1) y D2 (RD2) en corteza cerebral y estriado. En el presente estudio evaluamos ambos receptores en la médula espinal cervical (MEC) de ratas sometidas a Hipoxia-Isquemia global, en Normotermia (HIN), con un tratamiento Hipotérmico Post HIN (HPH), en Hipotermia (HIP) y controles (CTL). Los estudios se realizaron mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra RD1 y contra RD2 en cortes coronales de MEC de ratas macho de 60 días de edad. En todos los tejidos se observó inmunoreactividad específica para ambos receptores en motoneuronas, mientras que solo para RD1 en neuronas de las láminas II y III. En esta región, los animales HIN presentaron una disminución significativa del área reactiva (CTL= 60±2 μm<sup>2</sup>, HIN= 49±1 μm<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ ), con un aumento significativo del 21% en la inmunomarcación. Los tejidos HIP y/o HPH no presentaron alteraciones respecto al CTL. Una respuesta similar para RD1 se observó en las motoneuronas (HIN presentó un aumento significativo del 20% respecto CTL), sin embargo el área reactiva aumentó en todos los grupos experimentales (CTL= 838±60 μm<sup>2</sup>, HIN= 735±137 μm<sup>2</sup>, HIP= 900±53 μm<sup>2</sup>, HPH= 769±14 μm<sup>2</sup>) El análisis de RD2 no mostró cambios significativos entre los 4 grupos para ningún parámetro evaluado. Los cambios observados en el RD1 podrían indicar la participación de este neurotransmisor en fenómenos hipóxico-isquémicos y abren un camino para su estudio en individuos con trastornos de espasticidad, debiendo considerarse a la modulación de los receptores para dopamina dentro de los procedimientos terapéuticos para dicha patología. Además, estos resultados ratifican el rol protector previamente descrito, de la hipotermia frente a la hipoxia (PIP5349, UBACYT M020).

**0124. (0104) EL BLOQUEO DEL RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES (GR) RESTAURA LA NEUROGÉNESIS EN EL HIPOCAMPO DE RATONES DIABÉTICOS.** J Beauquis<sup>1</sup>, P Roig<sup>1</sup>, Y Revsin<sup>2</sup>, ER De Kloet<sup>2</sup>, F Homo-Delarche<sup>3</sup>, F Saravia<sup>1, 4</sup>, AF De Nicola<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490 (1428) Buenos Aires, <sup>2</sup> Dept of Medical Pharmacology, Leiden University, Holanda, <sup>3</sup> CNRS 7059, Université Paris VII, Paris, Francia, <sup>4</sup> Dpto de Bioquímica Humana, Fac de Medicina UBA.

La encefalopatía de la diabetes mellitus semeja a la encontrada en el stress y la depresión. Nuestro grupo publicó que la

neurogénesis (NG) del giro dentado, evento ligado al aprendizaje dependiente del hipocampo y reducido en el stress, se encuentra disminuida en animales con diabetes tipo 1 (T1D). Los glucocorticoides son considerados moduladores negativos de la NG. En T1D, la corticosterona plasmática resultó elevada, el ritmo circadiano está ausente y la respuesta de la adrenal a la ACTH in vitro está aumentada, convirtiendo al overdrive glucocorticoide en un factor responsable de la inhibición de la NG. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible reversión de este fenómeno mediante la administración de un antagonista GR. R ratones machos C57Bl6 con T1D por estreptozotocina y sus controles se trataron con RU486 (Mifepristone, 6 mg/ratón) o con vehículo por 10 días. Se administró bromodesoxiuridina (BrdU, 65 mg/kg/dosis) durante los últimos 5 días para estudiar la diferenciación de las células proliferantes. Se determinó la proliferación celular en el giro dentado mediante inmunomarcación para Ki67 y se encontró una disminución en los animales diabéticos y una recuperación por el tratamiento con RU486 (células Ki67+ por giro dentado, controles 2889.0±289.7; controles+RU 2591.0±171.1; diabéticos 1472.0±195.0,  $p < 0.01$  vs. controles; diabéticos+RU 2550.0±303.0,  $p < 0.05$  vs. diabéticos). La diferenciación de las nuevas células hacia neuronas se estudió por inmunofluorescencia para BrdU y NeuN y microscopía confocal. En los animales diabéticos se encontró una menor diferenciación y el RU486 logró una reversión hacia valores controles. En la literatura se sugieren numerosos factores que regularían la NG en el giro dentado. Los resultados actuales en T1D postulan a los glucocorticoides y GR como responsables de la inhibición de la proliferación neuronal en el hipocampo, en forma semejante a resultados publicados en animales controles tratados con glucocorticoides.

**0125. (0439) ESTUDIO FUNCIONAL DE RECEPTORES RECOMBINANTES ALPHA9ALPHA10 CON MUTACIONES EN EL SITIO DE UNIÓN DE ACETILCOLINA.** J Savino, PV Plazas, E Katz, AB Elgoyhen

INGEBI-CONICET

Una característica conservada de todos los receptores nicotínicos es la presencia de un puente disulfuro formado por dos cisteínas adyacentes, en la región del sitio de unión de acetilcolina (ACh). Con el objetivo de estudiar el papel de dichos residuos en la función del receptor  $\alpha 9\alpha 10$  se reemplazaron estas cisteínas por serinas (C192S, C193S) mediante mutagenesis dirigida y se expresaron las subunidades mutantes en oocitos de *Xenopus laevis*. Las corrientes producidas por la aplicación de ACh se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos. La presencia de la mutación disminuyó la sensibilidad a ACh y aumentó el coeficiente de Hill ( $\alpha 9\alpha 10^*$ :  $EC_{50} = 107 \pm 7.6 \mu M$ ,  $n_H = 1.14 \pm 0.07$ ,  $n=3$ ;  $\alpha 9^*\alpha 10$ :  $EC_{50} = 146.7 \pm 5.6 \mu M$ ,  $n_H = 1.26 \pm 0.05$ ,  $n=5$ ). La sensibilidad al antagonista nicotina resultó afectada observándose un aumento en la  $IC_{50}$  ( $\alpha 9\alpha 10^*$ :  $IC_{50} = 63.67 \pm 17.7 \mu M$ ,  $n=2$ ;  $\alpha 9^*\alpha 10$ :  $IC_{50} = 50.11 \mu M$ ,  $n=1$ ). Se observó también una disminución en la potencia de otros antagonistas sobre el receptor mutante  $\alpha 9\alpha 10^*$  (Estricnina  $IC_{50} = 46.3 \pm 12.5 nM$ ,  $n=2$ ; Atropina  $IC_{50} = 2.4 \pm 0.8 \mu M$ ,  $n=2$ ; Muscarina  $IC_{50} > 100 \mu M$ ,  $n=1$ ). La tasa de desensibilización se mantuvo en  $\alpha 9^*\alpha 10$  ( $I_{20sec}/I_{pico} = 39.7 \pm 3.9\%$ ,  $n=2$ ) pero disminuyó en  $\alpha 9\alpha 10^*$  ( $90.6 \pm 5.5\%$ ,  $n=3$ ). Se registraron las corrientes producidas por ACh antes y después de la incubación con un quelante de  $Ca^{2+}$ . Se observó que el porcentaje de la corriente remanente en los mutantes es similar al del receptor salvaje ( $\alpha 9^*\alpha 10 = 5.98 \pm 1.1\%$ ,  $n=4$ ) demostrando que se mantiene la elevada permeabilidad al calcio del receptor. Por último, no se observaron diferencias en la sensibilidad al voltaje entre los receptores mutantes y los salvajes, obteniéndose curvas I-V similares. En conclusión, la mutación C192S/C193S en el receptor  $\alpha 9\alpha 10$ , estaría afectando la afinidad del sitio de binding o el *gating* del canal, sin alterar otras características. Asimismo, tanto la subunidad  $\alpha 9$  como la  $\alpha 10$  pueden aportar la doble C-C al sitio principal de unión al agonista.

**0126. (0176) ACCIÓN DE LAS AFERENCIAS DEL GLOBO PÁLIDO Y DE LA SUSTANCIA NEGRA RETICULADA SOBRE**

**LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DEL NÚCLEO RETICULAR DEL TÁLAMO Y DE ESTE SOBRE LOS NÚCLEOS MOTORES TALÁMICOS.** B Fillipini, S Cipollone, MJ Lomastro, MJ Decono-Ambesi, JH Pazo

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Laboratorio de Neurofisiología. Paraguay 2155, Buenos Aires. Argentina

El globo pálido (GP) y la sustancia negra reticulada (SNr) proyectan directamente al núcleo reticular del tálamo (NRT), pero su papel funcional no se ha establecido. Estudios previos de este laboratorio demostramos que la activación eléctrica y química del GP ventral inhibe la actividad espontánea del NRT. Nuestro objetivo fue el de profundizar estos estudios y extenderlo a los núcleos motores del tálamo (VL-VM). Los experimentos se realizaron en ratas anestesiadas con uretano (1,2 g/kg, i.p.). Se registró con microelectrodos en el NRT y VL-VM. Se estimuló con electrodos concéntricos el GP, la SNr y el NRT. De las 30 neuronas estudiadas del NRT, 10 de 11 respondieron a ambos núcleos. 10 respondieron a la estimulación del GP (91%) y solo 3 neuronas a la SNr, de estas, 2 se inhibieron por la activación de la SNr y del GP y la restante fue excitada por ambos. De las neuronas del NRT que responden a la SNr (20), el 25% fueron inhibidas (ANOVA, Dunnett test  $P < 0.05$ ) y el 15% fueron inhibidas-excitadas (ANOVA, Dunnett test  $P < 0.05$ ) y el 55% no responden. El 28% de las neuronas del NRT que responden al GP (18) fueron inhibidas y el 50% inhibidas-excitadas (ANOVA, Dunnett test  $P < 0.05$ ), con 11% que no responden. La estimulación del GP excita a las neuronas del VL-VM que son inhibidas por la estimulación del NRT (6 neuronas). De lo anterior concluimos que la aferencia del GP al NRT sería funcionalmente la más importante y que no hay prácticamente convergencia de ambas aferencias (GP y SNr) sobre las neuronas del NRT. El efecto predominante del GP es la inhibición, 78% de las neuronas del NRT que responden al GP y solo el 40% de las neuronas que responden a la SNr. Este efecto inhibitorio del GP concuerda con experimentos preliminares de estimulación del GP con microinyecciones de bicuculina (antagonista gabaérgico). Por otra parte la acción excitatoria del GP sobre los núcleos motores se realizaría a través de la inhibición del NRT.

**0127. (0472) ANESTÉSICOS VOLÁTILES Y ETANOL: SU EFECTO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL CYP2E1 Y LA NADPH P450 REDUCTASA EN CEREBRO DE RATÓN.** JV Lavandera<sup>1</sup>, A Battle<sup>1</sup>, AM Buzaleh<sup>1,2</sup>

1 CIPYP (CONICET), 2 DEPTO. QUIMICA BIOLOGICA, FCEN, UBA

En cerebro, los citocromos P450 (CYPs) metabolizan drogas que cruzan la barrera hematoencefálica y la NADPH P450 reductasa (CPR) aporta equivalentes de reducción. Previamente estudiamos el efecto de agentes porfirinogénicos como anestésicos volátiles, etanol y ayuno sobre el sistema metabolizante de Fase I en cerebro. El isoflurano y el ayuno redujeron el contenido de CYP mitocondrial, sin alterar el microsomal; el etanol no causó cambios. La actividad microsomal de CPR se indujo por enflurano, isoflurano y ayuno. El objetivo fue evaluar la participación del CYP2E1 en la metabolización de anestésicos volátiles y etanol o frente al ayuno en cerebro. Se midió la actividad de CYP2E1 con p-nitrofenol como sustrato y su expresión por Western Blot en mitocondria y microsomas de encéfalo de ratones tratados con enflurano, isoflurano, etanol o ayunados 24 hs. Dado las alteraciones en la actividad de CPR, se investigó si se producían modificaciones en su expresión. En mitocondria, la actividad de CYP2E1 se indujo 100% ( $p < 0.05$ ) (Act. Esp. control 197,7±55,7 nmol/mg) por enflurano agudo o ayuno; isoflurano y etanol no alteraron la actividad. En microsomas, la actividad de CYP2E1 se indujo 8 veces ( $p < 0.05$ ) (Act. Esp. control 75,5±28,5 nmol/mg) por efecto del etanol. La expresión del CYP2E1 en microsomas se redujo 50% por enflurano, no observándose variaciones en mitocondria. El etanol disminuyó 50% la expresión del CYP2E1 en mitocondria; en microsomas produjo el efecto

contrario. No hubo variaciones por el ayuno. La expresión de CPR se indujo 2 veces por enflurano agudo. Los resultados indicarían que CYP2E1 en cerebro, como en hígado, participa metabolizando las drogas estudiadas, con un comportamiento diferencial entre enflurano e isoflurano y entre mitocondria y microsomas, confirmando nuestros resultados previos. Una variación en la expresión de CYP2E1 se asocia con estrés oxidativo y podría relacionarse con el desencadenamiento del ataque agudo en porfirias por drogas.

**0128. (0523) ROL DE LA MELATONINA SOBRE LA RESACA ALCOHOLICA. DIFERENCIAS ENTRE SEXOS Y EFECTOS DE LA OVARIECTOMÍA.** AG Karadayian, ME Pallarés, MN Gobetto, A Lizuain, PA Scacchi Bernasconi, RA Cutrera

*Laboratorio de Neurobiología y Ritmos. Dpto de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA*

La resaca alcohólica presenta síntomas desagradables que tienen lugar luego de una ingesta aguda de alcohol. En animales experimentales se observan alteraciones a distinto nivel. Las comportamentales comprometen el desempeño neuromuscular, entre otras. Por otra parte, es conocida la acción de la melatonina como agente neuroprotector y antioxidante. En un trabajo previo, demostramos que la melatonina revertía los efectos de la resaca alcohólica en ratones machos pero no en hembras. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si los efectos diferenciales de la melatonina tenían relación con la presencia de estrógenos. Ratones de la cepa Swiss, de dos meses de edad fueron divididos en dos grupos: hembras intactas y hembras ovariectomizadas (OVX). A su vez, se subdividieron como sigue: VEH-SAL, VEH-OH (alcohol 3.8 g/Kg. BW al 15%*p/v*), MT-SAL (melatonina 10mg/Kg. BW) Y MEL-OH, con un intervalo de 15 minutos entre ambas inyecciones *i.p.* Se evaluó el desempeño neuromuscular mediante la prueba comportamental de cuerda floja, (tight rope) 6 horas luego de las inyecciones (alcoholemia=0). Los datos fueron analizados con la prueba estadística de Mann Whitney. En el grupo de las hembras intactas, el OH disminuyó significativamente el desempeño en la cuerda floja ( $p < 0.001$  VEH-OH vs VEH-SAL) y esto empeoraba al suministrar además MEL ( $P = 0.019$ ). Sin embargo, al realizar la OVX se observó que la performance mejoró significativamente cuando se comparó este grupo (OVX) con los intactos respecto al tratamiento MEL-OH ( $p < 0.001$ ). Además, dentro del grupo OVX también se observó un mejor desempeño cuando se lo comparó con el tratamiento VEH-OH ( $p < 0.003$ ). Los presentes resultados sugieren que la melatonina contrarresta los efectos deletéreos de la resaca alcohólica, mejorando la coordinación neuromuscular, solo en ausencia de estrógenos.

**0129. (0048) LA ALFA-MSH MODULA LA EXPRESIÓN DE TNF-ALFA E IL-1BETA PERO NO DE SUS RECEPTORES EN ASTROCITOS Y NEURONAS EN CULTIVO.** C Caruso<sup>1</sup>, MC Perez<sup>1</sup>, D Durand<sup>1</sup>, M Sánchez<sup>2</sup>, T Scimonelli<sup>3</sup>, M Lasaga<sup>1</sup>

*1 IIdIR, Facultad de Medicina, UBA, 2 CEPROCOR, Córdoba, 3 Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, UNC*

La hormona alfa-melanocito estimulante ( $\alpha$ -MSH) es una melanocortina que posee propiedades anti-inflamatorias. Previamente hemos demostrado que el  $\alpha$ -MSH disminuye la síntesis de NO y prostaglandinas a través de los receptores para melanocortinas 4 (MC4R). Recientemente demostramos que el  $\alpha$ -MSH ejerce este efecto anti-inflamatorio directamente en astrocitos en cultivo y también a través de los MC4R (Caruso y col *Endocrinology* 2007). Dado que los astrocitos y las neuronas tienen diferentes respuestas al mismo estímulo inflamatorio, investigamos el efecto del tratamiento por 24 h con lipopolisacárido bacteriano (LPS, 1 mg/ml) más interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , 50 ng/ml) y de la  $\alpha$ -MSH (5 mM) sobre la expresión del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) y sus receptores (TNFR1 y 2) y de la interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y su receptor (IL-1R1) por RT-PCR y Western Blot en cultivos primarios de astrocitos y neuronas hipotálamicas de rata. En astrocitos, los niveles de TNF- $\alpha$  y del TNFR2 fueron aumentados por el tratamiento con LPS+IFN- $\gamma$ ,

mientras que los niveles del TNFR1 no fueron modificados. La presencia de  $\alpha$ -MSH redujo significativamente el efecto del LPS+IFN- $\gamma$  sobre la expresión del TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), mientras que no modificó el efecto del LPS+IFN- $\gamma$  sobre la expresión del TNFR2. El efecto anti-inflamatorio de la  $\alpha$ -MSH sobre la expresión del TNF- $\alpha$ , no se observó en presencia de un antagonista selectivo de los receptores MC4R (HS024 0,5  $\mu$ M). LPS+IFN- $\gamma$  aumentó la expresión de TNF- $\alpha$ , TNFR1 y TNFR2 en neuronas hipotálamicas y la  $\alpha$ -MSH redujo la expresión del TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ). La expresión de IL-1 $\beta$  y del IL-1R1 fue inducida por LPS+IFN- $\gamma$ . La  $\alpha$ -MSH redujo el efecto del LPS+IFN- $\gamma$  sobre IL-1 $\beta$ , pero no tuvo efecto sobre IL-1R1. El antagonista de MC4R previno el efecto de la  $\alpha$ -MSH. Estos resultados sugieren que la  $\alpha$ -MSH ejerce una acción anti-inflamatoria en astrocitos y en neuronas que involucra la activación de los MC4Rs.

**0130. (0174) PAPEL DE ALGUNAS ESTRUCTURAS SUBCORTICALES EN LA ACCIÓN ANALGÉSICA DEL ESTRIADO.** JH Pazo<sup>1</sup>, AC Barceló<sup>2</sup>, B Fillipini<sup>1</sup>

*1 Depto. de Fisiología, Laboratorio de Neurofisiología, Facultad de Medicina, UBA. Paraguay 2155. Buenos Aires, 2 Facultad de Odontología, Cátedra de Fisiología, UBA*

Trabajos previos del laboratorio demostramos que la estimulación del estriado, produce inhibición del reflejo nociceptivo de abertura bucal (RAB), inducido por la estimulación de la pulpa dentaria de los incisivos de la rata. Esta acción es mediada por la activación de los receptores D2. Nuestro objetivo fue el de establecer las vías neurales que median ese efecto. Los estudios se realizaron en ratas anestesiadas con uretano (1,2-1,3 g/kg, *i.p.*). Se estimuló eléctricamente la pulpa dentaria de los incisivos con electrodos de plata de 0,5 mm de  $\phi$ . Se registró la actividad electromiográfica del vientre anterior de digastrico (RAB), con electrodos de acero inoxidable. Se hicieron lesiones electrofíticas y con kaínico en las estructuras neurales analizadas. El estriado se estimuló con una microinyección de apomorfina (APO.7  $\mu$ g/0.5  $\mu$ l). Los sitios estimulados y de lesión se verificaron mediante cortes histológicos. La lesión electrofítica del globo pálido ipsilateral al estriado activado, suprime significativamente el efecto inhibitor del RAB (control 100  $\pm$  5.8%; post-APO 25.8  $\pm$  6.7; post-lesion 95.5  $\pm$  3.9%, ANOVA una vía, Dunnet test  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ), lo mismo ocurre con la lesión ipsilateral de la SNr (control 100  $\pm$  12%; post-APO 21.5%; post-lesion 84.8  $\pm$  10.7%, ANOVA, Dunnett test  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) y del núcleo subtalámico (control 100  $\pm$  7.8; post-APO 53.3  $\pm$  8.9 %, ANOVA, Dunnett test  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) Por otra parte, la lesión bilateral de los núcleos rostroventrales del bulbo suprimen también el efecto analgésico estriatal, pero no así la lesión ipsilateral. Lo mismo se obtiene con la lesión crónica con ácido kaínico de esas estructuras, en los cuales la APO no produce inhibición del RAB. Concluimos que la acción del estriado se realizaría por la vía indirecta y cuya vía final son los núcleos rostroventromediales del bulbo conectados con los núcleos sensoriales del trigémino.

**0131. (0109) VARIACIONES CIRCADIANAS DE GENES RELOJ EN LA RETINA DEL HAMSTER DORADO.** N de Zavalía<sup>1</sup>, M Chianelli<sup>1</sup>, DC Fernandez<sup>1</sup>, HJ Aldana<sup>3</sup>, DA Golombek<sup>2</sup>, RE Rosenstein<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Depto de Bioquímica Humana, Fac. de Medicina, UBA, 2 Laboratorio de Cronobiología, Universidad Nacional de Quilmes, 3 Universidad de Morón*

El principal componente del reloj biológico en mamíferos son los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo. En forma reciente se ha descrito la existencia de un reloj "periférico", independiente del reloj central, en la retina de diversas especies. El engrama molecular del reloj circadiano, al menos para los NSQ, involucra una serie de mecanismos de retroalimentación negativa entre genes específicos. El modelo clásico consiste en una rama positiva, que en mamíferos está representada por el factor de transcripción constituido por el dímero Clock/Bmal, capaz de

activar la transcripción de diversos genes regulados circadianamente. El objetivo de este trabajo fue estudiar las variaciones circadianas de los niveles retinianos de CLOCK y BMAL en animales control y en animales con lesión de los NSQ, e identificar los tipos celulares retinianos en los que se expresan estos genes reloj. Para ello, se utilizaron hámsteres dorados macho control o lesionados, mantenidos en luz: oscuridad (L:D, 6 h:20 h) o en oscuridad constante (D:D) por 48 h antes del sacrificio. Se determinaron los niveles de CLOCK y BMAL (por Western blot) en fracción nuclear y citoplasmática de retinas de animales sacrificados a mediodía o medianoche y a mediodía o medianoche subjetivos. Los niveles nucleares de CLOCK y BMAL fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente) a mediodía que a medianoche en animales control. La variación de estos parámetros persistió en D:D ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente) tanto en animales control como en animales lesionados. No se observaron cambios diarios en los niveles citoplasmáticos de CLOCK y BMAL en L:D o en D:D en animales control. Se observó expresión (por inmunohistoquímica) de CLOCK y de BMAL sólo en las células ganglionares retinianas. Estos resultados sugieren que la expresión circadiana de Clock y de Bmal en la retina está regulada por un reloj local, presumiblemente localizado en las células ganglionares.

**0132. (0423) DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE PATRONES ELECTROCLINICOS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS HIPOCAMPAL PLUS.** B Giagante<sup>1</sup>, D Consalvo<sup>1</sup>, S Oddo<sup>1</sup>, C Papayanis<sup>1</sup>, M Kauffman<sup>1</sup>, W Silva<sup>2</sup>, L D Alessio<sup>1</sup>, P Solis<sup>1</sup>, E Centurion<sup>1</sup>, P Saidon<sup>1</sup>, S Kochen<sup>3</sup>

*1 Centro de Epilepsia, Div Neurología, Htal JM Ramos Mejía. Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof Dr Eduardo de Robertis. UBA, 2 Servicio de Neurología Infantil, Htal Italiano de Bs As, 3 CEFYBO. CONICET*

**Objetivo:** Analizar las manifestaciones clínicas y el EEG ictal en pacientes con esclerosis hipocámpal asociada a anomalías del polo temporal (EH Plus), evidenciadas por imágenes de resonancia magnética. **Material y Método:** Revisamos 53 registros de video-EEG ictales de 14 pacientes con EH-Plus, en los que se realizó una lobectomía temporal. Analizamos las características eléctricas de los primeros 30 segundos del inicio de las crisis. De acuerdo a la localización inicial, clasificamos a la actividad eléctrica en: Tipo 1: temporal unilateral; Tipo 2: temporal unilateral + electrodos frontales contiguos; Tipo 3: actividad eléctrica no lateralizadora. De acuerdo a la morfología clasificamos a la actividad eléctrica en 3 subtipos: a) actividad rítmica (AR) a 5-9 Hz; b) actividad rápida de bajo voltaje, seguida de AR 5-9 Hz.; c) descarga de Ondas Agudas. Analizamos las manifestaciones clínicas ictales y postictales, y la secuencia de aparición de los síntomas. **Resultados:** Considerando la localización y morfología de la actividad eléctrica, los patrones eléctricos más frecuentes fueron: tipo 1 (59%), tipo 2 (35%), y subtipo (a) 60%, subtipo (b) 31%, subtipo (c) 9%. Las manifestaciones clínicas más frecuentes fueron: presencia de un aura (sensación epigástrica 40%, miedo 40%, deja vu 40%); automatismos oro-deglutorios (65%); automatismos manuales unilaterales (55%), inmovilidad y mirada fija (45%). La secuencia de manifestaciones clínicas observada en el inicio de las crisis fue: aura@inmovilidad-automatismos oroalimentarios-automatismos manuales repetitivos. **Conclusión:** La identificación de patrones electro-clínicos ictales específicos resulta una herramienta no invasiva de gran utilidad en la determinación de la zona epileptógena en este grupo de pacientes.

## INMUNOLOGÍA I

**0133. (0171) EL TRATAMIENTO CON EL AGENTE BIOLÓGICO INFLIXIMAB (ANTI-FACTOR DE NECROSIS TUMORAL-ALFA) DISMINUYE LA SEVERIDAD DE LA MIOCARDITIS CHAGÁSICA CRÓNICA Y NO PRODUCE REACTIVACIÓN PARASITOLÓGICA EVIDENTE.** AR Pérez<sup>1</sup>, AL Nocito<sup>2</sup>, E Serra<sup>3</sup>, M Rosemffet<sup>4</sup>, S Revelli<sup>1</sup>, O Bottasso<sup>1</sup>

*1 Instituto de Inmunología, Fac. Cs. Médicas, UNR, 2 Cátedra de Anatomía Patológica, Fac. Cs. Médicas, UNR, 3 IBR, CONICET, 4 Servicio de Reumatología, IREP, Bs As.*

El Factor de Necrosis tumoral-alfa (FNT- $\alpha$ ) es crucial en la resistencia contra la infección aguda con *Trypanosoma cruzi*, pero su rol en la fase crónica es poco conocido. Dado que la terapia con agentes bloqueantes del FNT- $\alpha$  puede reactivar infecciones causadas por otros patógenos intracelulares, examinamos los efectos del tratamiento con Infliximab durante la infección chagásica crónica experimental (90 días post-desafío con el parásito). Se estudiaron 4 grupos de ratas "I" (6 machos/grupo): no infectadas (Co), no infectadas y tratadas (I), infectadas y no tratadas (Tc) e infectadas y tratadas (Tc+I). El agente bloqueante se administró durante 4 semanas (3 mg/kg/semana; intraperitoneal). Las ratas no tratadas recibieron solución fisiológica. Pre y post tratamiento (90 y 125 días post-infección respectivamente) se investigó la presencia en sangre de kDNA (PCR), anti-cuerpos específicos (SAPA, ELISA), óxido nítrico (Griess) y parásitos (método directo -Strout- e indirecto -xenodiagnóstico-). También se analizó la histología del miocardio post-tratamiento. Tras la terapia con Infliximab no se observaron parásitos en sangre ni en miocardio, si bien la detección de kDNA en sangre fue positiva en Tc y Tc+I. Dichos grupos no difirieron en los niveles de óxido nítrico circulante. El grupo Tc+I mostró mayores niveles de anticuerpos anti-SAPA ( $p < 0.05$ ) y una atenuación del daño histológico ( $p < 0.02$ ), respecto del grupo Tc. El bloqueo del FNT- $\alpha$  durante el período crónico no produce reactivación parasitológica evidente; y el menor daño tisular de los animales Tc+I plantea un rol de esta citocina en la patogénesis de la miocarditis crónica.

**0134. (0679) RESPUESTA CELULAR T CD8+ POLIFUNCIONAL DE MEMORIA ESPECÍFICA PARA EPITOPES PROMISCUOS DERIVADOS DE LA FAMILIA DE LAS TRANSIALIDASAS DEL TRYPANOSOMA CRUZI.** SA Laucella<sup>1</sup>, MG Alvarez<sup>2</sup>, M Postan<sup>1</sup>, B Weatherly<sup>3</sup>, A Armentí<sup>2</sup>, B Loccoco<sup>2</sup>, J Sidney<sup>4</sup>, C Olivera<sup>1</sup>, RL Tarleton<sup>3</sup>

*1 Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén, Bs. As., Argentina, 2 Hospital Eva Perón, San Martín, Prov. Bs. As., Argentina, 3 Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, USA., 4 La Jolla Institute of Allergy and Immunology, La Jolla, USA.*

Anteriormente se describió la identificación de epitopes derivados de la familia de las transialidasas del *T. cruzi* como blancos de la respuesta celular T CD8<sup>+</sup> restringida al haplotipo HLA-A02.1 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Estos epitopes presentan alta afinidad de unión a distintas moléculas de histocompatibilidad HLA-A02 (supertipos). Para medir la respuesta celular T CD8<sup>+</sup> en un rango más amplio de haplotipos, en este estudio identificamos epitopes derivados de transialidasas capaces de ser presentados en contexto de los 6 supertipos clase I más comunes. Sobre el total de secuencias crudas de transialidasas del genoma del *T. cruzi* se aplicó un algoritmo para predecir epitopes pertenecientes a los supertipos HLA A01, A02, A03, A24, B07 y B44. Células mononucleares periféricas provenientes de 25 pacientes sin cardiopatía fueron estimuladas con "pools" de péptidos para los distintos supertipos, ensayándose un total de 96 epitopes por ELISPOT para IFN- $\gamma$ . Trece de 25 (52%) pacientes mostraron respuesta positiva a uno o más pools de péptidos ensayados. Las respuestas restringidas por los supertipos HLA-A02 y HLA03 cubrieron el 77% de las respuestas positivas. Para realizar una caracterización funcional más amplia de la respuesta celular T de memoria específica para *T. cruzi* se determinó, simultáneamente por ELISPOT, la frecuencia de linfocitos T productores de IL-2 e IFN- $\gamma$  ante el estímulo con 15 péptidos individuales con afinidad de unión al supertipo HLA-A2 y con lisado de amastigotes del *T. cruzi*. Sólo un 25% de los pacientes evaluados mostraron ELISPOT positivos para IL-2. La estimulación con el lisado mostró resultados similares demostrando que ambos compartimentos celulares T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> de

memoria específica para *T. cruzi* contienen una baja frecuencia de linfocitos T de memoria central productores de IL-2. Estos epitopes podrían ser de utilidad para el monitoreo de la respuesta celular T CD8<sup>+</sup> en pacientes con enfermedad de Chagas.

**0135. (0685). DESVIO A ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS T HELPER 2 EN LAGRIMAS DE CONJUNTIVITIS INFECCIOSA DE LARGA EVOLUCION.** ME Ferro, E Sierralta, N Carle, R Carrizo, A Maldonado Bas

*Inmunología. Fac. Cs. Químicas. Univ. Católica de Córdoba.*

Pocos estudios comparan el comportamiento de la inmunidad humoral en mucosa conjuntival de pacientes con diferentes infecciones locales agudas o de larga evolución. Para comenzar a dilucidarlo, se cuantificaron IgA(mg/dL), IgM(mg/dL), IgG(mg/dL), IgE(UI/mL) y subclases de IgG(mg/dL) por ELISA sándwich en lágrimas de adultos sanos (N) (n=80) o con diagnóstico oftalmológico y de laboratorio de conjuntivitis infecciosa aguda (CIA n=196) o crónica/recurrente (CIC n=148) infectados con cocos, bacilos, virus Herpes simplex 1 (VHS1) o Chlamydia trachomatis (Chl). Sólo en CIA por cocos disminuyó IgA respecto a N (p<0,001). Todas las CIA elevaron IgG (cocos:22,1±13,5; bacilos:79,6±70,9, VHS1:64,9±51,5; Chl:114,5±69,6) respecto a N (1,02±0,73) (p<0,005 todos los casos), pero bacilos y Chl estimularon isotipos T helper 1 (bacilos:IgG1:49,5±33,7; IgG3:32,1±17,1; Chl:IgG1:88,3±43,2, IgG3:19,7±10,7) mientras cocos y VHS1 elevaron tanto isotipos IgG1 e IgG3 (cocos:9,52±3,55 y 6,77±2,5; VHS1:32,8±15,4 y 17,7±8,8) como isotipos T helper 2 (cocos IgE:17,3±7,1 IgG4:5,33±3,3; VHS1: IgE:8,4±4,1 IgG4:42,2±23,7). En CIC redujeron IgA respecto a N la infección por cocos, bacilos y VHS1 (p<0,005 todos los casos). Todas las CIC elevaron IgG (cocos:28,7±15,2; bacilos:98,0±42,2, VHS1:34,2±25,1 Chl:65,1±38,8, p<0,01 todos los casos), pero bacilos y Chl elevaron tanto isotipos helper 1 (bacilos:IgG1: 63,4±38,8 e IgG3: 33,7±20,2; Chl:IgG1:35,1±24,7 e IgG3:22,2±13,2) como IgE e IgG4 (bacilos:13,8±5,4 y 31,2±16,6, Chl:22,4±13,4 y 9,8±7,4) mientras cocos y VHS1 indujeron isotipo IgG4 (cocos:21,7±14,2; VHS1:29,8±16,5). CIA y CIC muestran variación en isotipos de inmunoglobulinas de lágrimas en diferentes procesos infecciosos y, en CIC se observa reducción de IgA local y desvío a isotipos T helper 2.

**0136. (0754) EFECTO ADYUVANTE E INMUNOMODULATORIO PRO-TH1 DE UNA CEPA DE ENTEROCOCCUS FAECALIS AISLADA DEL MEDIOAMBIENTE.** M Castro<sup>1</sup>, MA Molina<sup>1</sup>, P Di Sciuolo<sup>2</sup>, C Mongini<sup>2</sup>, M Manghi<sup>1</sup>

*1 Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Dr. RA Margni", Inmunología, FFyB, UBA, 2 Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Facultad de Medicina, UBA*

*E. faecalis* CETC7121 (Ef) administrado intragástricamente (ig) se adhiere y persiste en el intestino de ratones BALB/c sin variar la flora de enterobacterias. En este trabajo se analizó si Ef modifica el estado inmune de los animales al ser \*inmunizados con una vacuna bacteriana (DTPw), o \*\*infectados ig con *Salmonella* serotipo Enteritidis (SsEnt), o \*\*\*desafiados ip con células de linfoma T murino LBC (los controles no recibieron Ef). En el modelo de vacunación, los animales (n 6) recibieron Ef (días -3, -2, -1 y 13, 14 y 15) y fueron inmunizados sc con DTPw (días 0, 7 y 21). En cultivos de esplenocitos, la respuesta proliferativa de memoria anti-T y anti-D, y los niveles de INF $\gamma$  e IL-6 (ELISA) fueron mayores que en el control (p<0.05). Los niveles de IL-5, IL-12 y los anticuerpos séricos anti-T y anti-D no variaron. En el modelo de infección, los animales (n 19) recibieron ig (8 días) Ef y luego fueron desafiados ig (días 7 y 8) con SsEnt (1x10<sup>4</sup> UFC). Al día 30 (final del ensayo), el 50% de los animales tratados con Ef resultó protegido; los del control habían muerto al día 14. El número de UFC del patógeno en intestino, bazo e hígado fue inferior al control (p<0.01). Los macrófagos peritoneales provenientes de animales tratados con Ef versus el control respondieron con niveles mayores de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12 cuando fueron estimulados in vitro con SsEnt (p<0.01). En el modelo tumoral, los

animales (n 22) tratados ip con Ef recibieron 1x10<sup>6</sup> células LBC por la misma vía al día siguiente. Al día 26, murieron los del grupo control y el 77% de los tratados con Ef sobrevivió. El día 27, los animales sobrevivientes fueron re-desafiados con LBC; 8 de ellos (89%) sobrevivió al día 52. Los resultados presentados muestran claramente que Ef tiene efecto adyuvante e inmunomodulatorio pro-Th1. UBA B111; PIP 5834

**0137. (0592) LO QUE EL ESTUDIO DEL LINFOCITO B (LB) NOS PUEDE DECIR EN DEFICIENCIAS HUMORALES (DH).** D Carelli, MI Gaillard, ML Canil, D Comas, D Di Giovanni, A Gomez Raccio, L Bezrodnik

*Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina*

Las deficiencias humorales (DH) son patologías frecuentes en la consulta inmunológica. La heterogeneidad en la presentación clínica, evolución y laboratorio dificulta su clasificación. **Objetivo:** 1)Evaluar las subpoblaciones B en Deficiencia Selectiva de IgA (DSA), Inmunodeficiencia Comun Variable (IDCV) y falla de respuesta a antígenos polisacáridos (FRPS); 2)Correlacionar con características clínicas tales como bronquiectasias (BQ), esplenomegalia (E), autoinmunidad (AI) y malignidad (M) en busca de marcadores de laboratorio que permitan diagnosticar y predecir evolución. **Pacientes, materiales y métodos:** 62 pacientes: 23 IDCV adultos y pediátricos (12 probables pr 11 posibles ps según criterio ESID), 28 DSA, 8 FRPS, 3 FRPS asociado a otro defecto humoral y 25 dadores sanos (1-50años) como grupo control (C). Inmunofenotipo por citometría de flujo: CD19, CD27, IgD, IgM, siendo LB memoria (CD27+), vírgenes (CD27-IgD+IgM+), memoria no-switched (CD27+IgD+IgM+), memoria switched Bms (CD27+ IgD- IgM-), LB transicional (Bt) CD24high CD38high. **Resultados:** Bms en C: 15±3, vs IDCV: 5,22± 5% p<0.05, FRPS: 4,9±4% p<0.05, DSA: 10,1±4% p>0.05. IDCV ps vs pr (7,8±6 vs 3,9±3,8 p<0,05). 100% de IDCV y 80% de FRPS con bajos Bms tuvieron BQ, 88% de IDCV con bajos Bms tuvieron AI, E, M. Bt en C: 3,17 ±2,9 % vs FRPS: 25±12 p<0,05. **Comentario:** El estudio de LB agrupó a los pacientes con IDCV y FRPS con mayor compromiso clínico. El defecto de los LB memoria en IDCV fue más marcado en los adultos que en los niños, e independiente del diagnóstico ps y pr. El aumento de Bt en FRPS similar al descrito en pacientes esplenectomizados; sería expresión de mecanismos patogénicos? **Conclusiones:** A pesar de la heterogeneidad de estas deficiencias el estudio del compartimiento B resultó de gran utilidad para definir diferentes subgrupos clínicos en pacientes con IDCV y FRPS.

**0138. (0603) CARACTERISTICAS CLINICAS E INMUNOLÓGICAS EN DEFICIENCIA DE STAT 5B.** L Bezrodnik<sup>1</sup>, D Di Giovanni<sup>1</sup>, R Paz<sup>1</sup>, J Sardaños<sup>1</sup>, ML Canil<sup>1</sup>, D Carelli<sup>1</sup>, A Martínez<sup>2</sup>, H Domenech<sup>2</sup>, J Heinrich<sup>2</sup>, P Scaglia<sup>2</sup>, MI Gaillard<sup>1</sup>

*1 Inmunología, 2 Endocrinología. Hospital de Niños "R. Gutiérrez". Buenos Aires. Argentina.*

STAT5b es un componente de la vía de señalización JAK/STAT común para las citoquinas (IL2, 4, 7, 9, 15, 21) y la hormona de crecimiento. Su mutación se asocia a falla crecimiento, mientras que los hallazgos inmunológicos no están bien caracterizados. **Objetivo:** evaluar las características clínicas e inmunológicas en 3 mujeres con diferentes mutaciones en STAT5b. **Método:** determinación de inmunoglobulinas séricas (Ig) G, A, M por nefelometría. Respuesta específica a toxoide tetánico y neumococo por ELISA. Análisis fenotípico de linfocitos (Li) B, T y NK por citometría de flujo (CF). Respuesta proliferativa in vitro a diferentes estímulos antigénicos. Expresión de perforinas y actividad citotóxica de células NK por CF. Li T regulatorios CD4+ CD25 high (Tregs), y expresión de proteína FOXP3 por CF. **Resultados:** las 3 presentaron baja talla postnatal (1 prenatal), eccema crónico, diarrea, infecciones herpéticas (3 varicela complicada, 1 zoster y 1 queratitis recurrente); 2 enfermedad pulmonar crónica (1 bronquiectasias secundarias infecciones, 1 neumonitis intersticial linfocítica); 1 autoinmunidad: hipotiroidismo y psoriasis. Hallazgos

del laboratorio: se detectó en las 3 aumento > 2 DS de IgG, en 2 de IgA, en 1 de IgM; Li B normales en número y función; 2/3 linfopenia T, en 1/2 alteración de la respuesta proliferativa y en 1/2 valores fluctuantes; 3/3 Li T  $\gamma/\Delta$  disminuidos; 2/2 Tregs disminuidos; 3/3 presencia de autoanticuerpos; 3/3 células NK en número normal y 1/2 disminución en la actividad citotóxica. Conclusiones la hipergammaglobulinemia, linfopenia T, disminución de Tregs, presencia de autoanticuerpos, infecciones herpéticas complicadas y eccema, todas características comunes, clínicas e inmunológicas, de estas pacientes: estarían indicando un rol crítico de STAT5b en el desarrollo y homeostasis de los Li T.

**0139. (0609) POLIENDOCRINOPATIA AUTOINMUNE-CANDIDIASIS-DISTROFIA ECTODÉRMICA (APECED) EN ARGENTINA: RECURRENCIA DE UNA DELECCIÓN DE 13-PB EN EL GEN AIRE.** N Basile, E Prieto, A Ormani, S Rosenzweig, M Oleastro, G Guercio, E Vaiani, H Mendilaharsu, M Zelazko, S Danielian

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

**Introducción/Objetivos:** APECED es una rara enfermedad hereditaria de herencia autosómica recesiva, que asocia candidiasis mucocutánea (CMC), endocrinopatías múltiples de origen autoinmune y distrofia de tejidos ectodérmicos. El análisis mutacional del gen responsable AIRE provee las herramientas para un adecuado consejo genético y la caracterización molecular de esta patología. **Métodos/Resultados:** A partir de 13 pacientes (pt) con CMC y/o endocrinopatías, identificamos 4 pt pertenecientes a 4 familias no relacionadas -2 de ellas consanguíneas- que cumplían la díada clínica diagnóstica clásica para APECED: al menos 2 manifestaciones entre CMC, hipoparatiroidismo (HP) e insuficiencia adrenal (IA). En todos ellos el cuadro clínico se inició con CMC, antes de los 2 años de vida. Tres de los pt presentaron HP, diagnosticado a una edad media de 2,5 años; el cuarto pt, en cambio, IA desde los 9 años. Otras afectaciones incluyeron: insuficiencia ovárica, hipotiroidismo clínico y/o presencia de autoanticuerpos tiroideos, hepatitis autoinmune, nefrocalcinosis, queratoconjuntivitis, alteración en el esmalte dental, alopecia y distrofia ungueal. Realizamos el estudio del gen AIRE, utilizando las técnicas de SSCP y secuenciación directa del ADN genómico. De los 8 alelos estudiados, 6 presentaban una delección de 13-pb (967del13) en el exón 8, mutación ya descrita en otras poblaciones. La presencia de la misma fue confirmada mediante técnicas de digestión enzimática. **Conclusiones:** Este trabajo constituye la primera aproximación para un diagnóstico a nivel molecular de los pacientes con APECED en nuestro país. La alta prevalencia de la mutación encontrada permitiría la utilización del análisis con enzimas de restricción como método de tamizaje. Será necesario profundizar estudios con un número mayor de pt y controles sanos, a fin de confirmar la homogeneidad genética de este desorden en nuestra población y establecer la frecuencia de portadores heterocigotas.

**0140. (0611) INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS (IDP) SIN UN DIAGNOSTICO DEFINIDO. UN DESAFIO PARA INMUNOLOGOS CLINICOS Y BASICOS.** L Bezrodnik<sup>1</sup>, D Di Giovanni<sup>1</sup>, AC Gómez Raccio<sup>1</sup>, VL Regairaz<sup>1</sup>, RD Paz<sup>1</sup>, D Carelli<sup>1</sup>, ML Canil<sup>1</sup>, G Belardinelli<sup>1</sup>, N Zwirner<sup>2</sup>, MI Gaillard<sup>1</sup>

*1 Inmunología. Hospital de Niños "R. Gutiérrez". Buenos Aires. Argentina, 2 Inmunología. Hospital de Clínicas*

Las IDP son fallas de la naturaleza, que han permitido conocer la fisiología del sistema inmune. Más de 120 entidades tienen diagnóstico molecular. La falta de diagnóstico de certeza representa un desafío para disminuir la morbimortalidad del paciente. **Objetivo:** presentar 7 niños con compromiso severo inmune, sin diagnóstico de certeza. **Material y Métodos:** Se revisó en forma retrospectiva las historias clínicas de 5 varones y 2 niñas, entre 3 y 13 años (a). **Resultados:** 1°MF edad inicio (ed) 4a: neumonías(NMN), infecciones oportunistas: P. jiroveci, micobacterias, infecciones herpéticas, linfoma SNC PCR + VEB, hipergamma-

globulinemia (>Ig), CD3<, CD4<,CD3 $\gamma/\Delta$  >30%, falta anticuerpos anti-polisacáridos (AcPS), anti-antígeno proteico (AcP) toxoide tetánico, AcP virales+, ausencia de respuesta proliferativa celular (RPC). Se descartó deficiencia de ADA, NEMO. 2 niños 2°CHF ei 1a y 3°BG ei 2m con NMN, colangitis esclerosante, mielofibrosis, >Ig, Ac PS<, Ac P+, CD4<, NK< y BG CT NK<. 4° BA ei 11a, melanoma, criptococcosis pulmonar, CD56+CCR7CD62L >. 5° RL ei 3a, infecciones herpéticas, criptococcosis diseminada, CD4<, NK<, RPC< para antígenos específicos. 6° SS ei 4a, síndrome hemafagocítico VEB+, perforinas +, n° y CT NK<, 7° PN ei 2a NMN, eosinofilia severa, anemia crónica, >IgA y, Ac PS<, n° y CT NK<, RPC<. Evolución: 1 niño falleció RL, BA se encuentra en buen estado general asintomático, PN se encuentra en tratamiento sustitutivo con GGEV y los tres restantes en tratamiento sustitutivo con GGEV, pero por la gravedad de sus cuadros se ha indicado un trasplante de médula ósea. **Comentario:** La interacción entre diferentes grupos que trabajan en el campo de la inmunología, podría ser de utilidad para definir cuál es el componente del sistema inmune afectado, comprender la enfermedad y ayudar a instaurar una mejor terapéutica a estos y otros pacientes.

## INMUNOLOGÍA II

**0141. (0440) AUTOINMUNIDAD ORGANO ESPECIFICA EN UNA FAMILIA CON DEFICIENCIA SELECTIVA DE IGA(DSA): ESTAMOS EN PRESENCIA DE UN SINDROME POLIGLANDULAR AUTOINMUNE (SPA)?** A Ginaca, P Carabajal, MI Gaillard, D Carelli, A Gomez Raccio, L Regairaz, L Bezrodnik

*Inmunología. Hospital de Niños R Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina*

DSA puede asociarse a enfermedades autoinmunes (EAI) o autoanticuerpos sin enfermedad clínica. La aparición de múltiples EAI órgano específicas y/o autoanticuerpos en un mismo paciente se relacionan con SPA. **Objetivo:** presentar una familia con DSA y autoinmunidad órgano específica con riesgo de desarrollar SPA. Pacientes: 3 hermanas con DSA sin historia personal de infecciones recurrentes, con autoinmunidad familiar. **Métodos:** anti nucleares, células parietales gástricas (APCA), músculo liso, LKM, adrenales, endomisio(EMA)IgG, islote pancreático(ICA) por IFI. Por quimioluminiscencia: anti Tiroperoxidasa (aTPO). Por ELISA: anti transglutaminasa (TG) IgG. Por Radiobinding: anti ácido glutámico decarboxilasa (GADA). Células B: CD19+ CD27+ IgD+ o IgD- (memoria pre y post switch), células T reguladoras CD4+ CD25 high (Tregs) y expresión de Foxp3 en Tregs por Citometría de flujo. **Resultados:** PR (6 años) presentó tiroiditis autoinmune con aTPO positivo de difícil manejo clínico a los 3 años. Screening con autoanticuerpos mostró APCA, ICA y GADA positivos asociada a gastritis crónica y prueba de tolerancia a la glucosa normal. KR (11 años) a los 9 años debut diabético con ICA y GADA positivos. En el seguimiento TG positivo sin clínica de enfermedad celíaca. En MR (10 años) por screening se detectó TG, ICA, GADA y aTPO positivos sin enfermedad clínica; biopsia duodenal reveló atrofia mucosa correspondiente a Enfermedad Celíaca; curva de tolerancia a la glucosa normal. Células B memoria pre y post switch y Tregs fueron bajas en PR. La expresión de Foxp3 se encontró disminuida en las 3 pacientes. Conclusiones: mostramos coexistencia de autoinmunidad órgano específica y autoanticuerpos en 3 hermanas con DSA durante el seguimiento. La detección de autoanticuerpos específicos contribuyó al diagnóstico temprano en una de ellas. Se encontró expresión alterada de Foxp3 en Tregs. El seguimiento de esta familia con riesgo de SPA permitiría diagnóstico temprano disminuyendo la morbilidad.

**0142. (0486) AMPLIFICACIÓN Y DISPERSIÓN DE LA RESPUESTA AUTOINMUNE INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV-A59).** M Duhalde Vega<sup>1</sup>, JL Aparicio<sup>1</sup>, ME Loureiro<sup>2</sup>, LA Retegui<sup>1</sup>

*1 IQUIFIB-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA, 2 CEVAN (CONICET)*

En trabajos previos demostramos la presencia de autoanticuerpos (autoAb) contra la fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) hepática en ratones infectados con el MHV-A59. Se observó que luego de cierto tiempo los animales conservan los autoAb pero no presentan síntomas de hepatitis, tirosinemia o hipergamaglobulinemia, por lo que constituyen un modelo de respuesta autoinmune no patogénica. El propósito de este trabajo fue provocar una necrosis hepática que rompa la barrera de tolerancia de este tejido para inducir las manifestaciones de una enfermedad autoinmune. Ratones BALB/c fueron infectados con el MHV-A59 y, treinta días después, inoculados con tetracloruro de carbono (0.16 µl en 100 µl de aceite mineral). Los animales fueron sangrados a las 24h y a los 20 días post-tratamiento. Ensayos de ELISA permitieron determinar que la gamaglobulinemia no era afectada por el tetracloruro de carbono 24h después de la inoculación del tóxico. Por el contrario, la concentración de Ig veinte días después fue significativamente mayor ( $p > 0.004$ ) en los animales tratados con el hepatotóxico que en los controles (solamente infectados). Mediante la técnica de western-blot se detectaron autoAb dirigidos contra diferentes proteínas hepáticas en nueve de los once animales tratados con tetracloruro de carbono, Ab contra proteínas renales en cinco de ellos y contra músculo en cuatro. Los sueros de los ratones controles, infectados con MHV, sólo presentaron Ab contra la FAH, y los tratados solamente con el tóxico no exhibieron autoAb. Los resultados obtenidos permiten sugerir que es posible ampliar y diversificar la respuesta autoinmune provocada por el MHV-A59. Así, el agente hepatotóxico utilizado produjo un fenómeno de expansión y dispersión del proceso autoinmune, lo cual originó la aparición de diferentes autoAb y el aumento de Ig en sangre, manifestaciones que se asemejan a las observadas en el inicio de una hepatitis autoinmune. \*MDV y JLA colaboraron de la misma forma.

**0143. (0700) ROL PROTECTIVO DEL ÓXIDO NÍTRICO PRODUCIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEALES EN LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE).** LL Rupil, MJ Scerbo, CG Monferran, GA Roth

*Dep. de Química Biológica-CIQUIBIC (UNC-CONICET). Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. X5000HUA Córdoba*

La encefalomyelitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad demielinizante del sistema nervioso central utilizada como modelo de la esclerosis múltiple. La EAE puede ser inducida en ratas por inmunización con antígenos de mielina en adyuvante de Freund completo. Estudios acerca del rol del óxido nítrico (ON) en el desarrollo de la EAE indican que puede inducir inflamación, aunque también podría desempeñar un rol protector. Uno de los responsables de la producción de altos niveles de ON son los macrófagos (Mφ) activados clásicamente por citoquinas del tipo Th1 que expresan la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). **Resultados** preliminares de nuestro laboratorio muestran un aumento de la actividad iNOS en Mφ peritoneales provenientes de animales con EAE que no mostraron signos clínicos con respecto a animales enfermos. Basándonos en este hallazgo se profundizó la posible implicancia de esta activación en un modelo de supresión de la EAE. Para ello se procedió a la administración oral en ratas Wistar de un péptido de sinapsina fusionado a la subunidad B de la toxina lábil al calor de *Escherichia coli* previo a la inducción de la enfermedad. Se observó un aumento significativo de la producción de ON por Mφ peritoneales de animales suprimidos que no se enfermaron respecto a los animales que desarrollaron los signos clínicos característicos del periodo agudo de la EAE. Este aumento en la producción de ON se correlacionó con un estado de menor respuesta de otros parámetros inmunológicos (DTH, proliferación de linfocitos anti-proteína básica de mielina, infiltrados celulares). En el período de recuperación todos los animales mostraron valores similares a los controles. Estos resultados indicarían que el ON podría tener un rol protector en la fase aguda de la EAE, posiblemente a través de la inhibición de la proliferación de linfocitos, lo cual podría estar implicado tanto en la patogénesis como en el proceso de supresión oral de la enfermedad.

**0144. (0733) PREDICCIÓN Y PREVENCIÓN EN DIABETES TIPO I - DETECCIÓN Y SELECCIÓN DE NIÑOS CON "ALTO RIESGO" DE PADECER DIABETES TIPO I (ESTUDIO PILOTO).** A Trabucchi<sup>1</sup>, I Fernandez<sup>2</sup>, GA Passicot<sup>2</sup>, S Valdez<sup>1</sup>, E Poskus<sup>1</sup>, L Trifone<sup>2</sup>, M Tonietti<sup>2</sup>, MC Camberos<sup>2</sup>, I Bergada<sup>2</sup>, AB Schenone<sup>2</sup>, M Szlago<sup>3</sup>, JC Cresto<sup>2</sup>

*1 Inmunología, (IDEHU-CONICET), Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina, 2 Diabetes, Htal. de Niños "R. Gutierrez"; CEDIE-Endocrinología, Htal. de Niños "R. Gutierrez", Buenos Aires, Argentina., 3 Fundación para el estudio de las Neurometabólicas (FESEN), Buenos Aires, Argentina*

Los hermanos de niños diabéticos son el grupo de riesgo en donde se establece la búsqueda de sujetos pasibles de prevención en diabetes tipo 1. Los conocimientos actuales sugieren que es posible esta selección determinando la concentración plasmática de L-carnitina. **Objetivo:** Establecer un algoritmo de diagnóstico preclínico de Diabetes Tipo I, simple y de costo accesible que permita detectar los individuos con "alto riesgo" de padecer la enfermedad. **Métodos:** Se estudiaron 55 hermanos de niños diabéticos tipo 1. En ellos se determinó: L-carnitina total y libre (técnica de Hoppel); auto-anticuerpos para glutamato decarboxilada (GADA), tirosina fosfatasa (IA-2A) e insulina/proinsulina (IAA) (técnica: unión de radioligando). La prueba de tolerancia a la glucosa EV (PTEVG) se empleó para determinar el 1er pico y la secreción integrada de insulina y Kg (pendiente de desaparición de glucosa). **Resultados:** De los 55 niños que comenzaron, 7 discontinuaron el estudio, 1 falleció y 5 lo deben completar. Los estudios se realizaron en dos tandas con aproximadamente 1 año de diferencia. Se determinó L-carnitina en 42 niños. En 20 los valores fueron bajos (total o libre) de los cuales al año 7 fueron confirmados, 2 se normalizaron, 1 falleció, 3 nuevos con valores bajos fueron agregados y 7 faltan re-evaluar. Los anticuerpos (Ab) se determinaron en 45 niños, siendo positivos en 9 de los cuales 1 falleció. Al año 2 quedaron por debajo de la zona de corte y 4 nuevos fueron positivos. De los 10 niños con Ab positivos, 5 tenían L-carnitina baja. Las pruebas funcionales (PTEVG) se realizaron en los niños con Ab positivos y/o L-carnitina baja. De 10 pruebas realizadas hasta ahora, 8 fueron normales y 2 anormales. De estas, un paciente tenía Ab positivos y carnitina baja y el otro únicamente la carnitina baja. **Conclusiones:** La determinación de autoanticuerpos y de L-carnitina, constituyen una alternativa para la selección de individuos en "alto riesgo" de diabetes tipo 1.

**0145. (0770) IL- 15 REGULA LA EXPRESIÓN DE CD30 EN LA ENFERMEDAD CELÍACA ACTIVA.** N Periolo<sup>1</sup>, L Guillen<sup>1</sup>, S Niveloni<sup>2</sup>, E Mauriño<sup>2</sup>, J Bai<sup>2</sup>, A Cheriavsky<sup>1</sup>

*1 Hospital de Clínicas "José de San Martín". Buenos Aires. Argentina., 2 Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo.*

**Introducción:** La respuesta inmunopatogénica predominante en la enfermedad celíaca (EC) es de tipo I siendo central la interleuquina (IL)-15 en la respuesta innata y adaptativa. CD30, miembro de la familia del receptor de TNF-alpha y regulador fisiológico del balance Th1/Th2. En pacientes celíacos (Cel), es marcador diferencial de activación inducible en sangre periférica, pero su expresión es constitutiva en el intestino delgado (ID) tanto en (Cel) como Controles (Co). **Objetivos:** i) Cuantificar la expresión de CD30 en subpoblaciones linfocitarias de LIEs (linfocitos intraepiteliales) y LPLs (linfocitos de lámina propia) aisladas de ID. ii) Estudiar la regulación de CD30 por IL-15 en el células mononucleares de sangre periférica (CMSP). **Materiales/Métodos:** En base a criterios serológicos e histológicos incluimos pacientes adultos Cel (n=6) y Co (n=6) con trastornos intestinales excluyendo EC. LIEs y LPLs fueron aislados por digestión enzimática de biopsias de ID, y la expresión de CD30 fue evaluada por Citometría de Flujo. En CMSP obtenidas por gradiente de Ficoll-hypaque a partir de 10 ml de sangre entera estudiamos la regulación de CD30 por IL-15 (anti-CD3:1 µg/ml, 3 días + IL-15: 50 ng/ml, 3 días). Para el análisis estadístico utilizamos el test

de Mann-Whitney. **Resultados:** La frecuencia de LPLs CD3+ CD30+ es mayor en Cel ( $p=0.033$  vs Co), mientras que en LIEs no se observan diferencias significativas entre ambos grupos. IL-15 indujo un mayor incremento en la frecuencia de la subpoblación CD3+CD30+ en CMSP provenientes de Cel ( $p=0.039$  vs Co). **Conclusiones:** Los resultados sugieren que CD30 sería un marcador local de activación en LPLs en pacientes celíacos. La sobre expresión de CD30 en periferia permitiría inferir que la mayor expresión de CD30 observada en LPLs podría ser consecuencia del efecto de IL-15 endógeno.

**0146. (0059) FOTOSENSIBILIDAD CUTÁNEA EN PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES DEL TEJIDO CONECTIVO Y SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS ANTI-RO/SS-A, ANTI-LA/SS-B Y ANTI-SM.** ML Paz, FS Weill, J Leoni, DH González Maglio

*Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.*

**Introducción:** Las enfermedades del tejido conectivo (ETC) pueden presentar diferentes autoanticuerpos (AAcs) contra antígenos nucleares; algunos asociados específicamente con ciertas patologías y otros presentes en varias de ellas. El fenómeno de fotosensibilidad cutánea (FC) ha sido relacionado históricamente con la presencia de AAcs anti-Ro/SS-A, aunque este hecho es motivo de controversia. **Objetivos:** 1) Evaluar el perfil de AAcs, tanto individuales como sus diferentes asociaciones, presentes en pacientes con ETC. 2) Relacionar la manifestación de FC con la presencia de diferentes AAcs en las patologías estudiadas. **Métodos:** Se estudiaron 169 pacientes derivados del Servicio de Reumatología del Hospital de Clínicas José de San Martín. Los AAcs fueron evaluados mediante la técnica de ELISA: los anti-Ro/SS-A totales, anti-La/SS-B y anti-Sm se determinaron utilizando kits comerciales. La determinación particular de anti-Ro 52 kDa y anti-Ro 60 kDa se realizó mediante un ELISA que utiliza las proteínas recombinantes purificadas individualmente. **Resultados:** 1) Asociación de AAcs por patología:

	LES (52)	SS 1° (27)	SS 2° (23)	Otras (43)	S/Diagn (24)
Ro +	10	4	9	5	1
La +	2	0	2	2	0
Sm +	9	0	0	0	1
Ro + La +	4	9	3	2	0
Ro + Sm +	4	1	2	2	0
La + Sm +	0	0	0	0	0
Ro+La+Sm+	6	1	2	0	0
Ro-La-Sm-	17	12	5	32	22

2) De los pacientes con FC ( $n=81$ ): 23 fueron positivos para anti-Sm; 18 para anti-La y 34 para anti-Ro total (27 para Ro 52 y 18 para Ro 60). De los pacientes sin FC ( $n=88$ ): 5 fueron positivos para anti-Sm; 14 para anti-La y 31 para anti-Ro total (26 para Ro 52 y 18 para Ro 60). **Conclusiones:** 1) La aparición de AAcs aislados es más común en SS 2° (anti-Ro) y en LES (anti-Ro y anti-Sm), mientras que la asociación de AAcs es más común en SS 1° (anti-Ro y anti-La). 2) Del análisis estadístico mediante tablas de contingencia se concluye que la FC está fuertemente relacionada con la presencia de los AAcs anti-Sm (Odds Ratio=6,583;  $p<0,0001$ ) y no con la presencia de AAcs anti-La o anti-Ro, tanto total como sus componentes individuales.

**0147. (0776) EFECTO DE TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  Y GLUCOCORTICOIDES EN EL ESTABLECIMIENTO Y MANTENIMIENTO DE LA TOLERANCIA AL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS).** B Rearte<sup>1,2</sup>, EA Laborde<sup>1,2</sup>, V Landoni<sup>1,2</sup>, P Chiarella<sup>1</sup>, G Fernandez<sup>1,2</sup>, MA Isturiz<sup>1,2</sup>

*1 ILEX - Academia Nacional de Medicina, 2 IIHema - Academia Nacional de Medicina*

El fenómeno de tolerancia al LPS es un evento relevante ya que podría ser uno de los mecanismos involucrados en la

inmunosupresión observada en sepsis por bacterias Gram (-). **El objetivo de este trabajo** fue estudiar *in vitro* e *in vivo* el papel de diferentes agentes involucrados en dos fases de este fenómeno: el **establecimiento (E)** y el **mantenimiento (M)**. En la **fase E** se evaluó el rol de los glucocorticoides (GC) y del TNF- $\alpha$ . Para ello, ratones BALB/c fueron tolerizados con LPS (LPS<sub>Tol</sub>, 0.08mg/Kg), LPS<sub>Tol</sub>+ RU486 (antagonista de GC; 12mg/Kg) o LPS<sub>Tol</sub>+ dexametasona (Dx) (2.5 mg/Kg) durante 4 días. Luego, recibieron una dosis letal de LPS (8 mg/Kg), y se evaluó la mortalidad. Solo el tratamiento con Dx impidió el establecimiento de la tolerancia. (LPS<sub>Tol</sub> 0/17; LPS<sub>Tol</sub>+RU486 2/16, LPS<sub>Tol</sub>+Dx 9/9). Luego se evaluó *in vitro* el rol del TNF- $\alpha$  en la fase E. Para ello, macrófagos peritoneales tratados con LPS en presencia de Mab anti-TNF- $\alpha$  o receptores solubles de TNF- $\alpha$  se tolerizaron normalmente ( $*p<0.05$ ). En la **fase M** se analizó el efecto de RU486, Dx e IFN- $\gamma$ . Para ello ratones BALB/c fueron tolerizados con LPS por 4 días (Tol). Cinco minutos antes de la dosis letal de LPS se les inculó RU486 y se evaluó la mortalidad: Tol 0/11; Tol+RU486 20/20. Cuando el LPS fue inoculado 8h post RU486, no hubo mortalidad (0/10), indicando que el RU486 genera una desarticulación transitoria de la tolerancia al LPS. Cuando animales normales se inocularon simultáneamente con Dx y una dosis letal de LPS, no se observó mortalidad (0/17). Este efecto refractario inducido por la Dx correlacionó con bajos niveles de TNF- $\alpha$  en plasma. Es conocido que el IFN- $\gamma$  induce la desarticulación de la tolerancia. En este trabajo se demostró que este efecto mediado por el IFN- $\gamma$  es transitorio. Estos resultados muestran un rol dual de los GC en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia y por otra parte, que la desarticulación de la tolerancia por RU486 e IFN- $\gamma$  es un efecto transitorio y reversible.

**0148. (0500) LAS CÉLULAS ESTROMALES DE GANGLIOS LINFOIDES ALTERAN DIFERENCIALMENTE LOS NIVELES DE CÉLULAS T CD4+FOXP3+ Y CD4+FOXP3- IN VITRO.** G Camicia, D Lorenzo, G Cabrera, AF Maglioco, I Piazzon, I Nepomnaschy

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

El cultivo de células estromales de ganglios linfoides (CCEG) —una valiosa herramienta para el estudio del rol de estas células en la fisiología del sistema inmune— resulta muy dificultoso, aunque se ha reportado la obtención exitosa de CCEG derivadas de ratones deficientes para la cadena  $\beta$  del receptor para IL-2. Hemos demostrado que los ratones CTSlnkt (nkt), portadores de una mutación en el gen de la catepsina-L, presentan altos niveles de matriz extracelular en los ganglios linfoides. Dado que las células estromales son las principales productoras de matriz extracelular, estudiamos el comportamiento *in vitro* de células estromales derivadas de ratones nkt. Observamos importantes diferencias en el desarrollo de los CCEG derivados de ratones nkt y controles (BALB/c): mientras que los CCEG nkt llegan a confluencia en 20-30 días, los provenientes de ratones BALB/c crecen con gran lentitud y no llegan a confluencia al cabo de 2 meses de cultivo. En ambos casos, los fenotipos celulares fueron heterogéneos, presentando células con morfología fibroblástica y macrofágica/dendrítica. La presencia de macrófagos y células dendríticas, se confirmó por FACS utilizando los marcadores CD45, CD11b, CD11c y MHC clase II. Utilizamos entonces cultivos CCEG nkt para evaluar la influencia de los CCEG sobre las células CD4+Foxp3+ y CD4+Foxp3-. Linfocitos de ganglios BALB/c fueron estimulados con esplenocitos alogéneos (AKR/J) en presencia y ausencia de CCEG nkt. La presencia de CCEG alteró las proporciones de células CD4+Foxp3+ y CD4+Foxp3-. A modo de ej: (Media del %Foxp3+/CD4 $\pm$ DS,  $n=3$ ) CCEG nkt: 22,0 $\pm$ 1,7; Sin CCEG: 36,9 $\pm$ 2,8;  $p<0,001$ . (Media del %Foxp3-/CD4 $\pm$ DS;  $n=3$ ): CCEG nkt: 67,2 $\pm$ 0,4; Sin CCEG: 56,7 $\pm$ 1,7,  $p<0,01$ . Estos resultados sugieren que el estroma de los ganglios linfoides ejerce un efecto diferencial *in vitro* sobre la proliferación y/o la sobrevida de los subpoblaciones CD4+Foxp3+ y CD4+Foxp3-.

**0149. (0639) ASOCIACIÓN ENTRE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA Y ANEMIA HEMOLÍTICA AUTOINMUNE. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA T ESPECÍFICA CONTRA LA PROTEÍNA BANDA 3.** C Cañones<sup>1</sup>, J Galletti<sup>1</sup>, PE Morande<sup>1</sup>, M Borge<sup>1</sup>, PR Nannini<sup>1</sup>, RF Bezares<sup>2</sup>, R Gamberale<sup>1</sup>, M Giordano<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Inmunología Oncológica, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, <sup>2</sup> Servicio de Hematología, Hospital Alvarez

La leucemia linfática crónica (LLC) es la causa más frecuente de anemia hemolítica autoinmune (AHA) en el adulto, siendo la proteína eritrocitaria, banda 3 (B3), el blanco antigénico prevalente. Anteriormente habíamos reportado que las células LLC pueden unir y endocitar B3 en forma específica. De esta manera podrían actuar como células presentadoras de antígeno iniciando el proceso autoinmune. El objetivo del presente trabajo fue analizar la respuesta proliferativa T frente a B3 en pacientes con LLC. Para ello, purificamos B3 a partir de eritrocitos que fueron lisados, despojados de las proteínas accesorias por cambios en la fuerza iónica y solubilizados en deoxicolato. Con esta preparación de B3 (5-10 ug/ml) se pulsaron células LLC incubando 18hs a 37°C y se co-cultivaron con linfocitos T autólogos durante 7 días en una relación 1:1. La capacidad proliferativa se evaluó por incorporación de timidina tritiada. En ninguna de 7 muestras analizadas encontramos inducción de proliferación T. A fin de incrementar su capacidad presentadora de antígenos, las células LLC se estimularon durante 24 hs por incubación sobre fibroblastos transfectados con CD40 ligando. La expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 aumentó entre 2 y 5 veces (n=7, p<0,01) en comparación con las células incubadas sobre fibroblastos sin transfectar. En estas condiciones, las células LLC pulsadas con B3 lograron estimular las respuestas T específicas en 5 de 11 pacientes evaluados (índice de estimulación mayor de 2, variación de cpm mayor de 1000) Nuestros resultados muestran que las células LLC pueden unir y capturar en forma específica B3 y, luego de ser activadas, pueden inducir la proliferación de linfocitos T autorreactivos. Proponemos que el clon leucémico iniciaría la respuesta autoagresiva contra los glóbulos rojos actuando como una población de células presentadoras del antígeno B3.

**0150. (0428) LIPOSOMAS POLIMERIZADOS CATIONICOS COMO INMUNOADYUVANTES.** J Gasparri, L Speroni, S Alonso

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Roque Sáenz Peña 352, Bernal (B1876BXD), Buenos Aires, Argentina. jgasparri@unq.edu.ar

Las estrategias para desarrollar vacunas preventivas y terapéuticas se han enfocado en dirigir los antígenos a las células presentadoras (APC). Se están investigando una gran variedad de inmunoadyuvantes, entre ellos polímeros, nanopartículas catiónicas y liposomas. Estos últimos han sido utilizados exitosamente para aumentar la respuesta inmune contra diversos antígenos. Los liposomas polimerizados son más estables que los liposomas convencionales, y permitirían un transporte de antígeno más efectivo a las APC. Este estudio compara la capacidad adyuvante de liposomas polimerizados y no polimerizados, así como la influencia de la adición de lípidos catiónicos en la formulación. Se determinaron los títulos de IgG e IgM en los sueros de ratones inmunizados, generados por la coadministración de los liposomas con antígenos. Se utilizó una proteína no inmunogénica ( $\beta$ -lactamasa) para estudiar IgGs por ELISA, y glóbulos rojos de carnero para estudiar IgM por hemaglutinación. También se estudió la citotoxicidad in vitro de las formulaciones liposomales y su capacidad de activar y atraer células mediante inyección intraperitoneal en ratones balb/c. Los resultados mostraron que los liposomas catiónicos polimerizados generaron un aumento significativo en el título de IgG de los ratones inmunizados, respecto a las otras formulaciones y al control sin liposomas. El agregado de lípidos catiónicos aumentó el título de anticuerpos tanto en IgM

como IgG, y activaron significativamente el metabolismo de las células fagocíticas peritoneales. Estos resultados dirigen nuestras investigaciones a la caracterización de los liposomas polimerizados catiónicos para su utilización como inmunopotenciadores de vacunas humanas.

**0151. (0792) NIVELES DE CITOQUINAS Y ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DURANTE LA INMUNOTERAPIA INTRANASAL CON PLGA-OVA.** C Apicella<sup>1</sup>, E Rey-Roldán<sup>1</sup>, R De León<sup>1</sup>, D Chiappetta<sup>2</sup>, C Bregni<sup>2</sup>, J Dokmetjian<sup>1</sup>, T Gentile<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Inmunología-IDEHU "Prof. Ricardo Margni" CONICET Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, <sup>2</sup> Cátedra de Farmacotecnia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires

Las evidencias que muestran la posibilidad de generar una respuesta inmune específica celular y humoral sistémica mediante inmunizaciones a través de mucosas, junto con el desarrollo de sistemas de liberación de antígenos, con gran potencial inmunogénico, nos permitió considerar la aplicación de una inmunoterapia específica (ITA) por vía intranasal en un modelo de alergia murino a ovoalbúmina (OVA). Hembras Balb/c fueron sensibilizadas con 3 dosis ip de OVA-Al(OH)<sub>3</sub> y el estado alérgico se evaluó mediante la determinación de los niveles de IgE específica. Los animales fueron tratados por vía intranasal con 1 dosis de 40  $\mu$ g de D,L-lactic-coglicolic acid-OVA (PLGA-OVA) (n=5) y con 3 dosis de OVA-soluble (n=5) respectivamente. En los animales de los diferentes grupos se determinaron los niveles séricos de IgG<sub>2a</sub>, IgG, e IgE específicas (ELISA) y la concentración de IL-10 e INF $\gamma$  (ELISA de captura) en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos en presencia de OVA. Los resultados mostraron que solamente se observó incremento de INF $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo de los ratones tratados con PLGA-OVA con respecto a los no tratados (404,33 vs 253,33 pg/ml, p<0.01). Los niveles de IL-10 fueron incrementados por el tratamiento con PLGA-OVA (479,58 pg/ml) y OVA-soluble (581,66 pg/ml) con respecto al grupo control (284,00 pg/ml), p<0.01 y p< 0.001 respectivamente. Ninguna de las ITA indujo modificaciones de los niveles de IgE e IgG. Sin embargo la administración de PLGA-OVA incrementó significativamente (138%) los valores de IgG<sub>2a</sub> con respecto al control sin tratamiento. Los resultados sugieren que la vía intranasal podría ser una alternativa para la inmunoterapia específica con antígenos microencapsulados induciendo una modulación de la respuesta inmune hacia un perfil Th1 objetivo principal de la inmunoterapia desensibilizante. (UBA B094, ANPCyT-PICT 12693, CONICET-PIP 5503).

**0152. (0705) SENSIBILIZACIÓN A LOS EFECTOS DE ANFETAMINA SOBRE LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA: MECANISMOS GLUTAMATÉRGICOS Y OPIODÉRGICOS IMPLICADOS.** MA Assis<sup>1</sup>, C Hansen<sup>1</sup>, V Lux-Lantos<sup>2</sup>, C Sotomayor<sup>3</sup>, LM Cancela<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, <sup>2</sup> Laboratorio de Endocrinología, IBIME-CONICET, <sup>3</sup> Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

En trabajos previos de nuestro laboratorio, demostramos la influencia de anfetamina (ANF) sobre la respuesta linfoproliferativa (RL), y la liberación de met-enkefalina (met-ENC) en células de bazo y timo, y en áreas del circuito mesolímbico en SNC. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posible contingencia entre la liberación de met-ENC y la disminución en la RL luego de una dosis de ANF (5 mg/kg IP), así como la participación de un mecanismo glutamatérgico en el desarrollo y la expresión de los cambios observados. A tal fin, se realizó: 1) Una curva temporal de los efectos sobre RL y met-ENC los días 5, 8 y 22 luego de la administración de ANF; 2) La determinación del efecto de MK801 (0,1mg/kg IP), 15 min previo a ANF (día 1), sobre la RL y los niveles de met-ENC en bazo el día 5 luego de administrar la droga; 3) El estudio de la influencia de MK-801 en la expresión de

la sensibilización inducida por ANF, mediante la administración del antagonista 15 min antes de una segunda dosis de ANF (1 mg/kg IP) el día 22 luego de administrada la primera dosis de ANF. La RL fue evaluada mediante cultivo de células esplénicas estimuladas con Concanavalina-A, y los niveles de met-ENC por RIA. En concordancia con los hallazgos previos, ANF indujo una disminución en la RL, que se mantuvo por una semana y se extinguió 3 semanas luego de la inyección (día 22), en tanto que el aumento en met-ENC esplénica, se normalizó el días 8. La dosis subumbral de ANF administrada el día 22 restauró los efectos sobre la RL y met-ENC en los animales previamente sensibilizados. El pre-tratamiento con MK801 revirtió el desarrollo y la expresión de los efectos inducidos por ANF en la RL y los niveles de met-ENC. Estos resultados señalan que sistemas de neurotransmisores similares a los involucrados en el desarrollo de sensibilización conductual (dopamina, glutamato y opioides), participan en los efectos de ANF sobre la RL.

**0153. (0452) EFECTO DE ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA UN PÉPTIDO SINTÉTICO CONSENSO INCLUIDO EN UN EPITOPE COMPARTIDO POR RECEPTORES DE VARIAS CITOQUINAS.** CG Belloc, C Peña, ME Miranda, LA Retegui

*IQUIFIB (UBA-CONICET)- Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA*

El anticuerpo monoclonal (MAb) denominado R7B4 reconoce un epítopo compartido por receptores pertenecientes a la llamada superfamilia de receptores de citoquinas de tipo I, que incluye las prolactinas, las hormonas de crecimiento (GH) y las interleuquinas (IL) 2, 3, 4, 5, 6, 7, 11, entre otros. Dicho epítopo está representado por un péptido consenso (His-Gly-Tyr-Trp-Ser-Glu-Trp-Ser-Pro-Glu) que fue identificado y posteriormente sintetizado. Con el propósito de obtener Ab policlonales que simularan la acción del MAb se inocularon ratones C57BL/6 con el péptido consenso en presencia de un adyuvante denominado PADRE (por Pan HLA DR-binding Epítopo), el cual intensifica la reactividad inmunológica de diferentes haptenos. Sintetizamos el péptido PADRE: a-Lys-X-Val-Ala-Ala-Trp-Thr-Leu-Lys-Ala-Ala-a-Z-Cys, (a indica la D-alanina, X representa la ciclohexilalanina y Z es el ácido aminocaproico), que fue luego purificado por HPLC e identificado por espectrometría de masa. Se halló que varios antisueros obtenidos a partir de ratones inmunizados con el péptido + PADRE (50mg de cada péptido en adyuvante de Freund) inhibieron significativamente ( $p < 0.001$ ) la unión de la GH de origen humano a receptores presentes en hígado de rata. Los sueros también bloquearon la unión de 125I-IL6 a los receptores de las células 7TD1 ( $p < 0.001$ ). En ningún caso los Ab anti PADRE afectaron la unión de la GH o de la IL6 a las membranas. Por otro lado, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica con la finalidad de estudiar el espectro de expresión del epítopo R7B4 en diferentes líneas celulares de origen humano y murino. Se halló que tanto el MAb como los Ab anti péptido consenso reconocen células tumorales y normales. Se concluye que la utilización de PADRE como adyuvante aumentó considerablemente la respuesta anti péptido consenso, y que dichos Ab simulan efectivamente la acción del MAb R7B4, por lo que el péptido consenso podría ser eventualmente utilizado como agente inmunomodulador.

**0154. (0252) PRODUCTOS VEGETALES QUE PROTEGEN "IN VITRO" A LINFOCITOS HUMANOS DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.** LN Cariddi<sup>1</sup>, J Zygadlo<sup>2</sup>, LI Sabini<sup>1</sup>, AM Maldonado<sup>1</sup>

*1 Universidad Nacional de Río Cuarto, 2 Universidad Nacional de Córdoba*

Los intermediarios reactivos del oxígeno (IROs), como el peróxido de hidrógeno, juegan un papel importante en la apoptosis celular. Recientes estudios demuestran que diferentes derivados de plantas medicinales son capaces de proteger in vitro de la apoptosis celular inducida por IROs. El objetivo fue determinar si la decocción (D) o el aceite esencial (AE) de *Mintostachys*

verticillata protegen a linfocitos humanos de la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno. La fracción D se obtuvo según la técnica descrita por Mongelli E., et al., (1995) y la fracción AE de acuerdo a la metodología de Adams R. P., 1995. Se separaron las células mononucleares de sangre periférica de 15 individuos voluntarios sanos (18-50 años). Las células fueron cultivadas según Deng M, et al., 2004 para determinar la capacidad protectora de D o AE sobre la citotoxicidad inducida por peróxido de hidrógeno. Se realizó tinción nuclear con Hoechst 33258 (1mg/mL) para visualización de las células apoptóticas según Genhong Y, et al., 2006. La fracción D incrementó el rango de viabilidad celular en un 14% y la fracción AE en un 21%, comparado con el efecto tóxico del peróxido de hidrógeno sobre los linfocitos humanos ( $p < 0,05$ ). Se pudo observar en los linfocitos que no fueron tratados con peróxido de hidrógeno, D ni AE, que los núcleos tenían contorno regular, tamaño normal y no se observó condensación de cromatina. La mayoría de los linfocitos tratados con peróxido de hidrógeno sólo, mostraron condensación de la cromatina y fragmentación de ADN. Los linfocitos pretratados con D o AE, expuestos a peróxido de hidrógeno, presentaron disminución de los índices de apoptosis nuclear ( $p < 0,02$ ). Estos resultados demostraron la capacidad de D y AE de *M. verticillata* para proteger a los linfocitos humanos de la acción tóxica del peróxido de hidrógeno.

**0155. (0278) IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES EN EL TESTÍCULO NORMAL Y CRÓNICAMENTE INFLAMADO DE RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE).** P Jacobo, MS Theas, VA Guazzone, S Jarazo Dietrich, L Lustig

*Instituto de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires*

La OAE es un cuadro de inflamación crónica del testículo caracterizado por la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y lesión de los túbulos seminíferos que sufren apoptosis y descamación de las células germinales. Se ha demostrado que los linfocitos T regulatorios (TREG) CD4+ juegan un rol fundamental en la prevención de la autoinmunidad. Previamente detectamos un aumento en el % de linfocitos T (LT) CD4+ durante la fase de inducción de la OAE. Dado que aún no se ha demostrado la existencia de TREG en el testículo, nos interesó cuantificar TREG y analizar la relación TREG/LT efectores activados en la subpoblación CD4+ del testículo normal y durante el desarrollo de la OAE. La OAE fue inducida por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo E). Las ratas del grupo control (C) fueron inyectadas solo con adyuvantes y las del grupo normal (N) no recibieron ningún tratamiento. Los animales fueron sacrificados a los 30 (período de inmunización), 50 (fase de inducción) y 80 (fase crónica) días (d) posteriores a la primera inmunización. Por citometría de flujo, detectamos un aumento sostenido en el % de LT (totales) efectores activados (CD25+) en el testículo de ratas E respecto de C y N (50 d : N: 1,49±0,30, C: 3,11±0,60, E: 7,79±0,54\*; 80 d : N: 1,51±0,31, C: 2,38±0,37, E: 8,25±2,69\*, \* $p < 0.05$ ). Detectamos un aumento en el % de TREG CD4+CD25+Foxp3+ en el testículo de ratas E respecto de C y N, fundamentalmente en el período de inducción del cuadro (50 d: N: 1,35±0,11, C: 0,72±0,13, E: 13,48±1,74#; 80 d : N: 1,67±0,33, C: 1,22±0,19, E: 8,84±0,99#, # $p < 0,001$ ). La relación TREG/LT indicó que los TREG representan un 92% y 72% de los LT CD4+CD25+ presentes en el testículo durante las fases de inducción y crónica de la OAE, respectivamente. En base a estos resultados postulamos que el aumento en el % de TREG en el testículo de ratas con OAE representaría un intento no exitoso del sistema inmune por suprimir el desarrollo de autoinmunidad.

**0156. (0810) BLS INDUCE LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE PÉPTIDOS, GENERANDO UNA RÁPIDA ACTIVACIÓN Y EXPANSIÓN DE LINFOCITOS CD8+ IN VIVO.** P Berger<sup>1</sup>, J Mundiáno<sup>2</sup>, I Piazzon<sup>2</sup>, F Goldbaum<sup>1</sup>

*1 IIBBA, Fundación Instituto Leloir, CONICET, 2 ILEX-CONICET, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina*

La lumazina sintetas de *Brucella* spp. (BLS) es una proteína decamérica altamente inmunogénica. Su estructura permite la inserción de péptidos en sus 10 extremos N-terminales y estas quimeras generan inmunidad oral y sistémica sin adyuvantes. Demostramos que activa células dendríticas *in vitro* e induce su reclutamiento *in vivo*, siendo estos efectos dependientes de TLR4. En este trabajo investigamos la capacidad de BLS de inducir la presentación cruzada de un péptido de ovoalbúmina (OVA), inmunizando con la quimera BLS-OVA<sub>257-264</sub>. Se inocularon ratones C57Bl/6J vía iv con células CD8+ de ganglios de ratones transgénicos OT-I, purificadas por MACS y marcadas con CFSE. Estos linfocitos reconocen al péptido 257-264 de OVA en el contexto de MHC I. La inmunización sc con BLS-OVA<sub>257-264</sub> indujo la proliferación de las células OT-I en los ganglios drenantes a las 20hs post-inoculación, demostrada por FACS por la disminución en la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) de CFSE. Los datos se expresan como la MFI de CFSE±SD (BLS-OVA<sub>257-264</sub>: 535±97, PBS:1060±43;p<0.01). El porcentaje de linfocitos OT-I que expresaron el marcador de activación temprana CD69 aumentó significativamente a las 20hs (BLS-OVA<sub>257-264</sub>: 72±3.8, PBS:15.7±1.6;p<0.01). A los 5 días, la proliferación de las células OT-I continuó siendo muy intensa (p<0.0001). Además, se produjeron aumentos significativos de células OT-I activadas, representadas por linfocitos con altos niveles de CD44, en los ratones inoculados con la quimera. Los datos se expresan como la MFI de CD44 en células CFSE+ (BLS-OVA<sub>257-264</sub>:2385±365, PBS:1295±258; p<0.03). Los resultados indican que la asociación de péptidos a BLS induce su presentación cruzada, generando la activación y proliferación de linfocitos CD8+ específicos. A diferencia de otras vacunas basadas en subunidades, las quimeras de BLS resultan sumamente eficientes para la rápida activación de linfocitos CD8+.

**0157. (0183) COMPORTAMIENTO INMUNOBIOLOGICO DE LOS ANTICUERPOS DE CADENA PESADA DE LLAMA EN LA RESPUESTA FRENTE A UN MODELO DE EPITOPES CRÍPTICOS.** A Ferrari<sup>1</sup>, FS Weill<sup>1</sup>, MM Rodríguez<sup>2</sup>, P Power<sup>2</sup>, G Gutkind<sup>2</sup>, J Leoni<sup>1</sup>

1 Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A., 2 Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, U.B.A.

**Introducción:** En 1993 se publicó la existencia de inmunoglobulinas desprovistas de cadenas livianas (HCAbs) en dromedarios, y luego en el resto de la familia Camelidae. Numerosos grupos de investigación han enfocado su trabajo sobre las propiedades inmunoquímicas de los fragmentos variables de los HCAbs producidos como proteínas recombinantes (rVHHs). Sin embargo, todavía no se ha demostrado *in vivo* ninguna ventaja evolutiva por parte de estos anticuerpos no-convencionales. **Objetivo:** El presente trabajo apunta a estudiar el comportamiento de los HCAbs en su interacción con enzimas microbianas y a evaluar si en ellas reside la ventaja mencionada anteriormente. **Métodos:** Con este fin, se eligió una enzima bacteriana recombinante ( $\beta$ -lactamasa CTX-M-2 like) y se realizó con ella un plan de inmunización sobre dos llamas. Se estudió la capacidad de reconocer a la enzima y de modular su actividad, tanto del suero entero como de un isotipo convencional (IgG1) y uno no-convencional (IgG3). Las propiedades de estas tres fracciones fueron evaluadas a distintos tiempos durante el plan de inmunización, caracterizándose así la maduración tiempo-dependiente del comportamiento de los anticuerpos específicos contra la enzima. **Resultados:** Tanto el suero como la IgG1 muestran títulos séricos que progresan hasta un plateau, y luego se mantienen constantes hasta el final del plan de inmunización y son capaces de inhibir *in vitro* la actividad de la enzima. Por el contrario, la IgG3 muestra títulos siempre bajos, y se comporta como un potente activador a tiempos tempranos, para luego pasar a ser un inhibidor poco potente. **Conclusiones:** Estos resultados muestran que la capacidad inhibitoria de los HCAbs, propuesta como posible ventaja evolutiva, no es demostrable con el presente modelo enzimático. Permanece entonces vacante una explicación razonable para la existencia y supervivencia de especies con estos anticuerpos.

**0158. (0292) RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN EL MODELO DE LOS RATONES MUTANTES PARA CATEPSINA L (CTSLNKT).** MM Ricardi<sup>1</sup>, GL Camicia<sup>1</sup>, H Costa<sup>1</sup>, RP Meiss<sup>2</sup>, I Piazzon<sup>1</sup>, I Nepomnaschy<sup>1</sup>

1 ILEX-CONICET, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina, 2 IEO, Academia Nacional de Medicina

Los ratones CTSLnkt son portadores de una mutación en el gen que codifica para la proteasa lisosomal catepsina L que determina alteraciones en la selección positiva intratímica. Estas alteraciones derivan en una importante disminución en el porcentaje de células T CD4+ en el timo y en la periferia. Dado que estos mutantes presentan un aumento en el número de linfocitos B (LB) en los ganglios linfáticos nos propusimos investigar si su respuesta inmune humoral se encontraba alterada. Mientras que en ensayos de ELISA no detectamos diferencias significativas en los títulos de IgG3 sérica de ratones inmunizados con el antígeno T-independiente de tipo II NP-ficolil (P>0,05; n=9), los ratones CTSLnkt desafiados con el antígeno T-dependiente ovoalbumina (OVA) en adyuvante incompleto de Freund (IFA) mostraron menores títulos de IgGs totales (p<0,05; n=9) respecto a sus controles BALB/c. Mediante técnicas histológicas observamos centros germinales menos abundantes y con límites difusos en los ganglios linfáticos drenantes de una inoculación de OVA/IFA. Los títulos de IgG1 e IgG2a mostraron una disminución significativa (p<0,05;n=9 y p<0,001;n=9 respectivamente), mientras que no se detectaron diferencias en los títulos de IgG2b (P>0,05; n=9). El cociente IgG1/IgG2a resultó mayor en los ratones CTSLnkt (p<0,01; n=9) indicando una mayor polarización hacia una respuesta Th2, lo cual concordó con un aumento en la relación IL-10/IFN- $\gamma$  medida por RT-PCR. Esta polarización hacia una respuesta de tipo Th2 y los aumentos en el nivel de ARNm para TGF- $\beta$ , encontrados en los ganglios de los ratones CTSLnkt, sugieren que las células CD4+ CD25+ FOXP3+ -que están significativamente aumentadas en estos mutantes- podrían jugar un rol en el cambio del perfil de su respuesta humoral. Postulamos que las alteraciones observadas en los ratones CTSLnkt resultarían de un balance entre el aumento en el porcentaje de LB y las alteraciones en las poblaciones T CD4+.

**0159. (0708) MARCADORES DE APOPTOSIS EN CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE FABRY.** PN De Francesco, D Procopio, CA Fossati, PA Rozenfeld

LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP

La Enfermedad de Fabry (EF) es un desorden genético ligado al X causado por la deficiencia de la actividad de la enzima lisosomal  $\alpha$ -galactosidasa A, que conduce a la acumulación intralisosomal de glicolípidos complejos en diferentes tejidos, siendo el más abundante la globotriaosilceramida, Gb3. En la actualidad, el tratamiento específico consiste en el reemplazo enzimático (ERT). Para explicar en parte su fisiopatología se ha sugerido la existencia de un estado proinflamatorio crónico, similar al hallado en otras enfermedades de acumulación lisosomal. El objetivo de este trabajo es analizar marcadores de apoptosis en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con EF. Partiendo de muestras de sangre periférica de pacientes con EF, con y sin tratamiento de reemplazo enzimático (ERT), y de individuos normales, se estudió por citometría de flujo el estado de apoptosis, mediante las técnicas de Anexina V-FITC y TUNEL. Para la primera se utilizó sangre entera seguida de lisis de glóbulos rojos, y para la segunda, se aislaron PBMC por centrifugación en gradiente de Ficoll. Se distinguieron las diferentes subpoblaciones leucocitarias por sus características FSC-SSC, y se analizaron los valores de intensidad media de fluorescencia (MFI) y porcentaje de células con marcación positiva (%FITC+) de los ensayos en pacientes con EF, expresando ambas cifras como cociente respecto de las muestras normales. Se halló un aumento significativo respecto de la unidad (p<0,01) en

%FITC+ para Anexina V en Granulocitos de pacientes con EF. Al comparar los resultados entre pacientes con y sin ERT, se observó una disminución de la MFI de Anexina en Linfocitos ( $p < 0,05$ ) asociada al tratamiento, observándose la misma tendencia en esta población en el %FITC+ de Anexina, y MFI y %FITC+ de TUNEL. Los resultados indicarían la existencia de un estado de apoptosis exacerbado, que revierte parcialmente con la administración de ERT.

**0160. (0758) ANALISIS INMUNOQUIMICO Y COMPUTACIONAL DE LA REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE CASEINAS DE LECHE BOVINA Y PROTEINAS DE SOJA.** R Curciarello<sup>1</sup>, V González<sup>2</sup>, G Parisi<sup>2</sup>, S Petrucelli<sup>3</sup>, G Docena<sup>4</sup>

*1 LISIN y CIDCA-CONICET, Fac. de Cs.Exactas, UNLP, 2 Unidad de Fisiocquímica, Centro de Estudios e Investigaciones, UNQ, 3 CIDCA-CONICET, Fac.Cs.Exactas, UNLP, 4 LISIN, Fac. de Cs.Exactas, UNLP*

Estudios previos del grupo caracterizaron la reactividad cruzada entre caseínas bovinas, principal alérgeno alimentario en nuestro país, y proteínas de soja, frecuentemente empleadas en el tratamiento de la alergia a leche bovina (LV). Se obtuvieron en forma recombinante los distintos componentes de soja reactivos y un péptido que contiene la región C-terminal de las globulinas 7S, llamado  $\alpha$ -CTD. Se planteó identificar las secuencias involucradas en la reactividad cruzada y predecir los epitopes responsables, a partir de la información de secuencias disponibles en bases de datos. Por ELISA de inhibición, empleando un suero policlonal específico de LV y distintos inhibidores de soja, incluyendo  $\alpha$ -CTD, se logró desplazar la unión de los anticuerpos específicos de LV, lo cual confirma la reactividad cruzada observada previamente por otros métodos. Además,  $\alpha$ -CTD, que incluiría los epitopes responsables de la reactividad cruzada, mostró reactividad por inmunoblotting frente a anticuerpos monoclonales específicos de caseínas bovinas, y por ELISA indirecto frente al suero policlonal y distintos sueros de individuos alérgicos a LV. En el 92,3% de los sueros se reveló la presencia de IgE frente a  $\alpha$ -CTD. Sobre la base de estos resultados, se emplearon diversos métodos computacionales de predicción de epitopes para obtener péptidos de proteínas de soja y LV, con los cuales se realizaron análisis in silico para identificar las regiones implicadas en la reactividad cruzada. Por lo tanto, las proteínas recombinantes, al igual que sus contrapartidas naturales, mostraron la reactividad cruzada inmunológica y se identificaron regiones con similitud secuencial entre las diferentes subunidades de  $\beta$ -conglucina y las caseínas bovinas. Se propuso un modelo estructural para  $\alpha$ -CTD conteniendo las posibles regiones implicadas en la reactividad cruzada observada in vitro.

**0161. (0474) INFLUENCIA DEL BALANCE TH1/TH2 SOBRE LAS ALTERACIONES CONDUCTUALES INDUCIDAS POR EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO MODERADO.** ML Palumbo, GA Cremaschi, AM Genaro

*Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO) -CONICET -UBA*

El estrés así como desbalances en la producción de citoquinas tipo Th1 y Th2 han sido relacionados con enfermedades caracterizadas por trastornos cognitivos. En el presente trabajo se analizaron las alteraciones conductuales e inmunológicas inducidas por exposición a estrés crónico moderado (CMS) en ratones BALB/c y C57Bl/6 (C57), cepas con respuesta tipo Th2 o Th1, respectivamente. Observamos, una menor capacidad de aprendizaje y memoria en ratones BALB/c sometidos a CMS en un test de habituación evaluando las líneas cruzadas (LC), los rearing (R) y el tiempo de inactividad (Ti, seg), en el entrenamiento (E), a la hora y a las 24 hs (E,LC,N=65±4,CMS=95±10, R,N=4.7±0.4, CMS=5.87±0.7, Ti,N=150±20,CMS=81±23; 24hs,LC,N=32±4,CMS=91±8, R,N=1.8±0.4,CMS=4.1±0.6, Ti,N=242±17,CMS=141±15; n=10), no observándose diferencias en los C57 CMS (E,LC,N=93±12,CMS=182±20, R,N=14±2,CMS=18±2, Ti,N=106±24,CMS=55±16; 24hs,LC,N=53±7,CMS=105±13, R,N=7±1,CMS=11±2,

Ti,N=205±11, CMS=135±13;n=12). Por otra parte, se observaron cambios en la proliferación de linfocitos (L) inducida por mitógenos evaluada por incorporación de timidina tritiada. La respuesta proliferativa de LT fue menor y la de LB mayor en ratones BALB/c CMS (% del control, LT: 30±8, LB: 242±22, n=6) mientras que en los C57 la exposición a CMS indujo un aumento en la proliferación de LT sin cambios en la de LB (LT, 178±15,n=9). Finalmente, se determinaron por ELISA los niveles de citoquinas implicadas en patologías psiquiátricas: IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-6. Comprobamos un aumento en la producción de citoquinas tipo Th1 en ratones C57 CMS (n=4,  $p < 0,01$ ) y una disminución en los ratones BALB/c sometidos a CMS (n=5,  $p < 0,001$ ). Además observamos un significativo aumento de IL-6 en los ratones BALB/c CMS (n=5,  $p < 0,05$ ). Concluimos que los ratones BALB/c son más vulnerables que los C57 a los efectos del estrés crónico afectando su capacidad cognitiva asociado a una regulación diferencial de la respuesta inmune y del perfil de citoquinas.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES I

**0162. (0301) LA EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE STAT3 POR HEREGULINA (HRG) ES INDUCIDA POR UN MECANISMO DEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR) EN AUSENCIA DE SU LIGANDO Y ES UN PUNTO DE CONVERGENCIA ENTRE LOS PROGESTÁGENOS Y ERBB2 EN EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.** C Rosembit, CJ Proietti, W Beguelin, RP Carnevale, MA Rivas, V Sundblad, MC Díaz Flaqué, M Tkach, EH Charreau, R Schillaci, PV Elizalde

*Instituto de Biología Y Medicina Experimental*

Previamente demostramos que la HRG promueve la activación transcripcional de Stat3 (proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3) en células C4HD provenientes de un adenocarcinoma mamario murino progestágeno-dependiente y en la línea celular de cáncer de mama humano T47D. En el presente trabajo estudiamos la participación de PR en dicho proceso. El tratamiento de las células con HRG durante 48 hs indujo un aumento significativo en la expresión de la proteína Stat3. Este aumento fue bloqueado tanto por el tratamiento con el antagonista de progestágenos RU486 como por transfección con RNA de interferencia (RNAi) para PR. Mediante ensayos de transfección transiente con un plásmido reportero conteniendo 4 copias de la secuencia de alta afinidad de Stat3, m67, demostramos que el bloqueo de PR (por RU486 o RNAi) inhibió la capacidad de HRG de inducir activación transcripcional de Stat3 en ambos tipos celulares. Estos resultados demuestran que para inducir la activación transcripcional de Stat3 por HRG es necesaria la presencia de PR. A partir de estos resultados que muestran nuevamente que Stat3 es un efector de las vías de PR y HRG/ErbBs, realizamos ensayos en nuestro modelo experimental in vivo. Células C4HD transfectadas con el vector de expresión de la forma dominante negativa (DN) de Stat3, Stat3Y705-F, fueron inyectadas en ratones singéneos en presencia del progestágeno sintético MPA y se midió el volumen tumoral. En este grupo hubo significativamente menor número de tumores y menor tasa de crecimiento tumoral con respecto a los grupos controles. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de fosforilación del residuo S294 de PR, ni de ErbB-2 entre los grupos experimentales. Nuestros resultados demuestran que Stat3 es un punto de convergencia entre las vías de las hormonas esteroideas y los factores de crecimiento. El bloqueo de Stat3 podría constituir una terapia más efectiva en el tratamiento contra el cáncer de mama.

**0163. (0771) EL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) PRODUCE LIBERACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA) EN LA MITOCONDRIA POR INDUCCIÓN DE UNA ACIL-COA SINTETASA (ACS4) Y UNA ACIL-COA TIOESTERASA MITOCONDRIAL (ACOT2).** R Castilla, M Gadaleta, A Duarte, AF Castillo, A Lago, EJ Podestá

*Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas. Departamento de Bioquímica, Laboratorio HRDC, Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires*

El AA o sus productos de metabolización ciclooxigenados o lipoxigenados juegan un papel importante como mediador intracelular en la proliferación celular. EGF es un polipéptido cuya principal acción es la estimulación de la multiplicación celular pero también actúa en funciones diferenciadas. En la línea MA-10 de Leydig de ratón actúa promoviendo la liberación de AA y su metabolización a productos lipoxigenados que inducen la proteína StAR relevante para la esteroidogénesis. La liberación de AA en células esteroidogénicas estimuladas con LH o ACTH, se produce por la acción concertada de dos enzimas, ACS4 y Acot2. El objetivo de este trabajo fue determinar el mecanismo de liberación de AA y por ende de su metabolización a productos lipoxigenados por EGF. Se determinó que EGF 10 ng/ml produce aumento en la expresión tanto del ARNm de ACS4 como de Acot2 determinado por RT-PCR. El estudio en función del tiempo del patrón de expresión en ambos casos mostró una cinética bifásica. El máximo nivel de expresión del ARNm de ACS4 se obtuvo a las 2 hs ( $2\pm 0,6$  veces). Los picos de máxima expresión de ARNm de Acot2 se obtuvieron a las 0,5 ( $1,7\pm 0,7$  veces) y 5 hs ( $3,4\pm 0,3$  veces). Este aumento se acompañó de un incremento en el nivel de AA intramitocondrial ( $1,6\pm 0,3$  veces). El incremento en el contenido de AA no se observó en células transfectas con plásmido conteniendo el ADNc de Acot2 en posición antisentido, en cambio incrementó ( $2,7\pm 0,2$  veces) en células que sobreexpresaron Acot2. La reducción en la expresión de Acot2 redujo la expresión de StAR como consecuencia de una disminución del AA mitocondrial y de su metabolización a productos lipoxigenados. En conclusión EGF produce liberación de AA en un compartimiento específico de la célula, la mitocondria también por inducción de ACS4 y Acot2. Esta es la primera vez que se demuestra la regulación de estas enzimas por factores de crecimiento. El AA intramitocondrial es el responsable de la inducción de StAR estimulada por EGF.

**0164. (0837) ANÁLISIS DEL PATRÓN GÉNICO DE REGULACIÓN TARDÍA DEPENDIENTE DE PROGESTERONA EN CÉLULAS ESTROMALES.** AC Mestre<sup>1</sup>, G Vallejo<sup>1</sup>, M Beato<sup>2</sup>, P Saragüeta<sup>1</sup>

*1 IByME, 2 Centro de Regulación Genómica de Barcelona*

Previamente mostramos la proliferación de las células estromales de rata y el patrón génico regulado por progesterona a tiempos cortos de estimulación. El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre los genes de inducción temprana y los genes de inducción tardía regulados por progesterona y su participación en la proliferación dependiente de quinasas. Se hibridaron microarreglos de oligos de rata con cDNA de células U111-línea estromal endometrial de rata- tratadas durante 6h con la progesterona R5020 10-10M. Se obtuvieron 164 genes inducidos y 294 reprimidos. Estos resultados se compararon con el patrón génico regulado por tiempos cortos de R5020 (inducción temprana). Observamos: a) un subgrupo de 108 genes inducidos a las 6h sin regulación a los 45m, 1 gen inducido y 1 reprimido a los 45m; b) un subgrupo de 119 genes reprimidos a las 6h sin regulación a los 45m, 4 inducidos y 3 reprimidos a los 45m. Dentro de los 146 genes reprimidos a los 45m sin cambios a las 6h se identificaron y validaron por RT-PCR 3 de ellos, cuyos blancos son genes involucrados en el ciclo celular: 1) HMG-Sox15, una proteína no histona de cromatina, 2) CDKN1b-p27, inhibidor de ciclina dependiente de kinasa, y 3) Gfi1 (Growth Factor Independence1), un represor transcripcional. Identificamos las funciones moleculares asociadas al patrón génico tardío. El 52% de los genes posee un término ontológico asignado, siendo los términos que contienen mayor número de genes: Unión a proteínas, ácidos nucleicos y Actividad de transferasa. Dentro de las vías de señalización se encuentran Apoptosis, Ciclo celular, vía de MAPK, de fosfatidilinositol y de señalización de insulina. Estos resultados muestran que: a) la

mayoría de los genes tardíos regulados diferencialmente por progesterona no son blancos tempranos de esta hormona y b) la regulación negativa a tiempos cortos de varios represores del ciclo celular que podrían ser responsables de la actividad proliferativa dependiente de progesterona.

**0165. (0497) EXCLUSIÓN DE AMPc Y MRPs: NUEVOS BLANCOS PARA TERAPIAS DIFERENCIANTES EN LEUCEMIAS.** S Copsel<sup>1,2</sup>, C Shayo<sup>1</sup>, C Davio<sup>2</sup>

*1 Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME, 2 Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA*

Previamente hemos descripto que la duración e intensidad de la respuesta de AMPc cumplen un rol fundamental en los procesos de proliferación y diferenciación de las células leucémicas humanas U937. **Resultados** anteriores indican que dichas células excluyen AMPc en forma tiempo y concentración dependiente. Numerosos reportes indican que MRP4 y 5, miembros de la familia de proteínas de resistencia a multidroga (MRPs) son capaces de excluir nucleótidos cíclicos como el AMPc y el GMPc. Por lo tanto, nos planteamos como objetivo evaluar la expresión de MRPs en las células U937, su relación con el proceso de exclusión de AMPc y la asociación entre este mecanismo y los procesos de proliferación y diferenciación. Por medio de RT-PCR determinamos que las células U937 expresan MRP2, 4 y 5. Por otro lado, en cinéticas de producción de AMPc inducidas por amantamina 10  $\mu$ M (activador de la vía del AMPc) en presencia de rolipram 10  $\mu$ M (inhibidor de la familia de PDE4) observamos una reducción del 58.3 $\pm$ 4.0% en la exclusión de AMPc cuando las células son pretratadas con probenecid 500  $\mu$ M (inhibidor de MRPs). Por ensayos de incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina se determinó la inhibición de la proliferación, siendo del 0.8% al tratar las células con amantamina+rolipram y del 41.8% para amantamina+probenecid+rolipram ( $p<0.05$ ). Ninguna de estas combinaciones resultó tóxica para las células. Por otro lado, únicamente el tratamiento con amantamina+rolipram+probenecid condujo a la expresión del marcador de diferenciación monocítica, CD88. **Resultados** similares fueron obtenidos al utilizar verapamilo, otro inhibidor de MRPs. En base a estos resultados podemos concluir que al inhibir la exclusión de AMPc mediada por MRPs logramos una marcada reducción de la proliferación y un mayor grado de maduración celular frente al tratamiento con agentes que aumentan los niveles de AMPc. Por lo tanto, la modulación de MRPs podría ser considerada un nuevo blanco para terapias diferenciantes en leucemias.

**0166. (0616) EL ESTADO REDOX CONTRIBUYE AL DESTINO CELULAR POR LA OXIDACIÓN DE CISTEÍNAS ESPECÍFICAS DE MAPKS EN MITOCONDRIA.** VG Antico Arciuch<sup>1</sup>, S Galli<sup>1</sup>, DP Converso<sup>1</sup>, C Poderoso<sup>2</sup>, MC Carreras<sup>1</sup>, JJ Poderoso<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires, 2 Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

La modulación de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial determina el destino celular, favoreciendo la proliferación, el arresto o la apoptosis. El alto contenido de P-ERK está asociado a proliferación a baja [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] mientras que el arresto requiere alta [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] con activación de p38 y JNK. Nos propusimos determinar el mecanismo por el cual H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa MAPKs de manera específica y diferencial en la línea celular tumoral P07. Para estudiar la interacción entre MAPKs y sus MAPKs, las fracciones citosólica y mitocondrial se incubaron con ERK2, p38 o JNK2-GST fusionadas a agarosa, previamente oxidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los complejos se precipitaron y corrieron en un SDS-PAGE. La modulación de la localización subcelular de ERK2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se analizó transfecando células con las mutantes H230R, Y261N, C38A, C214A y C214E por western blot. La identificación de las cisteínas oxidables se llevó a cabo por espectrometría de masa (MS). La

oxidación de ERK2-GST a baja  $H_2O_2$  (condición proliferante) resultó en una marcada asociación a MEK y la interacción de p38 y JNK con sus MAPKs fue favorecida por incubación a alta  $H_2O_2$  (asociado a arresto celular). En células transfectadas con ERK2 H230R o Y261N la quinasa quedó retenida en mitocondria, disminuyendo su importe al núcleo. Por MS, a 0.1  $\mu M$   $H_2O_2$  los tioles de C38 y 14 de ERK2 fueron oxidados a -SO<sub>2</sub>H y -SO<sub>3</sub>H. En JNK2, a 1  $\mu M$   $H_2O_2$  los tioles de C41, 137, 177 y 222 fueron convertidos a -SO<sub>2</sub>H y C116 a -SO<sub>3</sub>H. A 20  $\mu M$   $H_2O_2$ , la C162 de p38 fue oxidada a -SO<sub>3</sub>H. Las transfecciones mostraron que  $H_2O_2$  no afectó el binding mitocondrial de MEK a ERK2 C214A. En ausencia de  $H_2O_2$ , se reestableció la asociación ERK2-MEK al reemplazar C por E, demostrando la importancia de las cargas negativas en estas interacciones. Estos resultados sugieren que la oxidación de MAPKs en mitocondria determina la interacción diferencial con sus MAPKs, causando un aumento de su fosforilación tras la oxidación y la activación selectiva de caminos de señalización celular.

**0167. (0091) EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA PROMUEVE EL CRECIMIENTO IN VIVO DE UN TUMOR DE MAMA MURINO.** MA Rivas<sup>1</sup>, M Tkach<sup>1</sup>, RP Carnevale<sup>1</sup>, C Rosembli<sup>1</sup>, CJ Proietti<sup>1</sup>, W Béguelin<sup>1</sup>, I Frahm<sup>2</sup>, EH Charreau<sup>1</sup>, PV Elizalde<sup>1</sup>, R Schillaci<sup>1</sup>

1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, 2 Servicio de Patología, Sanatorio Mater Dei

Previamente demostramos que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) induce la proliferación in vitro del adenocarcinoma mamario murino progestágeno dependiente C4HD, mediante la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Con el objetivo de determinar si el TNF es capaz de promover el crecimiento in vivo del tumor C4HD, un fragmento de tumor (2 mm<sup>3</sup>) se inocularon en ratones hembras Balb/c y se inyectó s.c. 10 ng TNF/día cercano al sitio de la inoculación. La incidencia tumoral al día 15 fue del 76% (n=26) para los tratados con TNF, mientras que ningún ratón inyectado con vehículo desarrolló el tumor. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño promedio de 60-70 mm<sup>3</sup>, los animales se dividieron al azar en cuatro grupos que recibieron: PBS, 10 ng TNF/día, 10 ng TNF/día + 100 ng del inhibidor de NF- $\kappa$ B Bay 11-7082 i.p./3 días o 10 ng TNF/día + vehículo i.p./3 días. La inhibición de NF- $\kappa$ B en el grupo TNF + Bay resultó en una disminución del tamaño tumoral (50.7  $\pm$  1.2 % vs los grupos tratados con TNF). Asimismo por histopatología (H&E), se evidenció una disminución del índice mitótico y del grado nuclear, y un aumento marcado de fibrosis. Se observó una disminución de la masa tumoral en los animales que recibieron PBS, poniendo en evidencia que este tumor requiere del TNF para su crecimiento. Mediante inmunohistoquímica en muestras de tumor tratado con TNF o TNF + vehículo se observó que la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B se localizó en el núcleo de las células, mientras que en los tumores tratados con TNF + Bay, p65 permaneció en el citoplasma, demostrando así la efectividad del inhibidor. En extractos de tumores tratados con Bay + TNF se observaron menores niveles de ciclina D1 y Bcl-xL con respecto a los grupos de TNF o TNF + vehículo. Estos datos constituyen la primera evidencia de que el TNF cumple in vivo un importante rol como promotor tumoral en cáncer de mama y que el Bay podría ser usado como un agente quimioterápico para el tratamiento de un tumor establecido.

## NEUROCIENCIAS II

**0168. (0061) TERAPIA GENICA INTRAHIPOTALAMICA CON EL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DE CELULAS DE LA GLIA (GDNF): REVERSION DE LA HIPERPROLACTINEMIA CRONICA EN LA RATA SENIL.** MJ Bellini<sup>1</sup>, GR Morel<sup>1</sup>, SS Rodríguez<sup>1</sup>, CB Hereñú<sup>1</sup>, MC Bohn<sup>2</sup>, RG Goya<sup>1</sup>

1 Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Cátedra de Histología B, Facultad de Ciencias Médicas,

UNLP, 2 Children's Memorial Research Center, Northwestern University, Chicago

La prevalencia de enfermedades neurodegenerativas aumentan notoriamente con el envejecimiento, destacándose la susceptibilidad de las neuronas dopaminérgicas (DA) centrales a los efectos deletéreos de la edad. En el hombre la pérdida excesiva de neuronas DA nigrales lleva a la enfermedad de Parkinson, mientras que en la rata hembra senil la pérdida progresiva de las neuronas DA tuberoinfundibulares (TIDA) hipotalámicas está asociada a una hiperprolactinemia progresiva y alta tasa de prolactinomas. El objetivo de este trabajo fue evaluar el posible efecto restaurador del GDNF, un potente factor trófico para neuronas DA, sobre las neuronas TIDA en la rata senil. Con este propósito utilizamos un vector adenoviral recombinante que expresa GDNF (RAD-rGDNF) y un vector adenoviral control que expresa el gen de la Beta Galactosidasa (RA-dBgal). Se trabajó con 4 grupos experimentales: ratas jóvenes (J) de 2,5 meses controles y tratadas con GDNF (Y-Bgal/Y-GDNF) y ratas seniles (S) de 29 meses controles y tratadas (S-Bgal/S-GDNF). Se extrajeron muestras de sangre de todas las ratas desde el día experimental -3 hasta el final del experimento, las cuales se utilizaron para determinar la prolactinemia por RIA. En el día experimental 0 las ratas fueron pesadas y recibieron, mediante cirugía estereotáxica, inyecciones intra-hipotalámicas bilaterales de los respectivos vectores (1010 pfu por lado). En el día experimental 17 los animales se pesaron y se sacrificaron por perfusión intracardiaca, para realizar análisis morfológicos del hipotálamo. El grupo S-GDNF mostró un descenso de peso significativo respecto a los controles ( $\Delta$ peso S-GDNF=-25 $\pm$ 10 gr, p< 0,05 vs  $\Delta$ peso S-Bgal=NS), consistente con el publicado en pacientes parkinsonianos y ratas normales; así como una disminución del 41% en los niveles de PRL sérica respecto a los controles. Estos resultados sugieren una acción restaurativa del GDNF sobre las neuronas TIDA.

**0169. (0336) EFECTOS DE LA CARGA ELÁSTICA SOBRE LA VARIABILIDAD DEL PATRÓN RESPIRATORIO EN PERROS ANESTESIADOS.** CE D'Negri<sup>1</sup>, FA Pessolano<sup>2</sup>, SE Monteiro<sup>2</sup>, EL De Vito<sup>1</sup>

1 Instituto Lanari, UBA, CONICET, 2 Instituto Lanari, UBA

**Introducción:** La carga elástica (CE) induce cambios en el patrón respiratorio (PR) en enfermedad restrictiva y en normales (T Brack, AJRCCM, 1998, 2002). Se ha hipotetizado que la disnea es responsable de estos cambios. **Objetivo:** Caracterizar la variabilidad, memoria a corto plazo y oscilaciones periódicas de baja frecuencia (OP) en perros anestesiados y bajo CE umbral (CEU). **Material y Método:** 8 perros, tiopental sódico y respiración espontánea, 20 CEU en estado estacionario (7 a 50 cmH<sub>2</sub>O). PR: fin de fase inspiratoria o switch off (tiempo inspiratorio, Ti), ritmo o timing (tiempo espiratorio, Te; tiempo total, Ttot; Ti/Ttot), impulso central o drive (volumen corriente (Vt)/Ti) y ventilación (VE). Comparación Basal vs CEU: prueba t de Student y Mann-Whitney (medias), F-Fisher y Bootstrap (comparación de varianzas), autocorrelación, AU (memoria a corto plazo (retraso -lag= 1 respiración) y análisis espectral (OP < 0.02 Hz). **Resultados:** Media de varianzas: aumentó en Ti/Ttot, disminuyó en Vt/Ti (p< 0.02). Dispersión de varianzas: aumentó en Ti/Ttot, disminuyó en Te, Ttot, Vt/Ti (p< 0.0005). AU de Vt y sus variables asociadas (Vt/Ti, Ve= Vt \* 1/Ttot) disminuyó (p< 0.002). AU aumentó para Te, Ti/Ttot y Ttot en cargas >30 cmH<sub>2</sub>O (p< 0.05). Proporción de OP de Vt y sus variables asociadas disminuyó (p< 0.01). La proporción OP disminuyó en Te, Ttot y Ti/Ttot en cargas >30 cmH<sub>2</sub>O (p< 0.01). AU y OP basales y CEU correlacionaron (r 0.79, p< 0.001). OP correlacionó con el valor de CEU (r 0.57, p< 0.01). **Conclusiones:** Bajo anestesia superficial en perros, la CEU tuvo diferentes efectos sobre los componentes del PR. El fin de fase inspiratoria no fue afectado; los componentes ritmo (excepto Ti/Ttot) tuvieron menor variabilidad, a cargas altas todos ellos tuvieron mayor proporción de memoria a corto plazo y menor OP; el impulso central disminuyó su variabilidad, memoria a corto plazo y OP. Por lo general, el PR más rígido se relacionó con la magnitud de la carga.

**0170. (0131) VARIANTE AXONAL DEL SÍNDROME DE GUILLAIN-BARRÉ: ESPECIFICIDAD FINA DE ANTICUERPOS IGG ANTI-GM1 COMO UN FACTOR DETERMINANTE DE LA SEVERIDAD DEL CUADRO CLÍNICO.** RD Lardone<sup>1</sup>, N Yuki<sup>2</sup>, GA Nores<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC, UNC-CONICET), Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 2 Department of Neurology, Dokkyo University School of Medicine, Tochigi, Japan*

El Síndrome de Guillain-Barré (SGB) es una poliradiculoneuropatía aguda dada por la demielinización o de la degeneración axonal producida por un ataque autoinmune al sistema nervioso periférico. Numerosos estudios asocian a los títulos altos de anticuerpos (Ac) IgG anti-GM<sub>1</sub> con la variante axonal (AMAN) del SGB, y les asignan un rol en la patogénesis. Sin embargo, no se han observado diferencias en los títulos que expliquen los distintos grados de severidad clínica con que la AMAN se presenta. Para investigar algunas características de Ac anti-GM<sub>1</sub> que pudieran determinar la severidad de la enfermedad, se analizaron 35 plasmas de pacientes con AMAN. El grado de severidad clínica se clasificó según la Escala de Graduación Funcional de Hughes (HFG) como leve (HFG=3, n=14) o severo (HFG=4, n=21). Los valores de afinidad, título y especificidad fina de Ac IgG anti-GM<sub>1</sub> se determinaron mediante HPTLC-inmunoconjugación, ELISA y ensayos de inhibición por antígeno soluble. La frecuencia de plasmas de pacientes con Ac de alta afinidad (74%) fue significativa (p=0,005), confirmando la importancia de la alta afinidad de los Ac para el desarrollo de la neuropatía. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las medias de los títulos o de los % de poblaciones de alta afinidad de los dos grupos de grado clínico ("leve" o "severo"). En cambio, la presencia de Ac IgG anti-GM<sub>1</sub> específicos (anti-GM<sub>1</sub>esp) correlacionó significativamente con un grado clínico severo, mientras que los Ac de reacción cruzada con GD<sub>1b</sub> (anti-GM<sub>1</sub>/GD<sub>1b</sub>) fueron asociados a un grado clínico leve. El estudio de la unión de los Ac en relación a la estructura tridimensional del GM<sub>1</sub> y del GD<sub>1b</sub> mostró que los Ac reconocerían zonas diferentes de la molécula del GM<sub>1</sub>. Pese a sus valores de afinidad similares, las diferencias en especificidad fina podrían influir en el establecimiento de interacciones GM<sub>1</sub>-Ac *in vivo* diferentes, determinando así diferencias en el grado de patogenidad de los Ac IgG anti-GM<sub>1</sub>.

**0171. (0154) LA PROGESTERONA (PROG) MODULA VARIOS MARCADORES DE REMIELINIZACIÓN EN UN MODELO DE LESIÓN DE LA MEDULA ESPINAL (ME).** F Labombarda, S González, A Lima, P Roig, A De Nicola

*Instituto de Biología y Medicina Experimental y Dto de Bioquímica Humana Fac Med UBA*

La PROG posee efectos neuroprotectores y remielinizantes luego de la injuria del sistema nervioso central. El proceso de remielinización incluye la proliferación y diferenciación de precursores de oligodendrocitos (OPC) a oligodendrocitos maduros (OL). Estudiamos en un modelo de transección (TRX) completa de ME por inmunohistoquímica y PCR en Tiempo Real, los efectos de la PROG (16mg/kg/día x 21 días) sobre la expresión de la proteína proteolípida (PLP) como índice de mielinización; sobre el número de células CC1 positivas (marcador de OL) y NGII positivas (marcador de OPC) y sobre la expresión de PDGFR $\alpha$  y de los factores de transcripción estimuladores de la diferenciación oligodendrocitaria (Olig 1, 2 y NKx.2.2). Estos marcadores se modificaron significativamente post-TRX. La PROG recuperó los niveles de densidad óptica para PLP (TRX+PROG 0,17  $\pm$  0,01 vs TRX 0,09  $\pm$  0,01 p<0,001) y la expresión de su ARNm (TRX+PROG 0,82  $\pm$  0,21 vs TRX 0,27  $\pm$  0,03 p<0,001); aumentó el número de CC1 positivas/area (TRX+PROG 24,67  $\pm$  1,89 vs TRX 11,67  $\pm$  3,71 p<0,01) y los niveles de expresión de Olig 1 (TRX+PROG 1,28  $\pm$  0,29 vs TRX 0,47  $\pm$  0,10 p< 0,05) sin modificar los de Olig 2 y NKx2.2 y disminuyó el número de NGII positivas/area (TRX+PROG 20,14  $\pm$  2,38 vs TRX 29,00  $\pm$  3,34 p<0,01) y el ARNm para

PDGFR  $\alpha$  (TRX+PROG 1,05  $\pm$  0,08 vs TRX 4,00  $\pm$  0,48 p<0,001). Estos resultados sugieren: 1) La PROG favorece la diferenciación de OPC hacia OL, ya que aumenta la síntesis de Olig 1 y disminuye el número de células NGII positivas y la expresión de PDGFR $\alpha$  (OPC) a favor de un aumento de células CC1 positivas (OL); 2) Estimula la remielinización post-injuria al aumentar la síntesis de PLP y el número de OL. Los efectos sobre mielina señalan a PROG como terapia promisorio para la injuria de la ME.

**0172. (0084) ACTIVIDAD AUTONÓMICA PERIFÉRICA DURANTE TAREAS DE COGNICIÓN SOCIAL EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA.** O Jáuregui<sup>1</sup>, E Costanzo<sup>2</sup>, D De Achával<sup>2</sup>, V Vilas<sup>2</sup>, L Sabe<sup>2</sup>, M Nogués<sup>2</sup>, R Leiguarda<sup>2</sup>, S Guinjoan<sup>2</sup><sup>3</sup>

*1 Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 2 Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI), 3 Departamento de Neurofisiología, Facultad de Psicología, UBA, Buenos Aires*

**Introducción y Objetivos:** Los pacientes con esquizofrenia exhiben una activación autonómica anormal durante algunas tareas cognitivas. No está aclarado si este fenómeno se extiende a tareas de cognición social, donde los pacientes tienen déficits clínicamente significativos. **Material y Métodos:** Se evaluó mediante el análisis de variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) la actividad nerviosa autonómica durante Test de Reconocimiento Facial de Benton (TRF), Test de Reconocimiento de Emociones en Caras y Ojos (TRE) de Baron-Cohen, Test de *Faux Pas* (TFP) y Test de Historias de Teoría de la Mente de Happé (TOM) en 10 pacientes con esquizofrenia y 5 personas sanas comparables. **Resultados:** En condiciones basales, las contribuciones simpática y parasimpática a la VFC total fueron similares en ambos grupos. Los pacientes exhibieron una actividad simpática cardíaca (como % de VFC de baja frecuencia, LF) menor durante el TRF (11 $\pm$ 18 vs. 50 $\pm$ 12, t=-4,33, p=0,001), el TRE (14 $\pm$ 22 vs. 40 $\pm$ 10, t=-3,1, p=0,008) y el TFP (12 $\pm$ 16 vs. 49 $\pm$ 7, t=-6,177, p<0,001). Durante el TFP se observó también una disminución de la VFC de origen vagal en pacientes (como % de VFC de alta frecuencia, HF; 3 $\pm$ 5 vs. 15 $\pm$ 7, t=-3,847, p=0,002). La actividad autonómica durante TOM fue similar en ambos grupos. En controles, el desempeño durante el TRE estuvo asimismo relacionado con el balance simpato-vagal periférico (LF/HF, r=0,894, p=0,041). **Conclusiones:** Queda por estudiarse si los déficits específicos en la activación autonómica durante tareas de cognición social derivan del compromiso conocido de estructuras centrales y si se relacionan con los déficits clínicos en esa área.

**0173. (0050) ASIMETRÍA DE LAS ÁREAS DEL LENGUAJE EN EL CEREBRO FETAL IN VIVO.** M Bendersky<sup>1</sup>, I Tamer<sup>2</sup>, G Gonzalez<sup>1</sup>, F Montero<sup>1</sup>, G Schuster<sup>2</sup>, REP Sica<sup>3</sup>

*1 III Cátedra de Anatomía Normal Facultad de Medicina-Universidad de Buenos Aires, 2 Fundación FEMIEN, 3 Secretaría de Ciencia y Técnica Universidad de Buenos Aires (UBACYT)*

**Introducción:** El cerebro humano presenta áreas asimétricas, las más llamativas son el giro de Heschl (GH) y el plano temporal (PT), mayores a izquierda. Estudios postmortem o ecográficos *in vivo* han demostrado estas asimetrías desde el período prenatal. Este es el primer estudio que analiza intraútero si estas asimetrías se desarrollan igualmente en cerebros con patologías neurológicas. **Objetivos:** Identificar el GH y el PT en Resonancias Magnéticas (RM) cerebrales prenatales. Definir si existen asimetrías interhemisféricas en cerebros normales y patológicos. **Material y Métodos:** 50 embarazadas de entre 20 y 38 semanas de gestación fueron sometidas a RM del cerebro fetal, separando los resultados en un grupo control (n= 15) y otro patológico (n=35). Dos observadores identificaron y midieron el GH y el PT en los planos axial y coronal y la longitud del surco lateral en el plano sagital en ambos grupos. Para confirmar la identificación deL GH y el PT, se realizaron RM de 10 cabezas fetales normales, de entre 18 y 30 semanas, identificando dichas estructuras en la RM e *in vitro*. **Métodos estadísticos:** Se calculó el coefi-

ciente de correlación intraclase, se realizó un test t para muestras pareadas y se calculó el índice de asimetría. **Resultados:** Las estructuras mencionadas se identifican correctamente a partir de las 24 semanas. En la muestra presente los cerebros normales mostraron una asimetría interhemisférica altamente significativa ( $p=0,0009$ , IA 16,56), que fue menor en los patológicos ( $p=0,0279$ , IA 3,02). **Conclusiones:** Las áreas temporales del lenguaje son asimétricas desde etapas tempranas del desarrollo. El grado de significación estadística fue menor en los cerebros patológicos, sugiriendo una menor diferenciación entre áreas simétricas en estos cerebros. Dada su relación con la dominancia hemisférica, esto podría tener implicancias relacionadas al desarrollo posterior del lenguaje y otras funciones en cerebros con malformaciones.

**0174. (0037) EL ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA MODULA POSITIVAMENTE LA COMPLEJIDAD Y LA LONGITUD DEL ÁRBOL DENDRÍTICO EN EL HIPOCAMPO DE RATONES DIABÉTICOS.** J Beauquis<sup>1</sup>, P Roig<sup>1</sup>, AF De Nicola<sup>1,2</sup>, F Saravia<sup>1,2</sup>

*1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490 (1428) Buenos Aires, 2 Depto de Bioquímica Humana, Fac de Medicina UBA*

La diabetes mellitus correlaciona con numerosas alteraciones cerebrales, siendo el hipocampo una de las áreas más sensibles. Por otro lado, es sabido que la depresión, que puede asociarse a cambios hipocampales, es frecuente en esta enfermedad. En esta línea hemos reportado alteraciones del hipocampo en ratones diabéticos por estreptozotocina (STZ), como la disminución de la neurogénesis en el giro dentado, reversible por tratamiento con fluoxetina (FXT). En este trabajo nos propusimos el estudio morfológico de las neuronas piramidales de CA1, mediante la técnica de impregnación argéntica de Golgi. Ratones machos C57BL/6 de 16 semanas fueron diabetizados con STZ (195 mg/kg) y 10 días después tratados con FXT (10 mg/día) o vehículo durante 10 días. Se constató hiperglucemia y disminución del peso corporal en los animales diabéticos. Se procesaron los cerebros según la técnica modificada de Golgi y se realizaron cortes de 200  $\mu$ m en vibrátomo. Se analizaron las neuronas piramidales positivas de la región de CA1 con un mínimo de 15 por animal. Mediante la reconstrucción tridimensional computarizada y empleando el análisis de Sholl se midió la longitud dendrítica total, la que en relación al control fue menor en el grupo diabético tratado con vehículo pero aumentó con el tratamiento con FXT (en  $\mu$ m, control  $1640 \pm 231,8$ , control+FXT  $1533 \pm 52,7$ , diabético  $987,3 \pm 19,9$   $p < 0,01$  vs. control, diabético+FXT  $1377 \pm 70,5$   $p < 0,05$  vs. diabético). También se analizó la ramificación del árbol dendrítico encontrando una disminución en los animales diabéticos y una corrección de este parámetro con el tratamiento con FXT. Por otro lado, no hubo diferencias en la densidad de espinas dendríticas entre los grupos. Estos resultados denotan claros efectos deletéreos de la diabetes sobre la plasticidad neuronal del hipocampo. El tratamiento antidepresivo logra revertir estos cambios, modulando positivamente el desarrollo del árbol dendrítico, lo que favorecería una mayor conectividad sináptica.

**0175. (0588) LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DEL RECEPTOR SOLUBLE DE TNF- $\alpha$  PROTEGE EL EFECTO LOCAL DE STX2 EN ESTRIADO DE RATA.** J Boccoli<sup>1</sup>, CF Loidi<sup>2</sup>, V Pistone Creydt<sup>1</sup>, C Ibarra<sup>1</sup>, J Goldstein<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Fisiopatología, Dep. Fisiología, Fac. de Medicina, UBA, 2 Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof E. De Robertis", Fac. de Medicina, UBA*

La toxina Shiga (Stx) proveniente de *Escherichia coli* enterohemorrágica (STEC) causa colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH) y encefalopatía aguda, uno de los mayores factores de riesgo de mortalidad infantil. Previamente publicamos que la directa administración intracerebroventricular (icv) de Stx2 en cerebros de rata causó lesiones en diferentes tipos celulares. El presente trabajo demuestra la participación de TNF- $\alpha$  en el mismo modelo descripto. Para ello comparamos los efectos de Stx2

en presencia y en ausencia de un receptor soluble de TNF- $\alpha$  (RsTNF- $\alpha$ ). Luego de 8 días de tratamiento las ratas fueron anestesiadas, perfundidas y sus cerebros extraídos para estudios morfológicos. Se observó una lesión en el estriado con disminución de sustancia blanca causada por la Stx2 analizada por tinción de Nissl, que alteró los niveles de expresión de la proteína gliofibrilar ácida en dosis dependiente visualizada por inmunofluorescencia. La lesión fue atenuada por la administración combinada de la Stx2 y el RsTNF- $\alpha$ . Finalmente se observó por microscopía inmunoelectrónica usando partículas de oro coloidal acoplado a un anticuerpo secundario que reconoce a anti-Stx2 que el tratamiento combinado de Stx2 con el RsTNF- $\alpha$  redujo significativamente ( $p < 0,01$ ) la distribución de la toxina en núcleos y zonas perinucleares con RER de neuronas estriatales, y axones mielínicos. No se detectaron partículas de oro en el control de isotipo, negativo o tratado con un vehículo. Por lo tanto la disminución en el número de partículas correspondientes a Stx2 encontradas en neuronas y fibras del estriado tratadas con el RsTNF- $\alpha$  coincidió con una atenuación de la lesión desarrollada por la toxina. Estos resultados preliminares sugieren que la inducción local de TNF- $\alpha$  por Stx2 potencia la lesión estriatal.

## SISTEMA CARDIOVASCULAR II

**0176. (0086) LA PRESIÓN ARTERIAL REGULA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MODELO DE HIPERTENSIÓN POR COARTACIÓN AÓRTICA.** AH Polizio, SB Gorzalczy, ML Tomaro

*Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

La coartación aórtica, entre las arterias renales, produce dos zonas definidas, una hipertensa en donde queda incluida la arteria aorta torácica y la otra normotensa, donde se encuentra la aorta abdominal. El objetivo del trabajo fue determinar si la aorta torácica, en este modelo, es afectada por el estrés oxidativo y si éste es generado por la angiotensina II o por factores hemodinámicos como la presión arterial. Para ello, ratas Wistar de 250-300 g fueron sometidas a ligación de la arteria aorta abdominal durante 7 días (Coa). A un grupo de ellas se les administró minoxidil (120 mg/kg) (Coa-minoxi) vía oral, a otro losartan (10mg/kg día) (Coa-Los) durante 7 días. A otro grupo de animales se los sometió a una operación simulada (Sham) y se les administró de la misma manera minoxidil (Sham-Minox) o losartan (Sham-Los). La producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en aortas torácicas, fue evaluada por el método de la lucigenina, aumentada un 42% ( $p < 0,01$ ) en los animales Coa con respecto al grupo Sham. Este aumento fue inhibido un 82% con DPI (inhibidor de la NAD(P)H oxidasa) y un 37% con indometacina (inhibidor de la prostaciclina sintetasa). Las expresiones de las subunidades proteicas de la NAD(P)H oxidasa; gp91phox, p22phox y p47phox, la abundancia relativa de las proteínas nitrosiladas y de la hemooxigenasa (HO)-1 se encontraron aumentadas un 150%, 225%, 180%, 300%, 237% y 75% ( $p < 0,01$ ) respectivamente, como también disminuida la relación GSH/GSSG un 75% en los animales Coa comparado con los Sham y el tratamiento con losartan o minoxidil revirtió totalmente dichos parámetros. **Conclusión:** El tratamiento con minoxidil o losartan redujo no solamente las subunidades gp91phox, p47phox y p22phox sino también la formación de proteínas nitrosiladas, la expresión de la HO-1 y aumentó el GSH/GSSG. Por lo tanto, los resultados obtenidos confirmaron que la presión arterial fue la responsable de la inducción del estrés oxidativo y de la expresión de la NAD(P)H oxidasa en arteria aorta torácica.

**0177. (0516) POTENCIACIÓN DEL EFECTO HIPOTENSOR DEL ENDOCANABINOIDE/ENDOVANILOIDE ANANDAMIDA POR EL FACTOR DE ENTORNO PALMITOILETANOLAMIDA.** SM Celuch<sup>1</sup>, MC García<sup>1,2</sup>, E Adler-Graschinsky<sup>1</sup>

*1 Instituto de Investigaciones Farmacológicas (CONICET), 2 Cát. de Farmacología, FFyB (UBA)*

La acción del endocanabinoide/endovaniloide araquidonoleatolamida (anandamida; AEA) puede ser potenciada por otros derivados de ácidos grasos estructuralmente relacionados con ella y que se denominan factores de entorno. Previamente observamos que la administración intratecal (i.t.) de AEA en ratas anestesiadas induce un efecto hipotensor relacionado con la activación de receptores canabinoides CB1 y vaniloides TRPV1 espinales. El objetivo del presente estudio fue analizar el posible efecto de entorno de la palmitoiletanolamina (PEA) sobre la respuesta hipotensora a la AEA. Se usaron ratas macho Sprague-Dawley anestesiadas con uretano (1.2 g/kg; i.p.). La presión arterial (PA) se registró a través de un catéter colocado en la arteria femoral. La administración i.t. de drogas se realizó mediante un catéter ubicado a nivel T12-L1 de la médula espinal. AEA (25, 50 y 100 nmoles) produjo una disminución dosis-dependiente de la PA media ( $\Delta$ PAM:  $-1.2 \pm 2.4$ ,  $-10.5 \pm 1.3$  y  $-17.3 \pm 1.3$  mmHg, respectivamente;  $n=4-6$ ). PEA (100 nmoles) no modificó per se la PAM basal pero potenció el efecto hipotensor de 25 y 50 nmoles de AEA ( $\Delta$ PAM:  $-16.3 \pm 4$  y  $-20.0 \pm 1.8$  mmHg, respectivamente;  $n=6$ ). PEA también potenció el efecto hipotensor de 25 y 50 nmoles de un análogo no metabolizable de la AEA, la metanandamida. Por otra parte, bajas dosis del endocanabinoide/endovaniloide N-araquidonoleatolamina (25 nmoles) y del agonista vaniloide capsaicina (0.3 nmoles) produjeron efectos hipotensores ( $\Delta$ PAM:  $-11.7 \pm 0.9$  mmHg y  $-11.6 \pm 1.6$  mmHg, respectivamente;  $n=5-6$ ) sólo cuando se los co-administró con PEA. PEA no modificó el efecto hipotensor del agonista CB1/CB2 WIN 55212-2. Se sugiere que PEA se comportaría como un factor de entorno capaz de aumentar el efecto hipotensor de bajas dosis de AEA a nivel espinal. Esta potenciación podría involucrar una sensibilización del receptor TRPV1. Subsidiado por SECYT (BID 1728/OC-AR-PICT 5-14107) y CONICET (PIP 5695).

**0178. (0624) LA INSULINA POTENCIA CENTRALMENTE LA RESPUESTA PRESORA A LA ANGIOTENSINA II.** MA Mayer, C Höcht, E Silberman, J Opezzo, M Gironacci, A Carranza, CA Taira, BE Fernández, AM Puyó  
FFYB - UBA

Con el objetivo de evaluar si la insulina modifica centralmente la respuesta presora a la angiotensina II (Ang-II), se estudiaron los efectos sobre la presión arterial media (PAM) de la administración de una dosis subpresora de Ang-II tras la perfusión previa de insulina en los ventrículos laterales en ratas control (C) y resistentes a la insulina (F). Ratas macho fueron divididas en dos grupos: (F): fructosa (10% P/V por 6 semanas); (C): grupo control. Se canuló una arteria para la determinación de la PAM, y se colocó una aguja en el ventrículo lateral derecho. Se perfundió insulina (12 mU/h) o solución de Ringer a un flujo de 1  $\mu$ l/h durante dos horas y se evaluaron los cambios en la PAM en C y F en respuesta a la inyección de Ang-II 5pmol. Mientras que la inyección de Ang-II no modificó la PAM en ratas C que recibieron Ringer como tratamiento previo ( $\Delta$ PAM:  $-0.74 \pm 1.1$  mmHg), incrementó de forma significativa la PAM en ratas C tras la administración previa de insulina ( $\Delta$ PAM:  $6.2 \pm 0.9$  mmHg,  $p < 0.001$  vs. C). La inyección de Ang-II incrementó significativamente la PAM en ratas F tanto tras recibir tratamiento previo con Ringer ( $\Delta$ PAM:  $5.6 \pm 1.3$  mmHg,  $p < 0.01$  vs. C) o con insulina ( $\Delta$ PAM:  $3.5 \pm 0.5$  mmHg,  $p < 0.01$  vs. C; NS vs F Ringer). Estos resultados indican que la insulina potencia la respuesta presora central a la Ang-II en ratas control, y sugiere un nuevo mecanismo mediante el cual la insulina influye sobre el control de la presión arterial. La existencia de una respuesta presora a la Ang-II en ratas F y la falta de cambios significativos en esta respuesta tras la perfusión previa de insulina podrían deberse a la hiperinsulinemia presente en este modelo.

**0179. (0009) CONTROL DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS EN CORAZÓN Y RIÑÓN DE RATAS UNINEFRECTOMIZADAS SHR Y WKY MEDIANTE BLOQUEO AT1.** M Angerosa, G Cao, L Madalena, JE Toblli  
Laboratorio de Medicina Experimental. Hospital Alemán

**Introducción:** El sistema renina-angiotensina (SRA) mediante Angiotensina II (Ang II) ejerce efectos tróficos y modula el crecimiento de tejidos (riñón-corazón) además Ang II esta involucrada en mecanismos de apoptosis. Agentes anti-SRA han probado reducir el daño tisular. La rata espontáneamente hipertensa (SHR) con uninefrectomía (UNX) es una combinación de severa hipertensión arterial y daño renal progresivo. **Objetivo:** Evaluar protección cardio-renal del bloqueo del receptor-AT1 de Ang II con Valsartán (VAL) en proliferación celular (PCNA) y apoptosis (Caspasa-3) en corazón-riñón de SHR-UNX. **Métodos:** SHR y control Wistar Kyoto (WKY). Se practicó UNX. Durante 6 meses: [G1] UNX-SHR ( $n=8$ ) agua. [G2] UNX-WKY ( $n=8$ ) agua. [G3] UNX-SHR+VAL ( $n=8$ ) con VAL 50 mg/kg/día. [G4] UNX-WKY+VAL ( $n=8$ ) con VAL 50 mg/kg/día. Se evaluó en corazón-riñón Caspasa-3 y PCNA por inmunoperoxidasas (IP) e inmunofluorescencia (IF). Se usó: anti-active Caspase-3 y anti-rabbit IgG-R rhodamine conjugado (TRITC) y 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). **Resultados:** Al 6to mes: ClCr  $\mu$ l/min/gPC: G1= $1.2 \pm 0.1^*$ , G2= $2.9 \pm 0.1$ ; G3= $2.6 \pm 0.3$ , G4= $3.9 \pm 0.2^{**}$ . Proteinuria(mg/día): G1= $253 \pm 39$ , G2= $63 \pm 10$ ; G3= $67 \pm 9$ , G4= $15 \pm 7^{**}$ . Presión Arterial (mmHg): G1= $218 \pm 17$ , G2= $154 \pm 7$ ; G3= $147 \pm 8$ , G4= $121 \pm 3^{**}$ . IHQ: 1-Riñón: Caspasa-3 por IF (% área positiva/mm<sup>2</sup>) G1= $11.6 \pm 3.5^*$ , G2= $6.8 \pm 1.5$ ; G3= $5.8 \pm 1.8^{***}$ , G4= $2.7 \pm 1.1^{***}$ . PCNA por IP (células positivas/mm<sup>2</sup>) G1= $51.1 \pm 8.9^*$ , G2= $16.8 \pm 2.9$ ; G3= $17.4 \pm 3.2^{**}$ , G4= $8.6 \pm 3.3^{**}$ . 2-Corazón: Caspasa-3 por IP (células positivas/mm<sup>2</sup>) G1= $12.1 \pm 4^*$ , G2= $7.5 \pm 2.2$ ; G3= $8.1 \pm 2.3^{***}$ , G4= $3.9 \pm 1.5^{**}$ . PCNA, tanto por IP como por IF, fue negativa en todos los casos ( $p < 0.01^*$  vs todos G;  $p < 0.01^{**}$  vs G2 & G3;  $p < 0.01^{***}$  vs G2). **Conclusiones:** VAL redujo significativamente expresión de Caspasa-3 en riñón y corazón en UNX-SHR y UNX-WKY y disminuyó la respuesta proliferativa en riñón. El bloqueo del SRA mediante VAL modula favorablemente el mecanismo de apoptosis en corazón-riñón y la proliferación celular en riñón SHR y WKY con UNX.

**0180. (0623) ACTIVACIÓN SECUENCIAL DE PKA Y CAMKII Y SU RELACIÓN CON ALTERACIONES CONTRÁCTILES Y DE RELAJACIÓN MIOCÁRDICAS, EN UN MODELO DE COARTACIÓN AÓRTICA EN RATA.** RV Becerra, R Gonulenko, MM Said, G Rinaldi, I Luccotti, C Mundiña-Weilenmann, A Mattiazzi, L Vittone

Centro de Investigaciones Cardiovasculares - Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

El estrés hemodinámico sostenido causa hipertrofia ventricular izquierda (HVI) e insuficiencia cardíaca (IC). En la progresión hacia la HVI e IC ocurren alteraciones del tono simpático y de la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular. Sin embargo la secuencia temporal de estas alteraciones se desconoce. En este trabajo se estudió la expresión y fosforilación de proteínas que regulan el manejo del Ca<sup>2+</sup> intracelular y la función cardíaca, en la evolución hacia la HVI e IC en un modelo de coartación aórtica (CA) en rata. Se estudiaron ratas 3, 5, 7 y 9 meses post CA y se compararon con las correspondientes SHAM (S). Luego de 3 meses, la función sistólica y diastólica medida in vivo disminuyó: velocidad máxima de desarrollo de presión  $4478 \pm 228$  (CA,  $n=9$ ) vs.  $5581 \pm 416$  mmHg/sec (S,  $n=7$ ) y constante de relajación Tau  $13.6 \pm 1.1$  (CA) vs.  $8.4 \pm 0.8$  msec (S). A los 5 meses, el deterioro de la función se superó transitoriamente en asociación con un aumento de la fosforilación PKA-dependiente de la fosfolamban (PLN), proteína reguladora de la bomba de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmático (SERCA2a), en el sitio Ser16. A los 7 meses se instaló la HVI [peso ventrículo izquierdo/peso del cuerpo  $2.26 \pm 0.04$  (CA,  $n=6$ ) vs.  $2.07 \pm 0.01$  mg/g (S,  $n=9$ )] y una respuesta deteriorada a la prueba de esfuerzo. A los 9 meses, se reinstaló el deterioro contráctil con aumento de la presión diastólica final y sin cambios de expresión del canal de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmático, el intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>, la SERCA2a o la PLN. Sin embargo PLN aumentó su fosforilación en Thr17, sitio fosforilado por la proteína quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>-calmodulina (CaMKII). Estos datos sugieren que en la progresión a la HVI e IC hay un cambio en las vías de señalización que se

asocia a un cambio en la función. Se sugiere que la activación de PKA sería la expresión del aumento del tono simpático compensador de la función cardíaca, en tanto que el aumento en la actividad de CaMKII estaría asociado a cambios que la deterioran.

**0181. (0626). LA CaMKII ACTIVA AL INTERCAMBIADOR Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Y CONTRIBUYE A LA RECUPERACIÓN PHI DE UNA CARGA ÁCIDA EN MIOCITOS AISLADOS DE RATA.** M Vila Petroff, C Mundifia-Weilenmann, M Huergo, A Mattiazzi

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

Trabajos recientes indican que el aumento de la actividad del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) en respuesta a una acidosis intracelular se debe a la interacción del H<sup>+</sup> con su sitio alostérico y a su fosforilación por quinasas activadas por mitógenos. Por otra parte, en experimentos previos demostramos que la recuperación de la contractilidad durante la acidosis depende de la activación de la quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina tipo II (CaMKII). Sin embargo, el impacto de esta quinasa sobre la actividad del NHE y la recuperación del pHi no ha sido establecido. En este estudio examinamos si la CaMKII activa al NHE y contribuye a la recuperación del pHi luego de una carga ácida. Con este propósito, sometimos cardiomiocitos de rata cargados con el indicador fluorescente de pHi, SNARF-1/AM, a una acidosis intracelular generada por: 1) un pulso de CINH4 y su posterior lavado (n=6) 2) el cambio de una solución HEPES por otra amortiguada con CO<sub>3</sub>HNa y equilibrada con 5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub> (BIC), al mismo pH de 7,4 (n=5) y 3) hipercapnia a pH constante, inducida por cambio de la solución BIC por otra similar pero equilibrada con 20% CO<sub>2</sub>-80% O<sub>2</sub> y con mayor [CO<sub>3</sub>HNa] para mantener el pH en 7,4 (n=4), realizado en presencia de SITS, inhibidor del cotransporte Na<sup>+</sup>/CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> también alcalinizante. La velocidad de recuperación del pHi (dpHi/dt (min<sup>-1</sup>)), utilizada como indicador de la actividad del NHE, se midió en ausencia (control) y presencia de 1 μM KN-93, un inhibidor de la CaMKII, y fue para 1) 0,17±0,03 y 0,06±0,01\*; para 2) 0,09±0,02 y 0,03±0,02\*; y para 3) 0,12±0,03 y 0,03±0,02\*. **Resultados** similares se obtuvieron usando 2,5 μM AIP, un inhibidor más específico de la CaMKII. Estos resultados demuestran que la CaMKII regula la actividad del NHE y contribuye a la recuperación del pHi durante una carga ácida. Este mecanismo podría participar en la recuperación mecánica espontánea que se presenta en la acidosis. \* p<0.05 vs. control.

**0182. (0399) EFECTOS DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA SOBRE PARÁMETROS METABÓLICOS, HEMODINÁMICOS Y MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO EN RATAS CON SOBRECARGA DE FRUCTOSA.** AM Puyó<sup>1</sup>, A Carranza<sup>1</sup>, MA Mayer<sup>1</sup>, IR Faya<sup>1</sup>, HA Peredp<sup>2</sup>

*1 Cátedra de Anatomía Humana (macro y microscópica), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 2 Cátedra de Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires y CONICET*

La sobrecarga de fructosa en la rata provoca resistencia a la insulina, dislipidemia, hipertensión arterial y daño oxidativo, además de modificar la producción de sustancias vasoactivas como los prostanoídes (PR). El esteroide adrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) tiene una conocida acción antioxidante. Nuestro objetivo fue analizar los efectos de la DHEA sobre parámetros hemodinámicos, metabólicos, marcadores de daño oxidativo y liberación de sustancias vasoactivas en este modelo experimental de síndrome metabólico. Ratas macho Sprague-Dawley se dividieron en 4 grupos (todos n=6): Control (C, agua para beber); Fructosa (F, solución de fructosa 10 % P/V); C + DHEA (D, DHEA sc, 15 mg/Kg/día) y fructosa + DHEA (FD, ambos tratamientos) durante 9 semanas. Se midió la presión arterial sistólica (SBP) indirecta, trigliceridemia (TG), liberación de PR del lecho mesentérico y alfa-tocoferol plasmáticos (HPLC) y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) por método fluorométrico.

La fructosa aumenta la SBP (mmHg, F: 136±5 vs. C: 117±2, p<0.01) y la TG (mg/dl, F: 200±26 vs. C: 101±14, p<0.02); la DHEA disminuye ambos parámetros en FD (122±1 vs. F, p<0.02; 106±13 vs. F, p<0.01). La DHEA también baja los TG en D (F: 37±5 vs. C, p<0.01) y disminuye los PR vasoconstrictores PG F2 alfa y tromboxano A2 en FD (FD: 48±10 vs. F: 92±7, p<0.05; FD: 25±4 vs. F: 43±6, p<0.05). La DHEA aumenta el alfa-tocoferol plasmático (corregido por TG), en D (mmol/mol TG, D: 62±10 vs. C: 23±3, p<0.01) y normaliza los niveles en FD (FD: 19±2 vs. F: 12±2). Los TBARS no son modificados por estos tratamientos. En conclusión, la DHEA aumenta el alfa-tocoferol mucho más en animales controles que en los tratados con fructosa, mostrando una menor protección antioxidante en estos últimos. Además, la DHEA normaliza la SBP (aumentada por la sobrecarga de fructosa) al menos en parte, al disminuir la liberación vascular de PR vasoconstrictores.

**0183. (0586) EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAMIOCÁRDICA DE UN PLÁSMIDO CODIFICANTE PARA VEGF165 EN OVEJAS CON INFARTO DE MIOCARDIO REPERFUNDIDO DE 15 DÍAS DE EVOLUCIÓN.** FD Olea<sup>1</sup>, A De Lorenzi<sup>2</sup>, C Cortés<sup>2</sup>, O Cendoya<sup>2</sup>, L Cuniberti<sup>1</sup>, P Cabeza Meckert<sup>1</sup>, G Yannarelli<sup>1</sup>, G Vera Janavel<sup>1</sup>, R Laguens<sup>1,2</sup>, A Crottogini<sup>1</sup>

*1 Universidad Favaloro, 2 Fundación Favaloro*

Hemos demostrado que la transferencia génica con un plásmido codificante para VEGF165 humano (pVEGF) reduce el tamaño del infarto agudo de miocardio (IAM) ovino por efectos que incluyen angio-arteriogénesis, hiperplasia miocítica, proliferación de mioblastos y antifibrogénesis. En el presente trabajo evaluamos el efecto del pVEGF sobre el tamaño del área necrótica y la función ventricular en ovejas con IAM reperfundido, una situación de creciente incidencia clínica debido al uso de técnicas de revascularización precoz. En ovejas con 90 minutos de ligadura de la descendente anterior seguida de reperfusión se realizaron 10 inyecciones intramiocárdicas de 0,38 mg de pVEGF165 (n=8) o pNull (n=8). Para evaluar la homogeneidad de la extensión inicial del IAM, se midió troponina I sérica a las 5 hs del IAM. Previo a la cirugía, y a los 3 y 15 días post-IAM se midió función del ventrículo izquierdo (VI) por ecocardiografía. Previo al sacrificio (15 días post-IAM) se midieron las presiones sistólica (PFS) y diastólica (PFD) y dP/dt del VI por cateterismo con catéter-tip. El VI se dividió en 6 rodajas transversales y se fijó en formol. El tamaño de IAM se calculó como porcentaje de fibrosis respecto del área total de VI en cortes histológicos de toda el área de cada rodaja teñidos con tricrómico de Masson. **Resultados:** A 5 hs del IAM, los valores de troponina I no difirieron entre grupos, indicando homogeneidad en la preparación del modelo. A los 15 días, el tamaño de IAM fue 15,7±5% en el grupo pVEGF y 24,9±6,6% en el pNull (X±DS, p<0,01). La fracción de acortamiento (eco) fue 43,4±5,2% en pVEGF y 33,6±5,8% en pNull (p<0,01) y el engrosamiento parietal sistólico septal (eco) tendió a ser mayor en el pVEGF (51,4±22,3) que en el pNull (36,1±9,6%, p<0,09). No hubo diferencias en PFS, PFDS y dP/dt entre grupos. **Conclusión:** la transfección con pVEGF165 reduce el área necrótica y mejora la función ventricular regional en ovejas con IAM reperfundido de 15 días de evolución.

## FARMACOLOGÍA II

**0184. (0222) ESTUDIO DE LA TOXICIDAD MITOCONDRIAL DE UN FLAVONOIDE AISLADO DE DALEA ELEGANS.** I Elingold<sup>1</sup>, MB Casanova<sup>1</sup>, AM Celentano<sup>2</sup>, C Perez<sup>3</sup>, JL Cabrera<sup>4</sup>, RA Diez<sup>5</sup>, M Dubin<sup>1</sup>

*1 CEFYBO UBA-CONICET, Fac. de Medicina, 2 Depto. de Microbiología, Fac. de Medicina (UBA), 3 Cát. de Farmacología, Fac. de Odontología (UBA), 4 Cát. de Farmacología, Depto. de Farmacia, Fac. de Ciencias Químicas (UNC), 5 Cát. de Farmacología, Fac. de Medicina (UBA)*

El 2'-4'-dihidroxi-5'-(1''-dimetilalil)-6-prenilpinocebrina (6PP), flavonoide prenilado aislado de *Dalea elegans*, presenta actividad contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Candida glabrata*, *C. krusei* y *C. albicans* con resistencia múltiple a drogas, aisladas de pacientes con SIDA. Resultados previos mostraron que 6PP presentó actividad antioxidante y antirradical, inhibición de la enzima F0-F1ATPasa, inhibición del consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3 y estímulo del estado 4 respiratorio (Elingold y col. SAIC, 2006). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de 6PP sobre algunas enzimas asociadas con la cadena de transporte de electrones (succinato deshidrogenasa (SDH) y NADH oxidasa) y sobre el potencial de membrana mitocondrial (PMM). Los resultados mostraron una inhibición de ambas enzimas (IC50 25  $\mu$ M y 19  $\mu$ M respectivamente). En presencia de malato-glutamato como sustrato respiratorio, el PMM disminuyó 32% luego de 25 min de incubación con 6PP 50  $\mu$ M. Con la adición de 6PP 100  $\mu$ M, el PMM se redujo a 47 y 56% luego de 10 o 25 min de incubación, respectivamente. Cuando se usó succinato como sustrato, 6PP 50 y 100  $\mu$ M, redujo el PMM a 33 y 48% luego de 10 min de incubación, respectivamente. 6PP 25, 50 y 100  $\mu$ M a los 25 min de incubación, disminuyó el PMM a 34, 55 y 56%, respectivamente. En resumen, caracterizamos parcialmente la actividad de 6PP demostrando efectos tóxicos sobre mitocondrias aisladas, causados principalmente por el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa e inhibición de enzimas mitocondriales.

**0185. (0298) FARMACOCINÉTICA DE P-AMINOHIPURATO EN RATAS INTOXICADAS CON CLORURO MERCÚRICO. ROL DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE ANIONES ORGÁNICOS OAT3.** G Di Giusto<sup>1</sup>, HR Girolami<sup>2</sup>, AM Torres<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Área Farmacología, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR., <sup>2</sup> Área Toxicología, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR., <sup>3</sup> Área Farmacología, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. CONICET.

El mercurio inorgánico es un potente nefrotóxico que se acumula principalmente en corteza renal. Es captado por las células epiteliales del túbulo proximal que constituyen el primer blanco celular donde el mercurio ejerce su efecto tóxico *in vivo*. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar, en ratas intoxicadas con cloruro mercúrico, la farmacocinética de p-aminohipurato (PAH, anión orgánico modelo, 30 mg/kg p.c., i.v.) y la abundancia del transportador de aniones orgánicos 3 (Oat3) en homogenados de corteza renal mediante Western blotting. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas controles (C, n =5) y tratadas con una dosis única de HgCl<sub>2</sub> (T, 5 mg/kg p.c., s.c., n =7) 18 h antes del experimento. Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM (\*p < 0,05). Las ratas T presentaron un incremento del área bajo la curva de concentración plasmática de PAH en función del tiempo (mg/min/mL, C: 1.22  $\pm$  0.18, T: 6.59  $\pm$  0.61\*) y una disminución del clearance sistémico de PAH (mL/min/100g p.c., C: 2.67  $\pm$  0.34, T: 0.48  $\pm$  0.04\*). Asimismo presentaron una disminución de la constante de eliminación del compartimiento central (K<sub>1-0</sub><sup>1</sup> min<sup>-1</sup>, C: 0.364  $\pm$  0.086, T: 0.090  $\pm$  0.018\*). Como la metabolización y excreción biliar de PAH son despreciables, la disminución observada en la K<sub>1-0</sub> indicaría una menor excreción renal de dicho anión. No se observaron diferencias significativas entre grupos en el volumen de distribución del compartimiento central (mL/100g p.c., C: 8.70  $\pm$  1.74, T: 6.09  $\pm$  0.77), mientras que el volumen de distribución total presentó una disminución en el grupo de ratas T como consecuencia de la disminución del volumen de distribución periférico (mL/100g p.c., C: 22.68  $\pm$  5.89, T: 10.33  $\pm$  1.26\*). La expresión de Oat3 se encontró disminuida en las ratas T (% C: 100  $\pm$  5, T: 68  $\pm$  7\*). Las ratas intoxicadas con HgCl<sub>2</sub> presentan una disminución en el clearance sistémico de aniones orgánicos que se explicaría, al menos en parte, por la disminución en la expresión de Oat3.

**0186. (0808) PROPIEDADES ANTITUMORALES IN VITRO DE AISLADOS POLIPEPTÍDICOS DE AMARANTO MANTEGAZZIANUS.** DA Barrio, MC Añón

Centro de Investigaciones y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Calle 47 y 116 La Plata (1900) Argentina

En los últimos años se ha incrementado la atención en los efectos beneficiosos de los alimentos sobre la salud humana. En este sentido, las semillas de amaranto presentan importantes propiedades nutricionales, siendo una fuente rica en proteínas con buen balance de aminoácidos esenciales. Con el objetivo de analizar los potenciales efectos antitumorales *in vitro* de las proteínas de amaranto mantegazzianus se obtuvieron aislados proteicos, diferentes sub-fracciones polipeptídicas e hidrolizadas con alcalasa. Se utilizaron cuatro líneas celulares: UMR106, MC3T3-E1, Caco-2 y TC7 en las cuales se determinó la proliferación celular por el método del cristal violeta. A partir de curvas dosis respuesta se calculó la concentración en mg/ml que inhibe el 50% de la proliferación celular (DI50). Las sub-fracciones polipeptídicas se separaron por microfiltración (cut off > 12 kDa y < 30 kDa). Los hidrolizados se obtuvieron con alcalasa y el grado de hidrólisis fue del 30%. El aislado de amaranto presentó diferente efecto inhibitorio sobre las líneas celulares, siendo más potente para la línea UMR106 (DI50: 0.5  $\pm$  0.02); Caco-2 (DI50: 1.1  $\pm$  0.03); MC3T3-E1 (DI50: 1.5  $\pm$  0.05) y TC7 (DI50: 2.2  $\pm$  0.03). Se comparó el efecto inhibitorio de las proteínas de amaranto, soja y albúmina bovina en las células UMR106 observando que el amaranto es 20 veces más potente que la soja (DI50: 10) y no se apreció efecto inhibitorio de la albúmina (DI: > 30). Las sub-fracciones de peso molecular mayores a 12 kDa y menores a 30 kDa poseen una DI50: 0.9  $\pm$  0.04 y DI50: 0.1  $\pm$  0.02, respectivamente. El hidrolizado de amaranto inhibió la proliferación de las UMR106 con una DI50: 0.1  $\pm$  0.03, cinco veces más potente que el aislado de origen. En conclusión los péptidos de amaranto son más potentes que los de soja sugiriendo un potencial efecto antitumoral, además la proteólisis potenciaría éste efecto. El peso molecular de la mayoría de los péptidos activos del aislado de amaranto estaría entre 12 y 30 kDa.

**0187. (0713) FARMACOVIGILANCIA ARGENTINA: LABOR DE LA UNIDAD DE FARMACOVIGILANCIA DE LA SEGUNDA CÁTEDRA DE FARMACOLOGÍA - FACULTAD DE MEDICINA - U.B.A.** G Di Girolamo, GA Keller, MF Amato, M Serrate, P Szajnowicz, P Szajnowicz, M Segura

Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina - U.B.A.

En Argentina, desde 1993, existe la Red Nacional de Farmacovigilancia, centrada en ANMAT, con nodos periféricos. Nuestro nodo, creado en 1998, replanteó su actividad en 2004, con un enfoque proactivo desde 2006, además del registro de notificaciones espontáneas. Las notificaciones son incorporadas a una base de datos (SQL), además de ser enviadas a ANMAT. Describimos aquí las notificaciones recibidas (demografía y tipos de eventos notificados; efecto adverso, falta de eficacia o falla de calidad) y el resultado de la intervención analítica del INAME, cuando la misma fue requerida. De noviembre de 2004 a agosto de 2007 se recibieron 432 notificaciones (426 drogas). Hubo predominio de mujeres (58%), con una baja proporción de pacientes pediátricos (3%) y elevada de pacientes >60 años (23%). La mayoría correspondió a efectos adversos (81%), seguidos llamativamente por las notificaciones de falta de eficacia (14%). El grado de severidad fue mayoritariamente leve (38%), seguido por severas (33%) y moderadas (29%). Las categorías más numerosas de medicamentos involucradas en efectos adversos fueron antimicrobianos (17%), antineoplásicos (13%), vacunas (10%) y AINE (8%). La presencia de vacunas se debe a embarazadas incorrectamente vacunadas con vacuna anti-rubeólica durante la reciente campaña nacional (n=35). En falta de eficacia, las más numerosas fueron las drogas usadas en anestesia (29%), antimicrobianos (13%), AINE (9%), drogas para afecciones cardiovasculares (9%) y del SNC (6%). Todas las muestras de notificaciones de falta de eficacia o falla de calidad fueron enviadas al INAME y el resultado de la verificación técnica fue informado como "cumple con las especificaciones". La presencia de

población añosa y los grupos de drogas involucradas en efectos adversos es consistente con los datos de otros estudios de farmacovigilancia. El análisis preliminar sugiere una marcada diferencia entre la percepción de los prescriptores/notificadores y la evaluación analítica.

**0188. (0724) CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD TRIPANOCIDA DEL DERIVADO M129 DE IMIDAZOLISOQUINOLINONA.** AB Ciccarelli<sup>1</sup>, M Bollini<sup>2</sup>, A Bruno<sup>2</sup>, ME Lombardo<sup>3</sup>, A Batlle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CIPYP, UBA-CONICET, <sup>2</sup> Dpto. QUIMICA ORGANICA, FFyB - UBA, <sup>3</sup> Dpto. QUIMICA BIOLÓGICA, FCEN - UBA

La enfermedad de Chagas es un importante problema en la salud pública de Latinoamérica. Los dos fármacos de uso terapéutico utilizados nifurtimox y benznidazol son tóxicos y activos en la fase aguda de la enfermedad. Por esto es necesario diseñar y desarrollar nuevas drogas más eficaces y menos tóxicas. El tripantrín (alcaloide aislado de una planta medicinal *Strobilanthes cusia*) posee una buena actividad antiparasitaria para Malaria y la enfermedad de Chagas. A partir del tripantrín se diseñó el heterociclo 2,3-dihidroimidazo[1,2-b]isoquinolin-5(1H)-ona y un derivado C-10 sustituido del mismo mostró una excelente actividad tripanocida con IC50,5  $\mu$ M (nifurtimox IC50 7,7  $\mu$ M). Para el M129 evaluamos a) estabilidad en el cultivo a 28° C, b) su cuantificación mediante una banda espectral presente entre 274-320 nm con Amáx a 302 nm, c) por voltametría cíclica detectamos interacción con GSH pero no con hemina, d) en concentraciones 0,5; 2,5 y 5,0  $\mu$ M fue agregada a cultivos de *T. cruzi* en fase exponencial tardía por 4, 7 y 24 horas observando: i) a una concentración 0,5  $\mu$ M daño oxidativo que se manifiesta a tiempos cortos por un aumento en el contenido de grupos SH sin modificación en la actividad de superóxido dismutasa (SOD). A las 7 hs la actividad de esta enzima aumenta (de 3,90 $\pm$ 0,10 a 5,10 $\pm$ 0,12 UE/mg) y permanece constante hasta las 24 hs. ii) para 5  $\mu$ M de droga independientemente del tiempo la SOD disminuye entre 30-40% su actividad mientras que el contenido de tioles reducidos aumenta un 35-40%, iii) a concentración 2,5  $\mu$ M muestra aumento en la SOD a tiempos cortos y deterioro a las 24 hs, mientras el contenido de grupos SH trata de contrarrestar el daño y iv) las células en presencia de M129 disminuyen su movilidad y tienden a redondearse. Frente al stress oxidativo un aumento en el contenido de grupos tioles precede a la inducción de la SOD y prevalece aun cuando esta última se inactiva por el daño celular producido por altas concentraciones de droga.

**0189. (0133) EFECTO DE LA NIFEDIPINA SOBRE PROPIEDADES HEMORREOLÓGICAS DE LA MEMBRANA DEL GLÓBULO ROJO EN PACIENTES CON ESCLERODERMIA SISTÉMICA.** MI Spengler<sup>1</sup>, MJ Svetaz<sup>2</sup>, MB Leroux<sup>3</sup>, PA Carrara<sup>2</sup>, SM Bertoluzzo<sup>1</sup>, FM Parente<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R., <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Bioquímica y Farmacia, U.N.R., <sup>3</sup> Cátedra de Dermatología, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R., <sup>4</sup> Cátedra de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R.

Trabajos previos demostraron que algunas propiedades de la membrana del glóbulo rojo (GR) estaban afectadas en la esclerodermia sistémica (SS). El objetivo del presente trabajo fue valorar el efecto del tratamiento con nifedipina (bloqueador dihidropiridínico de los canales de calcio) sobre: a) el índice de rigidez de la membrana del GR (IR) que es la inversa de la deformabilidad eritrocitaria, b) el coeficiente de anisotropía (r) que es la inversa de la fluidez lipídica de la membrana y c) la fragilidad osmótica del GR de 47 mujeres con SS (37 $\pm$ 6 años) y 22 pacientes estaban medicadas con colchicina (1mg/día) y nifedipina (30 mg/día) y 25 sólo con colchicina (1mg/día). El IR se midió por filtración de una suspensión de GR con membrana nucleopore, el r por el método de polarización de fluorescencia y el valor de la concentración de ClNa que produce el 50% de hemólisis (x50)

se determinó por espectroscopia. Se evidenció que los valores promedios fueron significativamente menores para pacientes tratadas con nifedipina que para las pacientes que sólo recibían colchicina: de IR (13,40 $\pm$ 2,00 vs. 17,40 $\pm$ 2,42; p<0,01), de r (0,164 $\pm$ 0,03 vs. 0,201 $\pm$ 0,020; p<0,001) y de x50 (0,364 $\pm$ 0,0010 vs. 0,395 $\pm$ 0,035; p<0,005). Es probable que la nifedipina, al bloquear los canales de Ca<sup>++</sup> disminuya la concentración intracelular del mismo y la interacción de éste con los componentes de la membrana. En la SS, la nifedipina tendría doble beneficio: efecto vasodilatador y mejoría en estas tres variables hemorreológicas medidas, lo que favorecería el flujo sanguíneo.

**0190. (0764) ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO DEL CARBOPLATINO SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS DE LEYDIG.** G Suarez, L Brion, M Mori Sequeiros García, CF Mendez, C Paz

*Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas. Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA*

Los complejos del platino, entre ellos el carboplatino (CBP), son quimioterápicos utilizados en el tratamiento de distintos tipos de tumores. Si bien se ha evaluado la eficacia clínica y los efectos adversos de estas drogas, sus acciones sobre la función de las células esteroidogénicas no han sido aún investigadas. Nuestro proyecto es caracterizar las acciones de los compuestos del platino sobre células esteroidogénicas. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del CBP sobre la producción de esteroides en células de Leydig de la línea MA-10. Se evaluó la producción de progesterona (P4) por radioinmunoensayo en el medio de incubación de células expuestas a CBP (5 o 50  $\mu$ M) durante 5, 7 o 24 hs en presencia o ausencia de 0,5 mM de 8-Br-AMPC durante las 3 últimas hs. Se analizaron por western blot los niveles de Hsp70 y P-ERK1/2 en células incubadas con CBP (5  $\mu$ M) entre 0 y 5 hs y entre 0 y 60 min respectivamente. La exposición durante 5 o 7 hs a 5 o 50  $\mu$ M de CBP no modificó la esteroidogénesis estimulada por AMPc ni la basal. En contraste, 24 hs de exposición a 50  $\mu$ M de CBP redujo la producción de P4 estimulada por AMPc: 260 $\pm$ 20 vs. CBP 150 $\pm$ 10 ng P4/ml (p<0,05), sin modificar la producción basal: 25 $\pm$ 3 vs. CBP 22 $\pm$ 2 ng P4/ml. La inhibición de la producción de P4 por CBP fue ligeramente superior a la esperada en función del descenso registrado en la viabilidad celular medida por tinción con azul de tripan (85 $\pm$ 10% del control). El tratamiento con 5  $\mu$ M de CBP fue efectivo para incrementar los niveles de Hsp70 y los de P-ERKs en los tiempos estudiados. Concluimos que la exposición al CBP durante tiempos cortos no afecta la estimulación de la fase aguda de la esteroidogénesis aún cuando promueve la activación de vías intracelulares relacionadas con la injuria y defensa celular. El efecto inhibitorio del CBP sobre la esteroidogénesis registrado a tiempos prolongados reflejaría, mayormente, la tasa de muerte celular y de células comprometidas a la apoptosis.

**0191. (0129) METABOLISMO DE ARGININA POR EL SISTEMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA/ARGINASA EN FIBROBLASTOS MURINOS NORMALES Y TUMORALES. REGULACIÓN POR EL SISTEMA COLINÉRGICO NO NEURONAL.** A Español, MP Negroni, ME Sales

*CEfYBO-CONICET*

Se ha documentado que la inflamación crónica está asociada con patologías como la diabetes, la aterosclerosis o el cáncer. En este trabajo nos proponemos investigar en forma comparativa en fibroblastos murinos normales NIH3T3 tratados con lipopolisacárido de *E. coli* (10 ng/ml) e interferón gama (0,5 ng/ml) (LPS+IFN $\gamma$ ) (NIH3T3\*) y en fibroblastos murinos tumorales SCA-9, el metabolismo de la arginina por las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS)/arginasa (A) y la modulación del mismo por el sistema colinérgico no neuronal (SCnN). Las células NIH3T3\* producen mayores concentraciones de óxido nítrico (NO) medido como nitritos (NO<sub>2</sub>- $\mu$ M/10<sup>4</sup> cél.) (12,40 $\pm$ 0,59; n=12) que las SCA-9 (4,02 $\pm$ 0,74; n=8). El efecto se revirtió por el agregado de

atropina (AT) ( $10^{-5}$ M). Por Western blot demostramos que la isoforma NOS1 está expresada en las células NIH3T3\*, mientras que las 3 isoformas de NOS se expresan en las células SCA-9. El tratamiento con el agonista colinérgico carbacol (CARB) ( $10^{-9}$ M) aumentó significativamente la producción de nitritos tanto en NIH3T3\* ( $16,22 \pm 0,46$ ;  $n=8$ ) como en las células SCA-9 ( $6,91 \pm 1,05$ ;  $n=8$ ). La arginina también es metabolizada por la enzima arginasa en ambos tipos celulares, pero mientras que las células NIH3T3\* expresan sólo la isoforma All las células tumorales expresan Al>All. La producción de urea ( $\mu\text{moles}/10^6$  cél.) fue significativamente mayor en éstas últimas ( $69,22 \pm 29,68$ ;  $n=8$ ) con respecto a las NIH3T3\* ( $30,30 \pm 1,63$ ;  $n=8$ ). El CARB estimuló la actividad de arginasa tanto en NIH3T3\* ( $60,79 \pm 7,52$ ;  $n=8$ ) como en las SCA-9 ( $188,19 \pm 11,03$ ;  $n=8$ ) efecto que fue revertido por AT. Concluimos que el metabolismo de la arginina es modulado por el ScNn diferencialmente en estas células: la vía NOS es preponderante en las células normales en un entorno inflamatorio mientras que en las células tumorales la arginina es principalmente metabolizada por arginasas que aportarían sustratos para la síntesis de poliaminas necesarias para la proliferación celular.

**0192. (0490) DETERMINACIÓN DE LAS BASES MOLECULARES DE ACCIÓN DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE GLUCOCORTICOIDES.** LD Alvarez<sup>1</sup>, A Veleiro<sup>1</sup>, DM Presman<sup>2</sup>, A Pecci<sup>2</sup>, G Burton<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMYMFOR-CONICET-UBA; Dto. Química Orgánica, FCEN-UBA, <sup>2</sup> Dto. de Qca. Biológica, FCEN-UBA, <sup>3</sup> IFIBYNE-CONICET

El receptor de glucocorticoides (GR) es una proteína modular que se expresa en la mayoría de las células de mamíferos e interviene en numerosos procesos fisiológicos, como la respuesta al estrés, inflamación y apoptosis. Uno de los mecanismos de acción del GR más estudiados es la transactivación. Aunque se sabe que la activación del GR involucra la unión del glucocorticoide al mismo, la translocación del complejo al núcleo, la dimerización, la unión del dímero a elementos de respuesta situados en los promotores de genes blanco, el reclutamiento de coactivadores y el posterior ensamblaje de la maquinaria transcripcional, poco se conoce sobre la relación entre la estructura química del ligando y el comportamiento del GR en cada una de estas etapas. En este trabajo, en busca de determinar las bases moleculares de acción de dos análogos rígidos de glucocorticoides previamente sintetizados en nuestro grupo (21OH-6,19OP y 21-hemisuccinato-6,19-OP), se realizaron ensayos biofarmacológicos junto a una simulación computacional de Dinámica Molecular de los distintos complejos GR-ligando. Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia indirecta muestran que ambos complejos translocan al núcleo. Sin embargo, mientras el 21OH-6,19OP presenta una actividad antagonista de la acción de dexametasona, el 21-hemisuccinato-6,19-OP es un agonista per se. El análisis computacional muestra que existen diferencias en la conformación global promedio de la proteína entre los dos complejos simulados, especialmente en dos regiones críticas para la actividad del GR como lo son la interfase de dimerización y el dominio de unión a los coactivadores, que explicarían el patrón de actividad hallado. De esta manera, el conjunto de los resultados aquí obtenidos proporciona información relevante para el diseño racional de nuevos ligandos que modulen la acción del GR de manera tal de potenciar los efectos benéficos y de minimizar los no deseados para su uso clínico.

**0193. (0125) PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN EL EFECTO DE TEOFILINA SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA EN GLÁNDULA SUBMAXILAR MURINA.** M Dasso<sup>1</sup>, A Español<sup>2</sup>, M Castro<sup>2</sup>, R Diez<sup>1</sup>, ME Sales<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA, <sup>2</sup> CEFYBO-CONICET

Se han descrito efectos específicos de compuestos amargos en tracto gastrointestinal y glándulas exócrinas. Hemos estudia-

do el efecto de teofilina (TEO) sobre la secreción de amilasa salival en glándulas submaxilares (GSM) de ratones BALB/c, que se trataron ex vivo evaluando mediante un método colorimétrico la actividad de amilasa secretada (mg maltosa/min.g.tej.húm.) con respecto a la actividad enzimática total. TEO inhibió la secreción de amilasa en forma concentración-dependiente, siendo  $10^{-9}$ M la concentración inhibitoria máxima (TEO:  $0,016 \pm 0,001$ ; Basal:  $0,180 \pm 0,004$ ;  $p < 0,01$ ). Investigamos el rol de la óxido nítrico sintasa (NOS) en el efecto de TEO, tratando las GSM con el inhibidor no selectivo de NOS, L-NMMA ( $10^{-4}$ M) o con aminoguandina ( $10^{-5}$ M) inhibidor selectivo de NOS2 y luego con TEO ( $10^{-9}$ M). Sólo L-NMMA revirtió el efecto de TEO ( $0,160 \pm 0,010$ ;  $n=3$ ), lo que concuerda con la expresión de NOS1 y NOS3, y ausencia de NOS2 en las GSM tal como demostramos por inmunomarcación. Además el agregado de TEO ( $10^{-9}$ M) a las GSM inhibió significativamente la producción de nitrito ( $\mu\text{M}/\text{mg tej. húm.}$ ) ( $67,0 \pm 3,4$ ;  $n=3$ ) con respecto al control sin tratamiento ( $93,9 \pm 5,5$ ;  $n=3$ ) ( $p < 0,01$ ). Concluimos que TEO inhibe la liberación de amilasa en GSM por un mecanismo dependiente de la producción de óxido nítrico, derivado de isoformas calcio dependientes.

**0194. (0228) NAFTOIMIDAZOLES CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA. ESTUDIOS DE TOXICIDAD MITOCONDRIAL HEPÁTICA.** MB Casanova<sup>1</sup>, I Elingold<sup>1</sup>, AM Celentano<sup>2</sup>, M Taboas<sup>1</sup>, RFS Menna-Barreto<sup>3</sup>, AV Pinto<sup>4</sup>, SL De Castro<sup>3</sup>, M Dubin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CEFYBO UBA-CONICET, Fac. de Medicina, <sup>2</sup> Depto. de Microbiología, Fac. de Medicina (UBA), <sup>3</sup> Depto. de Ultraestructura e Biología Celular, Inst. Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil, <sup>4</sup> NPPN, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Rio de Janeiro, Brasil

Naftoimidazoles derivados de la b-lapachona: N1 (fenil), N2 (3-indolil) y N3 (p-metilfenil) tienen efectiva actividad tripanocida. Resultados previos mostraron inhibición de la lipoperoxidación microsomal hepática sin afectar la actividad de enzimas dependientes del citocromo P-450. Nuestro objetivo es estudiar el efecto de éstas drogas en mitocondrias y partículas submitocondriales de hígado de rata. La adición de N1 y N3 (25 y 50  $\mu\text{M}$ ) a una suspensión mitocondrial con succinato como sustrato respiratorio, estimuló el consumo de oxígeno en estado 4 de la respiración sin afectar el estado 3, produciendo una disminución significativa del índice de control respiratorio (ICR) en presencia de N1 25 y 50  $\mu\text{M}$  y de N3 10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ . El potencial de membrana mitocondrial (PMM) fue medido fluorométricamente con rodamina 123 y malato-glutamato como sustrato. Al agregar N1 50  $\mu\text{M}$ , el PMM disminuyó 55,4 y 69,9% a los 10 y 25 min de incubación, respectivamente. La adición de N3 25  $\mu\text{M}$  redujo a 65,6% el PMM luego de 25 min de incubación, mientras que N3 50  $\mu\text{M}$  lo disminuyó en 64 y 72,8% a los 10 y 25 min de incubación, respectivamente. El agregado de N2 no modificó los estados respiratorios, el ICR o el PMM. La actividad de la enzima NADH-oxidasa, en partículas submitocondriales, fue inhibida significativamente por N1 y N3 a todas las concentraciones estudiadas (10 a 50  $\mu\text{M}$ ), mientras que N2 inhibió significativamente a altas concentraciones. Nuestros resultados sugieren que N2 podría ser una promisoriosa droga para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

**0195. (0746) CUMARINAS OXIGENADAS NATURALES Y SEMISINTÉTICAS CON ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y DIFERENCIANTE EN CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS.** R Vázquez<sup>1,2</sup>, E Riveiro<sup>1,2</sup>, D Maes<sup>3</sup>, N De Kimpe<sup>3</sup>, C Shayo<sup>2</sup>, C Davio<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA, <sup>2</sup> Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME, <sup>3</sup> Department of Organic Chemistry, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Ghent University, Ghent, Bélgica

Las leucemias resultan de la alteración del programa de desarrollo de precursores hematopoyéticos tempranos. La utilización

de inductores de diferenciación puede lograr la reprogramación de dichas células, disminuyendo su capacidad proliferativa e induciendo su maduración. Previamente hemos descrito una serie de cumarinas trioxigenadas (C1 y C2) con actividad anti-proliferativa y diferenciación sobre la línea promonocítica humana U937. En el presente trabajo evaluamos dichas actividades en derivados semisintéticos de C2 (5-(3-metil-2-en-butoxi)-6,7-metilendioxicumarina) a fin de reemplazar el doble enlace por otros restos: D2 (5-(2-hidroxi-3-metoxi-3-metilbutoxi)-6,7-metilendioxicumarina), D3 (5-(2,3-dihidroxi-3-metilbutoxi)-6,7-metilendioxicumarina) y D4 (5-(2-hidroxi-3-cloro-3-metilbutoxi)-6,7-metilendioxicumarina); sintetizados en nuestro laboratorio. Determinamos la inhibición de la proliferación (CI50) por conteo celular, la citotoxicidad (CC50) mediante exclusión de Azul Tripán y la diferenciación monocítica por expresión de CD11b, CD88 y la capacidad de reducción de NBT. Todos los compuestos inhibieron la proliferación celular presentando una CI50 de  $25,1 \pm 1,1$ ;  $191,8 \pm 1,2$  y  $91,7 \pm 5,2$   $\mu\text{M}$  para D2, D3 y D4 respectivamente; con CC50 de  $365,0 \pm 1,6$ ;  $420,4 \pm 2,4$  y  $400,0 \pm 10,8$   $\mu\text{M}$  para D2, D3 y D4 respectivamente. El tratamiento de 48 h con D2 y D3 50  $\mu\text{M}$  provocó movilización  $\text{Ca}^{2+}$  por estímulo con C5a, indicando la expresión del marcador de diferenciación CD88. La determinación de CD11b mediante citometría de flujo, indicó que D2, D3 y D4 50  $\mu\text{M}$ , al cabo de 72 horas de tratamiento, inducen un incremento significativo en su expresión ( $p < 0.05$ ). Dichos tratamientos indujeron un incremento significativo en la capacidad de reducir NBT ( $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que dichas cumarinas semisintéticas presentan actividad diferenciante sin variaciones significativas en la citotoxicidad y potencia respecto a la cumarina natural aún después de sustituido el doble enlace.

**0196. (0507) MODIFICACIÓN DE LAS PROPIEDADES DEL SURFACTANTE PULMONAR EXÓGENO ADICIONADO CON SUERO O ALBUMINA.** M Martínez Sarrasague<sup>1</sup>, G Facorro<sup>1</sup>, A Cimato<sup>1</sup>, F Capani<sup>2</sup>, E Sarraceno<sup>2</sup>, H Coirini<sup>3</sup>, E Rubín de Celis<sup>1</sup>

1 *Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*, 2 (2) *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA*, 3 *Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA e IBYME*

Las proteínas séricas comprometen severamente la función biofísica del surfactante pulmonar. En el presente trabajo se analizaron in vitro los efectos de albúmina y suero sobre la tensión superficial, viscosidad y ultraestructura del surfactante pulmonar exógeno (SPE) Prosurf<sup>®</sup>. El coeficiente de tensión superficial (CTS) y el porcentaje de reducción del área de burbuja ( $\% \Delta A_{10}$ ) se obtuvieron con un surfactómetro de burbuja pulsátil. El coeficiente de viscosidad aparente (CVA) se midió con un viscosímetro rotacional de cono-plato a 384 s<sup>-1</sup>. Mediante espectroscopia de spin electrónico (ESR) y microscopía electrónica (técnica osmio-uranilo-citrato de plomo) se analizaron cambios conformacionales. Las fracciones activa e inactiva del SPE fueron obtenidas por centrifugación a 12000 rpm. La adición de suero o albúmina en concentraciones superiores a 10 mg/ml provocaron un descenso significativo del CVA y de la viscosidad reducida del surfactante ( $p < 0.05$ ). Estos resultados correlacionan con el incremento del CTS ( $4.2 \pm 0.1$  a  $17.5 \pm 0.1$  mN/m;  $p < 0.01$ ), y el aumento del  $\% \Delta A_{10}$ . La fracción activa de SPE, obtenida por centrifugación, disminuyó en presencia de suero o albúmina, aumentando la fracción inactiva. El análisis de ESR del SPE nativo adicionado con proteínas y de sus fracciones activa e inactiva, evidenció cambios espectrales que se correlacionarían con alteraciones de la estructura. El análisis por microscopía electrónica evidenció que la presencia de suero modifica las típicas imágenes mielínicas observadas en el control, mostrando en el surfactante una agregación proteica importante con pérdida de la estructura lipídica. Los resultados obtenidos indicarían que la interacción de las proteínas con el SPE produce una desorganización en la estructura nativa del SPE que genera su inactivación, siendo este efecto en el caso de las proteínas séricas proporcional a su concentración, e independiente de la concentración para la albúmina.

**0197. (0593) EFECTOS DE METFORMINA SOBRE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE MEDULA ÓSEA DE RATA.** MS Molinuevo<sup>1</sup>, C Sedlinsky<sup>2</sup>, AM Cortizo<sup>1</sup>, AD McCarthy<sup>1</sup>, L Schurman<sup>2</sup>

1 *Universidad Nacional de La Plata*, 2 *Hospital Francés, Buenos Aires*

La Diabetes mellitus tipo 2 es una patología de alta prevalencia en la población. El tratamiento farmacológico se basa en el empleo de hipoglucemiantes orales, como por ejemplo las tiazolidendionas y las biguanidas. Las tiazolidendionas disminuyen la diferenciación osteoblástica in vitro y reducen la formación del hueso in vivo. Recientemente, nuestro grupo demostró que la metformina, una biguanida insulino-sensibilizadora ejerce efectos directos y osteogénicos en osteoblastos en cultivo. En este trabajo, evaluamos los efectos in vivo e in vitro de la metformina sobre CPMO de rata. Las células progenitoras de médula ósea (CPMO) poseen el potencial de diferenciarse a diferentes fenotipos tales como adipocitos y osteoblastos. Se usaron ratas de 100g divididas en dos grupos: Controles (ratas C, agua ad libitum) y tratadas con metformina (Met) (100 mg metformina/Kg/día) durante 2 semanas. Luego de sacrificar los animales se obtuvieron las CPMO del fémur de las ratas y se cultivaron hasta alcanzar la confluencia (2 semanas). Las células se subcultivaron en platos multipocillos en presencia de un medio osteogénico o adipogénico. Además, una alícuota de células del pasaje 2 se lisaron y se determinó actividad específica de fosfatasa alcalina (FAL). Luego de 15 días de cultivo in vitro, las CPMO provenientes de ratas tratadas con metformina expresaban aproximadamente 2 veces más FAL respecto a las células provenientes de ratas control, en tanto que el contenido de triglicéridos fue similar en ambas líneas celulares. Por otro lado, las CPMO procedentes de ratas C y Met mostraron la misma capacidad osteogénica cuando se las crecen en un medio con b-glicerofosfato y ácido ascórbico. Por otro lado, en presencia de un medio adipogénico, la producción de triglicéridos fue similar en ambos grupos experimentales. En conclusión, el tratamiento con metformina in vivo causó un incremento en la expresión de FAL de las CPMO, sin alterar su potencial osteogénico o adipogénico.

## METABOLISMO Y NUTRICIÓN I

**0198. (0618) REGULACION DEL METABOLISMO DEL HEMO EN HIPERTENSION INDUCIDA POR SOBRECARGA DE FRUCTOSA.** M Guolo, F Caballero, A Battile

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), UBA - CONICET, Hospital de Clínicas*

La hipertensión (HT) inducida por administración de fructosa (Fru) a ratas, provoca elevación de la presión sanguínea (PA) a partir del séptimo día y una hipertrofia ventricular izquierda a las 2 semanas. La hemooxigenasa (HO) es la enzima que cataliza la conversión de hemo a biliverdina liberando hierro y CO. Tanto HO como CO, están implicados en la regulación de funciones cardiovasculares, incluida la HT. En este trabajo, investigamos alteraciones en la regulación del metabolismo del hemo durante los períodos iniciales del tratamiento con Fru continuando con nuestro objetivo de estudiar este metabolismo durante el desarrollo de la HT. Ratas Wistar (120-150g) recibieron 10% de Fru en agua de bebida durante 10 semanas. Las ratas controles y las tratadas se sacrificaron cada 4 días el primer mes y luego semanalmente, se registró la PA y se extrajo el hígado para mediciones enzimáticas. Los resultados mostraron que la enzima reguladora de la síntesis del hemo, 5-aminolevulínico sintetasa (ALA-S), aumentó bruscamente su actividad alcanzando su máximo nivel en la primera semana de tratamiento (173%, VN=  $0,122 \pm 0,020$  U/mg) mientras que la PA aumentó un 18% (VN=  $112 \pm 5$  mmHg). Luego de la semana 1 el ALA-S disminuyó gradualmente hasta llegar al 120% (VN=  $0,135 \pm 0,028$  U/mg) en la

semana 3, este valor se mantuvo por 2 semanas y luego siguió disminuyendo para recuperar los niveles basales en la semana 7 ( $VN=0,128\pm 0,025U/mg$ ). Por el contrario la enzima HO, decreció significativamente su actividad en la semana 1 ( $45\%$ ,  $VN=0,535\pm 0,032U/mg$ ) recuperándola luego gradualmente para alcanzar sus niveles basales en la semana 6 de tratamiento ( $VN=0,602\pm 0,040 U/mg$ ). Estos resultados muestran que las primeras 2 semanas de tratamiento con Fru podrían asociarse al período de desarrollo de HT, descripto para ratas SHR (8 semanas), y sugieren que las alteraciones observadas se deberían a mecanismos inherentes al disparo de la HT.

**0199. (0683) DETECCIÓN DE UN POLIMORFISMO GENÉTICO COMO FACTOR ETIOPATOGENICO DE OBESIDAD INFANTIL.** LD Santillan<sup>1</sup>, MJ Coria<sup>1</sup>, A Anzulovich<sup>1</sup>, Al Pastran<sup>2</sup>, M Moyano<sup>2</sup>, M Frau<sup>3</sup>, O Flores<sup>3</sup>, F Zirulnick<sup>1</sup>, MS Gimenez<sup>1</sup>

1 Universidad Nacional San Luis, 2 Hospital San Luis, 3 Centro Privado Médico

Se ha observado recientemente que mutaciones específicas de genes que codifican cada uno de los componentes del mecanismo de regulación del peso corporal se asocian con obesidad humana. Uno de estos genes es el que codifica la síntesis del receptor para el factor de proliferación de peroxisomas gama 2 (PPAR.β2) el cual participa en la regulación del metabolismo de glucosa. Variantes genéticas del gen PPAR.β2 han sido identificado como Pro12Pro, Pro12Ala y Ala12Ala, siendo el genotipo Pro12Pro el más prevalente en poblaciones caucásicas. Nuestro objetivo fue estudiar la posible relación entre la detección del polimorfismo genético Pro12Ala y su vinculación con el desarrollo de obesidad en niños y adolescentes obesos y asociarlo con parámetros de estrés oxidativo y metabólicos. La población de estudio incluyó a 45 niños (20 controles con edad promedio de 11,2 años  $\pm$  3,27 y 25 obesos con edad promedio de 10,36 años ( $\pm$ 3,85), a los cuales se les realizó una extracción de sangre para determinar en suero: perfil lipídico, glucosa, TSH, T4 libre, parámetros de estrés oxidativo (TBARS, PON, NO). Se realizó extracción de ADN para el análisis del polimorfismo de PPAR.β2 a través de discriminación alelica por Taqman, usando Termociclador Estándar 7500 (Applied Biosystem). La resistencia a insulina fue determinada usando la fórmula: concentración de Insulina x concentración de glucosa/22,5. Nosotros encontramos que el polimorfismo genético Pro12Ala se encontraba en un 8% de los casos y se expresaba en los varones. Esta variante presentaba correlación con valores de HOMA elevados  $p < 0,02$  y con concentraciones de HDL colesterol ( $p < 0,0001$ ) más bajas que aquellos niños obesos que presentaban la variante genética Pro12Pro. No se encontró diferencias significativas en cuanto a la relación de parámetros de estrés oxidativo con obesidad infantil. La búsqueda del polimorfismo genético Pro12Ala permitirá utilizarse como valor predictivo de variaciones metabólicas en obesidad infantil.

**0200. (0213) EL PESO ANORMAL AL NACER COMO PREDISPONENTE AL DESARROLLO DEL SINDROME METABOLICO EN RATAS.** AL Burgueño, J Carabelli, ML Schuman, NL Gonzales Mansilla, SI García, AL Alvarez, S Sookoian, CJ Pirola

Laboratorio de Biología Molecular del Síndrome Metabólico - Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari"

En humanos el peso al nacer sería condicionante de la salud futura. El peso anormal, ya sea bajo o alto, está asociado con el desarrollo de componentes del síndrome metabólico, entre ellos diabetes tipo 2, hipertensión y obesidad. Mediante la restricción de la ingesta materna durante la gestación (ratas Wistar de 250g), obtuvimos animales de peso anormal al nacer (sólo se muestran resultados de bajo peso, según percentilo 15), que fueron repartidos a la semana 18 de vida en dos dietas (grasa y normal). Luego de 17 semanas, se les midió glucosa e insulina para el cálculo de insulino resistencia (HOMA), leptina, peso corporal (PC) y tejido adiposo (relativo al peso corporal: TA/PC). **Resultados:** Las hembras de bajo peso presentaron menor relación TA/PC y leptina (Tabla).

Sexo	Peso al nacer	Dieta	TA/PC x 100	Leptina (ng/ml)	HOMA	N
Hembras	Bajo Peso	Normal	2,76 $\pm$ 0,46 a	4,46 $\pm$ 1,36 a	4,65 $\pm$ 2,53	5
		Grasa	4,34 $\pm$ 0,46 b	6,97 $\pm$ 1,36	14,83 $\pm$ 3,26 b	4
	Normo Peso	Normal	1,37 $\pm$ 0,33	2,45 $\pm$ 1,11	8,54 $\pm$ 2,31	6
Machos	Bajo Peso	Grasa	2,74 $\pm$ 0,31 b	4,99 $\pm$ 1,21 b	13,63 $\pm$ 2,53	5
		Normal	1,18 $\pm$ 0,42	8,08 $\pm$ 1,21	20,83 $\pm$ 2,53	5
	Normo Peso	Grasa	3,93 $\pm$ 0,46 b,c	16,14 $\pm$ 1,57 b	33,49 $\pm$ 3,26 b	4
		Normal	1,18 $\pm$ 0,33	6,82 $\pm$ 1,11	17,70 $\pm$ 2,53	6
		Grasa	2,20 $\pm$ 0,31 b	13,29 $\pm$ 1,57	18,29 $\pm$ 2,31	6

$p < 0,05$  a: vs normo peso dieta normal, b: vs mismo peso dieta normal, c: vs normo peso dieta grasa. Hubo correlación entre la rel TA/PC y leptina ( $R=0,53$   $p=0,0001$   $n=57$ ) y entre la leptina y la ganancia de peso ( $R=0,74$   $p=1,1E-9$   $n=49$ ). El HOMA presenta correlación con la ganancia de peso ( $R=0,80$   $p=1,1E-12$   $n=50$ ) y con los niveles de leptina ( $R=0,69$   $p=1,2E-8$   $n=51$ ). En conclusión, este modelo de peso anormal al nacer presenta obesidad, elevados niveles de leptina e insulino resistencia, algunas de las características del síndrome metabólico humano, con un importante dimorfismo sexual.

**0201. (0601) EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL EN UN GRUPO DE DEPORTISTAS\*. S Vidueiros<sup>1</sup>, G Tarducci<sup>2</sup>, G Morea<sup>2</sup>, A Pallaro<sup>1</sup>**

1 Cátedra de Nutrición, FFYB, UBA, 2 PROPIA y F Humanidades, UNLP

El Índice de masa corporal es ampliamente utilizado para clasificar sobrepeso y obesidad en hombres y mujeres, sin embargo al no contemplar los compartimientos corporales, su utilidad es relativa en deportistas. **Objetivo:** Evaluar la composición corporal por el modelo de dos compartimientos en rugbiers por bioimpedancia y antropometría. **Material y Métodos:** Se estudiaron 21 rugbiers (R) de la División Intermedia y Primera del Club San Luis de la ciudad de La Plata y se los comparó con 21 estudiantes universitarios del mismo grupo etario (E). Se determinó el peso corporal (kg) y la talla (m), calculándose el Índice de Masa Corporal (IMC) ( $kg/m^2$ ). Se midieron los pliegues tricipital, bicipital, subescapular y suprailíaco, a partir de los cuales se calculó la densidad corporal según Durnin & Womersley y el porcentaje de masa grasa mediante la ecuación de Siri. La bioimpedancia eléctrica (BIA) se determinó a través del Bodystat Dualscan 2005, obteniéndose los parámetros de Agua Corporal Total e Impedancia a 200kHz para luego calcular la Masa Corporal libre de Grasa (MCLG) y Masa Grasa (MG) en % y Kg. **Resultados** (Media $\pm$ DE): El IMC de R fue significativamente mayor que E ( $27,82 \pm 2,73$  vs  $24,57 \pm 2,61$ ;  $p < 0,001$ ). No hubo diferencia significativa en la MG ni en la MCLG por BIA cuando se expresó en % (MG:  $15,49 \pm 8,17$  vs  $15,03 \pm 5,21$ ; MCLG:  $84,51 \pm 8,17$  vs  $84,97 \pm 5,21$ ), tampoco en los valores obtenidos por A (MG:  $19,21 \pm 5,04$  vs  $21,24 \pm 4,92$ ). Cuando se expresaron en Kg, se observó un aumento significativo en la MCLG en R respecto a E ( $73,27 \pm 7,27$  vs  $64,05 \pm 10,06$ ,  $p < 0,01$ ), mientras que la MG no se modificó ( $14,10 \pm 8,66$  vs  $11,42 \pm 4,68$ ). **Conclusiones:** Si bien el IMC de los rugbiers es mayor al punto de corte de sobrepeso para población general, este aumento se debe probablemente a un incremento en la masa corporal libre de grasa. \*Subsidiado por UBACYT B120

**0202. (0361) ACTIVIDADES GLUCOQUINASA Y HEXOQUINASA EN ISLOTES DE LANGERHANS DE RATAS ALIMENTADAS CRONICAMENTE CON DIETA RICA EN SACAROSA.**

MR Ferreira, YB Lombardo, AG Chicco

Laboratorio de Estudios de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición. Dpto. Cs. Biológicas. FBCB. UNL. Santa Fe

El modelo de dislipidemia e insulino resistencia de ratas alimentadas crónicamente con dieta rica en sacarosa (DRS) se caracteriza por: moderada hiperglucemia, normoinsulinemia y dislipidemia (incremento de triglicéridos -Tg- y AGNE). El patrón de secreción de insulina frente a distintos estímulos está alterado y el islote presenta un incremento de Tg con disminuida oxidación de la glucosa (complejo Piruvato Dehidrogenasa). Esto

conduce a un deterioro de la función de la célula  $\beta$  (glucolipototoxicidad) en la DRS. Se han propuesto numerosos mecanismos para la glucolipototoxicidad, uno de ellos se relaciona con las actividades de las enzimas fosforilantes de la glucosa, glucoquinasa (GK) y hexoquinasa (HK). El objetivo del presente trabajo fue analizar las actividades de estas enzimas en islotes aislados de ratas con DRS. **Métodos:** Ratas macho Wistar agrupadas en: DC (%p/p: almidón 62.5, proteína 17, grasas 8) y DRS (sacarosa en reemplazo de almidón) recibieron ambas dietas durante 8 meses. Finalizado el período experimental los animales fueron sacrificados, se extrajo el páncreas y se aislaron los islotes analizándose los parámetros cinéticos de las enzimas GK y HK. En plasma se determinaron los niveles de glucosa, insulina, Tg y AGNE. **Resultados:** Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  DRS vs DC. (n=6). a) Proteínas (ug/islote)  $1.65 \pm 0.20$  vs  $1.82 \pm 0.20$ , b)  $V_{m\acute{a}x}$  GK (pmol/ugprot/min)  $7.22 \pm 0.93^*$  vs  $11.48 \pm 1.32$ , c)  $V_{m\acute{a}x}$  HK (pmol/ugprot/min)  $37.64 \pm 2.19$  vs  $44.60 \pm 4.80$ , d) Relación HK/GK  $5.45 \pm 0.69^*$  vs  $3.39 \pm 0.17$ . Los valores aproximados de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  se determinaron por el ploteo de Lineweaver – Burk. Los niveles de glucosa, Tg y AGNE son mayores  $p < 0.05$  DRS vs DC sin modificaciones de la insulinemia. **Conclusión:** Los resultados sugieren que la menor actividad de la enzima fosforilante de la glucosa (GK) en los islotes aislados podría estar implicada en algunos de los mecanismos de glucolipototoxicidad en la DRS.

#### 0203. (0552) ACUMULACION DE GRASA HEPATICA Y VLDL RESULTANTE EN UN MODELO DE INSULINO-RESISTENCIA.

L Cacciagiú<sup>1</sup>, V Zago<sup>1</sup>, V Macri<sup>2</sup>, E Alvarez<sup>3</sup>, R Wikinski<sup>1</sup>, S Friedman<sup>2</sup>, L Schreier<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas- Depto de Bioquímica Clínica Fac Farmacia y Bioquímica-INFIBIOCU-UBA, 2 Cát. Bioquímica Gral. y Bucal Fac de Odontología-UBA, 3 Anatomía Patológica, Hospital Posadas

La insulino-resistencia (IR) induce hígado graso a la vez que aumenta la sobreproducción hepática de VLDL plasmática. No se han dilucidado aún los mecanismos metabólicos que conducen a estas dos manifestaciones opuestas, desconociéndose el tipo de VLDL resultante. **Objetivo:** Evaluar las características de VLDL en un modelo animal validado de IR en relación a la acumulación de grasa hepática. Ratas macho Wistar recibieron durante 12 sem dieta estándar. Se subdividieron en 2 grupos, control (C n=12) y DRS (n=12) al cual se le suministró sacarosa 30% en agua de bebida. No hubo diferencia en el consumo calórico (C:  $23.6 \pm 5.4$  y DRS:  $24.1 \pm 6.9$  Kcal/100g/día) ni en el aumento de peso (C:  $287 \pm 40$  y DRS:  $301 \pm 54$  g). Se extrajo sangre para determinar parámetros metabólicos y aislar VLDL. Se removió el hígado destinado al estudio histopatológico y cuantificación de grasa por gravimetría. DRS presentó aumento de insulina, media  $\pm$  DS:  $15.8 \pm 14.2$  ng/ml que en C:  $1.5 \pm 1.8$  p=0,003 manteniendo glucemias sin diferencias, aumento de triglicéridos (TG) séricos:  $108 \pm 51$  vs  $47 \pm 12$  mg/dl, p=0,001 y disminución de col-HDL:  $27 \pm 7$  vs  $38 \pm 11$  mg/dl, p=0,007. Ácidos grasos libres (AGL) fueron mayores en DRS:  $0.8 \pm 0.3$  mM que en C:  $0.6 \pm 0.2$ ; p=0,05. La composición de VLDL demostró en DRS mayor contenido de TG ( $77.4 \pm 4.9\%$  vs  $69.4 \pm 5.8\%$ ) y mayor tamaño estimado por TG/proteínas ( $18.6 \pm 7.3$  vs  $9.0 \pm 1.8$ ) p<0,001. El nivel de AGL se asoció con el contenido de TG-VLDL, r=0,40; p=0,058. El depósito de grasa hepática fue mayor en DRS ( $225 \pm 91$  vs  $135 \pm 48$  mg/g) p=0,04 y el estudio histopatológico demostró que 7/11 DRS vs 1/12 C presentaron esteatosis micro y macrovacuolar, p=0,0094. Se observó una correlación directa entre el contenido de grasa hepática con TG r=0,72, con TG-VLDL r=0.65 y con TG/proteína-VLDL r=0,66; p<0,02. En IR se observó una acumulación de grasa hepática asociado a VLDL sobrecargada en TG y de mayor tamaño. El aumento de AGL favorecería la formación de VLDL alteradas, aumentando su potencialidad aterogénica.

#### 0204. (0566) ESTEATOSIS HEPÁTICA NO ALCOHOLICA ASOCIADA AL SÍNDROME METABÓLICO: RELACION ENTRE LA PRODUCCIÓN DE VLDL Y ADIPONECTINA. V Zago<sup>1</sup>, L Cacciagiú<sup>1</sup>, G de Larrañaga<sup>2</sup>, L Gomez Rosso<sup>1</sup>, S Perés

Wingesser<sup>2</sup>, M Grafigna<sup>3</sup>, S Belli<sup>3</sup>, H Fainboim<sup>2</sup>, F Brites<sup>1</sup>, G Berg<sup>1</sup>, O Levalle<sup>3</sup>, L Schreier<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Depto de Bioquímica Clínica. Fac Farmacia y Bioquímica-INFIBIOCU-UBA, 2 Lab de Hemostasia y Trombosis y Unidad de Hepatología, Hospital Muñiz, 3 División de Endocrinología, Hospital Durand

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es otra manifestación del síndrome metabólico (SM) el cual comprende aumento de VLDL, a pesar de la acumulación de grasa hepática. VLDL podría presentar modificaciones aterogénicas asociadas a factores de remodelamiento como la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP). La disminución de adiponectina influiría en la acumulación de grasa hepática en un marco proinflamatorio. **Objetivo:** Evaluar la producción y características de VLDL y su relación con adiponectina en pacientes con SM y EHGNA en comparación con SM sin esteatosis. Se estudiaron pacientes con diagnóstico de SM y ecografía hepática, se seleccionaron 24 con grado 3 de esteatosis (E+) y 12 con ecografía normal (C). En suero en ayunas se determinó perfil lipídico, glucosa, insulina, adiponectina, ácidos grasos libres (AGL) y CETP. Se aisló VLDL  $d < 1,006$  g/ml y se midió su composición. No hubo diferencias en col-LDL, HDL, triglicéridos, insulina, glucosa ni HOMA. AGL fueron mayores en E+, media  $\pm$  DS:  $0.75 \pm 0.34$  mM vs  $0.51 \pm 0.17$ , p=0,05. Adiponectina fue menor en E+:  $6372 \pm 2557$  ng/ml que en C:  $9266 \pm 4180$ , p=0,036. VLDL en E+ mostró mayor contenido de proteínas a expensas de apoB, E+:  $4.9 \pm 2.8$  mg% C:  $1.8 \pm 0.5$ , p=0,007, evidenciando mayor número de partículas, que a su vez correlacionaron con el nivel de AGL, r=0,5 p=0,016. CETP tendió a disminuir en E+:  $206 \pm 54$  vs C:  $247 \pm 24$  %col-3H/ml.h, p=0,054 y correlacionó con el contenido de col-VLDL, r=0,43; p=0,045. La disminución de adiponectina se asoció con el aumento de AGL r=-0,39, p=0,026 y de apoB-VLDL, r=-0,44, p=0,032. Los pacientes E+, a pesar del depósito de grasa hepática, secretaron mayor número de partículas de VLDL promovidas por el aumento del flujo de AGL al hígado. CETP ejercería un remodelamiento sobre VLDL enriqueciéndola en colesterol. La disminución de adiponectina señala un cuadro proinflamatorio más acentuado en el SM con esteatosis y vinculado con la sobreproducción/secreción de VLDL.

#### 0205. (0357) LOSARTAN DISMINUYE LA EXPRESION HEPATICA DEL PLASMINOGEN ACTIVADOR INHIBITOR-1 (PAI-1) EN UN MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD GRASA HEPATICA. MS Rosselli, AL Burgueño, J Carabelli, M Schuman, CJ Pirolo, S Sookoian

Departamento de Enfermedades Complejas. Instituto de Investigaciones Médicas, A. Lanari. Universidad de Buenos Aires, CONICET, Argentina.

Recientes estudios demostraron que la enfermedad grasa hepática de etiología no alcohólica (EGH) se asocia a un incremento de riesgo cardiovascular, siendo además un componente del síndrome metabólico. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de las drogas losartan-L [bloqueante del receptor de angiotensina 1 (AT1R)], y telmisartan-T [bloqueante del ATR1 y agonista PPAR $\alpha$ ] sobre la expresión hepática del plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) en un modelo experimental de EGH. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley las que fueron sometidas a dieta rica en grasa DG (40% de grasa agregada) las cuales luego de un período de 8 semanas recibieron L (n=6) y T (n=7), 10 mg/Kg/día intraperitoneal, durante 12 semanas. Se incluyeron 7 ratas con dieta grasa y 6 ratas con dieta estándar durante los mismos periodos de estudio. En todos los casos se determinaron al finalizar el experimento pruebas de función hepática (ALT) y resistencia a la insulina (HOMA). La expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real. **Resultados:** el tratamiento con losartan disminuyó en un 42% (en comparación con el grupo DG) los niveles hepáticos del mRNA del PAI (p<0.04). Se observó una tendencia (no significativa) de los niveles del TNF $\alpha$ -mRNA a disminuir en el grupo L res-

pecto del grupo DG. Respecto de los marcadores de inflamación hepática, los niveles plasmáticos de ALT fueron significativamente más bajos en los grupos L ( $p < 0.009$ ) y T ( $p < 0.01$ ), respecto de DG. El índice HOMA fue significativamente más bajo en el grupo L ( $p < 0.03$ ) y T ( $p < 0.001$ ) respecto al grupo DG. En conclusión, nuestros resultados sugieren un papel importante de los bloqueantes del AT1R en la EGH así como además en la mejoría de la insulino resistencia y la inflamación, probablemente a través de la disminución de la síntesis hepática del PAI-1, cuyos mecanismos moleculares merecen futuros estudios.

**0206. (0461) COMPORTAMIENTO DE VLDL DE PACIENTES HEMODIALIZADOS DURANTE LA LIPÓLISIS IN VITRO.** Al González<sup>1</sup>, G Berg<sup>1</sup>, V Zago<sup>1</sup>, A Elbert<sup>2</sup>, R Wikinski<sup>1</sup>, L Schreier<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica - INFIBIOC, UBA, 2 Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial*

La hipertrigliceridemia es una característica estrechamente asociada a la insuficiencia renal crónica (IRC), relacionada con defectos en la lipólisis de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG). Se ha descrito disminución en la actividad de lipoproteína lipasa (LPL) y aumento de Apo CIII, pero no se profundizó en el papel de VLDL como sustrato de la enzima. **Objetivo:** Evaluar las características y cinética del catabolismo de VLDL de pacientes hemodializados (HD) como sustrato de la LPL. Se estudiaron 9 HD edad: mediana (rango)= 47 (37-67), no diabéticos, y 8 controles sanos pareados en edad y sexo. Se obtuvo suero en ayunas, se aisló VLDL por ultracentrifugación y se midió su composición química. Se incubaron concentraciones crecientes de TG-VLDL con LPL bovina, 60 min, 37°C, pH 8.2, en presencia de albúmina, y se midieron ácidos grasos liberados. A partir de la cinética de la reacción se calculó Km como expresión inversa de la afinidad enzimática. VLDL de HD presentó mayor proporción de colesterol (col):  $17 \pm 0.5\%$  y de proteínas:  $8 \pm 0.6\%$  que C: col:  $13 \pm 1.04\%$  y proteínas:  $6 \pm 0.44\%$ ;  $p < 0.01$ , sin diferencias en los otros componentes. Km tendió a ser mayor en HD:  $3.6 \pm 1.0$  mM que en C:  $1.5 \pm 0.3$ ,  $p = 0.08$  y correlacionó inversamente con TG-VLDL:  $r = -0.7$ ,  $p = 0.03$ . Las VLDL de pacientes HD presentaron una tendencia a menor afinidad con LPL. Las partículas con mayor contenido en TG tendrían mayor afinidad por LPL, sin embargo las VLDL de HD resultaron ricas en col, lo cual explicaría un menor grado de lipólisis, contribuyendo a la hipertrigliceridemia de la IRC.

**0207. (0373) EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES DE INFLAMACIÓN Y ATROSCLEROSIS EN PACIENTES CON ACROMEGALIA ACTIVA Y SIN DIABETES MELLITUS.** L Boero<sup>1</sup>, M Manavela<sup>2</sup>, C Insúa<sup>3</sup>, L Gómez Rosso<sup>1</sup>, MB Benítez<sup>1</sup>, N Elissondo<sup>1</sup>, L Cuniberti<sup>4</sup>, F Brites<sup>1</sup>

*1 Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CONICET., 2 Servicio de Endocrinología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", UBA., 3 Laboratorio, División Endocrinología, Hospital General de Niños "Dr Pedro Elizalde", 4 Universidad Favaloro. CONICET*

El efecto de niveles elevados de GH e IGF-I sobre la estructura y función cardíaca ha sido demostrado mediante estudios in vitro e in vivo. Sin embargo, el pronóstico desfavorable en pacientes con acromegalia activa, portadores de aumentos de GH e IGF-I, no sería solo atribuible a la presencia de cardiomiopatía específica, sino también a enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Nuestro objetivo fue evaluar biomarcadores de inflamación y aterosclerosis en pacientes con acromegalia activa no diabéticos y su asociación con GH e IGF-I. Se estudiaron 14 pacientes y 14 controles sanos pareados por sexo y edad. Se midieron las concentraciones plasmáticas de GH e IGF-1 por inmunoensayos, glucosa, insulina, HOMA y perfil de lípidos y lipoproteínas por métodos estandarizados, niveles plasmáticos de LDL oxidada (ox),

VCAM-1 y endotelina-1 por ELISA, y actividad de fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (LpPLA2) por método radiométrico desarrollado. Los pacientes acromegálicos presentaron aumentos significativos de GH ( $p < 0.05$ ), IGF-1 (0,001), glucosa (0,001), insulina (0,001), HOMA (0,001), triglicéridos (0,05), apo B (0,001), LDLox (0,05) y endotelina-1 (0,05). GH e IGF-1 se asociaron positiva y significativamente con ( $r$ ;  $p < 0.05$  y 0,73; 0,001), HOMA (0,39; 0,05 y 0,74; 0,001), triglicéridos (0,57; 0,05 y 0,64; 0,001), colesterol-VLDL (0,54; 0,05 y 0,47; 0,05), apo B (0,40; 0,05 y 0,54; 0,05), LDLox (0,59; 0,05 y 0,66; 0,05) y endotelina-1 (0,55; 0,05 y 0,51; 0,05), respectivamente. Los pacientes con acromegalia activa y sin diabetes mellitus presentaron un estado de resistencia insulínica, así como un perfil lipoproteico más aterogénico y mayores concentraciones de LDLox y endotelina-1. Las alteraciones descriptas podrían contribuir a un estado de mayor propensión al desarrollo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica, la cual se sumaría a la cardiomiopatía específica de la acromegalia.

**0208. (0597) METALOPROTEASA 2 CIRCULANTE Y FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN MUJERES CON SÍNDROME METABÓLICO.** V Miksztoiwicz<sup>1</sup>, ML Muzzio<sup>1</sup>, M Pandolfo<sup>1</sup>, F Basilio<sup>2</sup>, R Wikinski<sup>1</sup>, L Schreier<sup>1</sup>, G Berg<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas- Departamento de Bioquímica Clínica-INFIBIOC. Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA, 2 División Tocoginecología, Hospital Durand, Buenos Aires, Argentina*

Las metaloproteasas (MMP) son enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular y participan en el engrosamiento intimal y vulnerabilidad de la placa aterosclerótica. Su medida en plasma podría aportar un estimador pronóstico en el desarrollo y severidad de la lesión aterosclerótica. **Objetivos:** Evaluar la presencia y actividad de MMP-2 en plasma de mujeres con y sin síndrome metabólico (SM) y su correlación con parámetros lipídico-lipoproteicos y marcadores de inflamación. **Métodos:** Se estudiaron 35 mujeres (27-61 años) que se dividieron en dos grupos: con ( $n = 16$ ) y sin ( $n = 19$ ) SM, pareadas por edad; se excluyeron mujeres con diabetes, enfermedades endocrinas y/o tratamiento hipolipemiente u hormonal. Se evaluó obesidad abdominal por circunferencia de cintura (CC), presión arterial (PA) y en suero: colesterol (c)-total, c-HDL, c-LDL, TG, glucosa, PCR-hs e insulina. Se calcularon los índices TG/c-HDL y HOMA como marcadores de insulino-resistencia (IR). Por ultracentrifugación se separó LDL total ( $d = 1020-1063$ g/ml) y densa (LDLd) ( $d = 1048-1063$ g/ml) determinando % LDLd. En plasma se midió actividad de MMP-2 por zimografía, se cuantificaron las áreas gelatinolíticas como áreas relativas (AR). Las mujeres con SM presentaron mayor actividad de MMP-2 que las sin SM (AR: mediana (rango) 1,15 (0,4-3,1) vs 0,65 (0,15-1,92)  $p < 0.01$ ). La actividad de MMP-2 correlacionó con CC ( $r$ ;  $p$ ) (0,40; 0,02), TG (0,67; 0,001); c-LDL (0,47; 0,005); apoB (0,47; 0,006), LDLd (0,68; 0,001), PCR-hs (0,42; 0,01), TG/c-HDL (0,68; 0,001) y HOMA (0,53; 0,02) e inversamente con c-HDL (-0,51; 0,02). Las mujeres con SM presentaron actividad aumentada de MMP-2 en circulación que estaría asociada al mayor riesgo cardiovascular. La correlación de MMP-2 con cintura, parámetros lipoproteicos, marcadores secundarios de IR y de inflamación evidenciaría la participación de un biomarcador de vulnerabilidad de placa aterosclerótica asociado a otros factores de riesgo cardiovascular.

**0209. (0241) AUMENTO DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LDL OXIDADA COMO MARCADOR DE ATROSCLEROSIS EN HIPERTRIGLICERIDEMIA PRIMARIA.** L Gómez Rosso<sup>1</sup>, MB Benítez<sup>1</sup>, S Lynch<sup>2</sup>, R Wikinski<sup>1</sup>, L Cuniberti<sup>2</sup>, F Brites<sup>1</sup>

*1 Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CONICET., 2 Universidad Favaloro. CONICET*

Las evidencias surgidas del estudio PROCAM y de un importante metaanálisis con miles de pacientes sugieren que la

hipertrigliceridemia (HTG) sería un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) independiente. No obstante, muchos de los mecanismos aterogénicos asociados a la HTG, como ser la generación de LDL oxidada (ox), aún no son bien conocidos. Nuestros objetivos fueron evaluar los niveles plasmáticos de LDLox en pacientes con HTG primaria y sin antecedentes de ECV vs. controles sanos, y analizar su relación con parámetros lipídicos condicionantes de su formación. Se estudiaron 51 hombres HTG y 27 controles. Se midió la concentración de LDLox por ELISA, el perfil lipoproteico mediante métodos estandarizados, la actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) por método radiométrico y las actividades de las enzimas antioxidantes paraoxonasa (PON) y acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH) por métodos espectrofotométrico y radiométrico, respectivamente. Los pacientes HTG presentaron niveles plasmáticos de LDLox elevados (Media±DE) (163,4±32,0 vs. 137,7±35,2 U/l;  $p < 0,005$ ). La HTG fue a expensas de VLDL y se caracterizó por aumento de colesterol total, apo B, ácidos grasos libres y actividad de CETP, además de disminución de C-HDL, no observándose diferencias en las actividades de PON y PAF-AH. La LDLox se asoció positivamente con triglicéridos ( $r$ ;  $p < 0,36$ ;  $0,005$ ), ácidos grasos libres ( $0,35$ ;  $0,05$ ), CETP ( $0,44$ ;  $0,001$ ), PON ( $0,28$ ;  $0,005$ ) y PAF-AH ( $0,27$ ;  $0,05$ ). El aumento de los niveles plasmáticos de LDLox en pacientes con HTG primaria y sin ECV estaría reflejando la ocurrencia de procesos oxidativos en la pared arterial y su retorno a la circulación favorecido por la posible injuria del endotelio. Mas aún, la LDLox se asoció con parámetros potencialmente responsables del aumento de la oxidabilidad de las LDL, mientras que las correlaciones con PON y PAF-AH podrían constituir una defensa antioxidante adaptativa.

**0210. (0353) EFECTO DE LOS N-3 PUFAS DE ORIGEN MARINO SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS E HIDRATOS DE CARBONO.** GJ Hein, AG Chicco, YB Lombardo

*Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición. Dpto. Cs. Biológicas. FBCB. UNL. Sta. Fe. Argentina.*

Cuando se administra a ratas una dieta rica en sacarosa (DRS) en forma crónica (8 meses), éstas exhiben dislipemia y resistencia insulínica periférica global. Sustituyendo la fuente grasa con n-3 PUFAs de origen marino, es posible mejorar el desarrollo de estas alteraciones. El Objetivo de este trabajo fue estudiar a nivel hepático algunas enzimas involucradas en: i) lipogénesis, oxidación de ácidos grasos y metabolismo de hidratos de carbono y ii) analizar el efecto de los n-3 PUFAs en los parámetros antes mencionados. **Métodos:** Ratas macho Wistar fueron alimentadas con DRS durante 6 meses. Luego, la mitad del lote continuó con DRS hasta el mes 8, la otra mitad recibió DRS cuyo aceite de maíz fue sustituido parcialmente por aceite de hígado de bacalao (AHB) desde el mes 6 al 8. Ratas controles recibieron dieta control (DC) durante 8 meses. En todos los lotes se analizó: a) Plasma: glucosa, insulina, Tg, AGNE, b) Hígado: contenido de Tg, glucógeno, glucosa-6-P y actividades de enzimas: EM, FAS, G-6-P-D, FAO, CPT-1, GSa, GK, HK, G-6-PPasa y PDHc. **Resultados:** DRS vs DC: Plasma: incremento de Tg, AGNE y glucosa ( $p < 0,05$ ). Hígado: incremento de: 1) contenido de Tg y actividades de las enzimas lipogénicas y 2) niveles de glucógeno y actividades de GSa y relación G-6-PPasa/GK ( $p < 0,05$ ). La adición de AHB normalizó la dislipidemia y la homeostasis de la glucosa. Las enzimas implicadas en la lipogénesis alcanzaron valores normales, mientras que las involucradas en la oxidación de ácidos grasos se incrementaron ( $p < 0,05$ ). La actividad de GSa y la relación G-6-PPasa/GK alcanzaron valores similares al control. **Conclusión:** El patrón alterado de las enzimas lipogénicas, y algunas implicadas en el metabolismo de hidratos de carbono en ratas alimentadas con DRS, tiende a normalizarse mediante la administración de AHB. El efecto hipolipemiente de los n-3 PUFAs en DRS normalizó los parámetros lipídicos a nivel hepático, posiblemente vía PPAR $\alpha$  y SREBP.

**0211. (0374) ÁCIDOS GRASOS N-3 DE ORIGEN VEGETAL. SU ROL EN LA PREVENCIÓN DE LA DISLIPIDEMIA Y RESIS-**

**TENCIA INSULÍNICA (RI) INDUCIDA POR DIETA RICA EN SACAROSA (DRS).** ME D'Alessandro, A Chicco, YB Lombardo

*Laboratorio de Estudios de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición. Dpto. Cs. Biológicas. Fac. de Bioqca. y Cs. Biológicas. UNLitoral. Santa Fe.*

El consumo de dietas ricas en ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3 n-3) se correlaciona inversamente con el riesgo de enfermedad coronaria pudiendo ejercer efectos beneficiosos en la prevención de dislipidemia y anormal homeostasis de la glucosa (involucradas en el síndrome X). **Objetivo:** Analizar el efecto de la administración de ácidos grasos n-3 de origen vegetal en la prevención de la dislipidemia y RI inducida por la ingesta de DRS. En particular, nos interesa estudiar algunos mecanismos que relacionen la dislipidemia y la RI periférica global cuando se sustituye la fuente grasa dietaria (aceite de maíz -AM- por semilla de Salvia hispánica (Salba) rica en 18:3 n-3 (19% p/p). Metodología: Ratas macho Wistar, peso inicial: 180-200g fueron alimentadas durante 21 días con las siguientes dietas: Lote 1: dieta control (p/p: almidón 65.9%, AM 11%, proteínas 15%) Lote 2: DRS (sacarosa 65.9%, AM 11%, proteínas 15%). Lote 3: DRS cuya fuente grasa (AM) se sustituyó por semilla de Salvia hispánica. Determinaciones: A) Plasma: Triglicéridos (Tg), AGNE, colesterol, glucosa, insulina; B) Hígado: Tg; C) Pruebas "in vivo": -Velocidad de secreción de VLDL-Tg (VSTG), - Capacidad de Remoción de Tg, - Clamp euglucémica-hiperinsulinémica (medida de la sensibilidad insulínica). **Resultados:** DRS vs DC ( $p < 0,05$ ) 1) incremento de: Tg hepáticos y de Tg, AGNE e insulina plasmáticos; 2) VSTG y Remoción de Tg muy alteradas; 3) Clamp euglucémica-hiperinsulinémica disminuída. En DRS+Salba todos los parámetros evaluados presentan valores similares al grupo control. Conclusiones: Estos resultados sugieren que el alto contenido de ácidos grasos n-3 de la Salba, junto al importante contenido de fibras de estas semillas podrían ejercer un efecto beneficioso en la prevención de la dislipemia e insensibilidad insulínica presente en el modelo experimental inducido por DRS.

**0212. (0140) REPROGRAMACIÓN METABÓLICA HEPÁTICA EN UN MODELO DE INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA POR ADMINISTRACIÓN DE DIETA RICA EN FRUCTOSA.** ML Massa, F Francini, ME García, JJ Gagliardino

*CENEXA. Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), La Plata, Argentina.*

**Objetivos:** Estudiar la reprogramación metabólica del hígado de ratas con insulinorresistencia (IR) inducida por administración de dieta rica en fructosa (DRF). Para ello se midió el ciclo fútil de la glucosa y la vía de las pentosas-fosfato, la glucogenogénesis hepática y el contenido diferencial de piruvato y lactato (indicadores de glucólisis). **Métodos:** Se alimentaron ratas Wistar adultas normales con dieta comercial sin (C) o con el agregado de fructosa (F) al 10% en el agua de bebida (21 días). Se midieron glucemias (G) (GOD-PAP), trigliceridemias (TG) (Kit comercial) e insulinemias (I) (RIA). El hígado se procesó para determinar glucógeno, lactato y piruvato y actividad de glucoquinasa (GQ), Glucosa-6-Pasa (G6Pasa) y Glucosa-6-P deshidrogenada (G6PDH) por fotometría. **Resultados:** (F vs. C): G  $148 \pm 4$  vs.  $129 \pm 5$  mg%,  $p < 0,05$ ; TG  $114 \pm 7$  vs.  $68 \pm 7$  mg/dl,  $p < 0,001$ ; I  $4.4 \pm 0.6$  vs.  $2.7 \pm 0.5$  ng/ml,  $p < 0,02$ ; glucógeno:  $17.7 \pm 3.32$  vs.  $6.53 \pm 0.72$  ug/mg tejido,  $p < 0,005$ ; lactato:  $2.7 \pm 0.3$  vs.  $1.3 \pm 0.3$  umol/g tejido,  $p < 0,02$ , sin cambios significativos en el contenido de piruvato. Actividad de enzimas: GQ:  $7.5 \pm 0.6 \times 10^{-3}$  vs.  $3.7 \pm 0.3 \times 10^{-3}$  U/mg proteína,  $p < 0,005$ ; G6Pasa:  $25.9 \pm 5.4$  vs.  $4.8 \pm 3.2\%$  de latencia,  $p < 0,02$ ; G6PDH:  $0.15 \pm 0.02$  vs.  $0.06 \pm 0.01$  U/mg proteína,  $p < 0,002$ . **Conclusiones:** la administración de DRF induce un aumento en la glucogenogénesis, en el ciclo de las pentosas y en la glucólisis. El aumento simultáneo de vías metabólicas opuestas y consecuente aumento del ciclo fútil de la glucosa, sería un mecanismo compensatorio para disminuir el aporte de sustrato metabólico a las mitocondrias y el riesgo consecuente del estrés glucooxidativo debido a la sobrecarga de sustratos.

**0213. (0441) EFECTO DEL EXTRACTO DE STEVIA REBAU-DIANA SOBRE EL DULZOR PERCIBIDO DE DOS EDULCORANTES NUTRITIVOS.** MC Drolas, LA Sabeckis, AM Calviño

*Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA e IQUIMEFA-CONICET Junín 956, (1113), Buenos Aires*

Un edulcorante natural no calórico extraído de *Stevia rebaudiana* Bertoni (SVS), utilizado originariamente por los aborígenes guaraníes, tiene variadas propiedades que estimulan su empleo. Recientemente se señaló la habilidad de SVS como posible droga para el tratamiento de la diabetes tipo 2, ya que reduce la liberación de glucagón estimulada por palmitato, incrementando la expresión de genes que controlan el metabolismo de los ácidos grasos y mejora el funcionamiento de la célula  $\beta$  pancreática por regulación de la acetilCoA carboxilasa. También importa optimizar el aspecto sensorial de bebidas suplementadas para grupos poblacionales. El objetivo del presente trabajo consistió en averiguar si SVS modifica las funciones dosis-respuesta de dos edulcorantes nutritivos, sacarosa (S) y xilitol (X). En una primera etapa mediante ensayos de discriminación (S) y cuantificación del dulzor (S, X) se entrenaron los miembros del panel (n=30) que luego evaluó las mezclas de edulcorantes (S-SVS y X-SVS). En la segunda etapa, los evaluadores cuantificaron, por estimación de la magnitud y en dos sesiones experimentales, el dulzor percibido de cuatro niveles de S y X (5, 10, 20, 40% P/V) presentados solos y en solución al 0,05% P/V de SVS (61,11% de esteviósido y 29,03% de rebaudiósido) que cumple la especificación de Código Alimentario Argentino. En ambas mezclas, S-SVS y X-SVS, se observó que la adición de SVS modificó la función dosis-respuesta del edulcorante. Para los dos edulcorantes resultó significativa la interacción nivel de edulcorante\*agregado de SVS ( $p < 0,0001$ ). SVS incrementa significativamente el dulzor del 5 y 10% P/V de X ( $p < 0,05$ ) y el dulzor del 5, 10 y 20% P/V de S ( $p < 0,05$ ). En conclusión, al cuantificar el dulzor con un panel de evaluadores entrenados, se comprobó que SVS incrementa el dulzor del edulcorante nutritivo (S, X) confirmando su utilidad para lograr un ahorro calórico en bebidas.

**0214. (0772) ESTIMULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TNF $\alpha$  Y GST-P1 EN HÍGADO DE RATONES SOMETIDOS A CICLOS DE PRIVACIÓN NUTRICIONAL DE AMINOÁCIDOS – ALIMENTACIÓN NORMAL.** VJ Caballero, EH Ocampo, VP Ronchi, RD Conde, AN Chisari

*Instituto de Investigaciones Biológicas. FCEyN-UNMDP. CC1245. (7600) Mar del Plata. Argentina*

La privación dietaria total de aminoácidos o de algún aminoácido esencial puede causar carcinogénesis hepática. Nuestro objetivo fue analizar algunos marcadores relacionados con el desarrollo temprano de preneoplasias frente a un proceso de privación dietaria crónica de proteínas y aminoácidos en hígado de ratón. Se evaluaron los siguientes parámetros: peso corporal; contenido hepático del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y Glutathion S-Transferasa P1 (GSTP1); también se analizaron las características de los cortes histológicos hepáticos. Ratones adultos hembra Balb/C fueron sometidos a tres ciclos de privación proteica seguida de alimentación normal (SP  $\rightarrow$  N) o tres ciclos de alimentación SP conteniendo Metionina o Lisina seguida por dieta normal (SP+Met  $\rightarrow$  N o SP+Lys  $\rightarrow$  N). La expresión de TNF $\alpha$  y GSTP1 se analizó por RT-PCR semicuantitativa, los niveles de ARNm fueron relativizados frente a ARNm de actina y la histología hepática se analizó mediante cortes teñidos con H/E y PAS. Comparado con el grupo control alimentado con dieta normal, el peso corporal disminuyó: SP  $\rightarrow$  N, 20%; SP+Met  $\rightarrow$  N, 15%; SP+Lys  $\rightarrow$  N, 10%, \* ( $p < 0,05$ ). TNF $\alpha$ /actina resultó: N,  $3,1 \pm 0,6$ ; SP  $\rightarrow$  N,  $7,3 \pm 1,1$ \*; SP+Met  $\rightarrow$  N,  $3,6 \pm 0,6$ ; SP+Lys  $\rightarrow$  N,  $4,9 \pm 0,5$ . \* ( $p < 0,01$ ). GSTP1/actina resultó: N,  $2,42 \pm 0,18$ ; SP  $\rightarrow$  N,  $4,07 \pm 0,17$ \*; SP+Met  $\rightarrow$  N,  $0,96 \pm 0,15$ \*; SP+Lys  $\rightarrow$  N,  $1,66 \pm 0,26$ \*. \* ( $p < 0,01$ ). El análisis del parénquima hepático reveló cambios en la distribución de glucógeno y acúmulos de células eosinófilas en todos los tratamientos, siendo más evidentes en SP  $\rightarrow$  N y SP+Met  $\rightarrow$  N. En todos los cortes se encontró un alto porcentaje de células en división.

Finalmente concluimos que la privación proteica produce un aumento transcripcional de GSTP1 y TNF $\alpha$ ; y el suplemento con Met o Lys en la dieta estarían ejerciendo un efecto hepatoprotector. (Financiado por CONICET, UNLP y UNMDP).

## ENDOCRINOLOGÍA II

**0215. (0042) EFECTOS DE LA OVARIECTOMIA Y ESTROGENIZACIÓN CRÓNICA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA GUANILIL CICLASA SOLUBLE EN ADENOHIPÓFISIS. PANEL DE LA PROLACTINA EN LA VÍA DEL ÓXIDO NITRICO.** JP Cabilla, MC Díaz, BH Duvilanski

*Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET*

Evidencias sostienen el rol inhibitorio del 17 $\alpha$ -estradiol (E2) sobre la vía del NO en adenohipófisis. Previamente demostramos que el tratamiento agudo con E2, afecta diferencialmente la expresión de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de la guanilil ciclasa soluble (sGC) en ratas prepúberes y adultas e inhibe su actividad. **Objetivo:** evaluar el efecto de la ovariectomía (OVX) y la estrogenización crónica (OVX-E2) sobre la expresión de la sGC en adenohipófisis de ratas hembras adultas de la cepa Wistar. Se cuantificó la expresión de las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  de sGC por Western blot y la presencia de la isoforma inhibitoria  $\alpha 2i$  por RT-PCR. La ovariectomía de 14 días aumentó los niveles de proteína de ambas subunidades de la sGC (unidades relativas, % del control (C),  $\alpha 1:120,7$ \*;  $\beta 1:126,0$ \*,  $p < 0,05$  vs C). La estrogenización en animales OVX por diferentes períodos (cápsula conteniendo E2) aumentó la expresión de proteína  $\alpha 1$  (% del C respectivo, OVX 4d+E2:  $74,0$ \*; OVX 7d+E2: $44,6$ \*; OVX 14d+E2: $28,3$ \*\*\*) y en forma similar la de  $\beta 1$ , mientras que la expresión de  $\alpha 2i$  disminuyó (% del C; OVX 4d+E2: $76,8$ , OVX 7d+E2: $47,9$ \*; OVX 14d+E2: $53,8$ \*; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs control respectivo). Además, se estudió el efecto de la prolactina (PRL) sobre la vía del NO en cultivos celulares adenohipofisarios de ratas OVX. La incubación con PRL (500 ng/mL) disminuyó la actividad de la NOS, medida como producción de nitritos ([NO $_2$ ]  $\mu$ M; 0h: $20,4$ ; 24h: $19,3$ ; 48h: $13,4$ \*; 72h: $12,1$ \*,  $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren que la mayor actividad de la sGC registrada en ratas OVX se debe a una expresión aumentada de la enzima. La estrogenización crónica también incrementa la expresión de las subunidades activas de la sGC, pese a que la actividad enzimática disminuye, lo cual indicaría una regulación río abajo de la expresión de la proteína. Por último, la PRL ejercería un retrocontrol negativo inhibiendo la actividad de la NOS.

**0216. (0138) ANANDAMIDA INHIBE LA SECRECIÓN NEUROHIPOFISARIA DE OCITOCINA Y VASOPRESINA.** JP Prestifilippo<sup>1</sup>, J Fernandez-Solari<sup>1</sup>, CE Mohn<sup>1</sup>, ML Wong<sup>2</sup>, V Rettori<sup>1</sup>, A De Laurentiis<sup>1</sup>

*1 Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFYBO-CONICET-UBA, Facultad de Medicina, UBA, 2 University of Miami, Department of Psychiatry, Translational Research Laboratory*

Recientemente ha sido demostrada la liberación de endocannabinoides desde neuronas magnocelulares hipotalámicas secretoras de ocitocina (OT) y vasopresina (VP), así como la presencia de receptores de cannabinoides en dichas neuronas (Di et al. *Endocrinology* 146, 2005; Di et al. *J Physiol* 569, 2005). En el presente trabajo estudiamos el papel del endocannabinoide anandamida (AEA) en la secreción de OT y VP desde terminales axónicas del lóbulo neural hipofisario. Determinamos el efecto in vitro de AEA ( $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ M) sobre la liberación de OT y VP (RIA) desde neurohipófisis (NH) de ratas Sprague Dawley macho adultas. La AEA disminuyó significativamente la secreción tanto de OT como de VP desde NH en todas las dosis estudiadas, siendo la de  $10^{-9}$ M la más efectiva. OT C: $13,43 \pm 1,62$ ; AEA $10^{-9}$ M:  $7,71 \pm 0,68$  n=10-12,  $p < 0,01$ . VP C: $2,74 \pm 0,26$ ; AEA $10^{-9}$ M:  $1,35 \pm 0,17$  n=10-12,  $p < 0,01$ . Por otra parte ha sido demostrado que el óxido nítrico

(NO) reduce la secreción de OT y VP y la NH es una de las zonas más ricas en la enzima que lo sintetiza (NOS), por lo cual estudiamos la posible intervención del NO en el efecto inhibitorio de AEA sobre la liberación de estas hormonas. Determinamos que la AEA ( $10^{-9}$ M) estimula la actividad de la NOS neurohipofisaria por el método de  $^{14}$ C-Arginina (C:  $0.8392 \pm 0.101$ ; AEA( $10^{-9}$ M):  $1.527 \pm 0.159$  pmol/NH/min; n=6; p<0.01, test t de Student). Tanto la hemoglobina (Hb, 40ug/ml) como el L-NAME (1mM), revertieron la acción inhibitoria de AEA sobre la secreción de OT y VP desde NH incubadas in vitro. Estos resultados indican que la AEA inhibe la secreción neurohipofisaria de OT y VP por un mecanismo que involucra la síntesis de NO, demostrando por primera vez la acción directa del endocannabinoide anandamida sobre la liberación de vasopresina y ocitocina. (Subsidios PICT 14264, PIP 6149).

**0217. (0025) EL TRATAMIENTO NEONATAL CON BISFENOL A ALTERA PATRONES REPRODUCTIVOS EN LA RATA HEMBRA PRE Y POSTPUBERAL.** MO Fernandez<sup>1, 2</sup>, L Zubeldia Brenner<sup>1</sup>, VAR Lux Lantos<sup>1</sup>, C Libertun<sup>1, 2</sup>

1 *IBYME-CONICET*, 2 *Facultad de Medicina, UBA*

Previamente demostramos que hembras Sprague-Dawley (SD) presentan, luego de tratadas neonatalmente con Bisfenol A (BPA), menor liberación de LH "in vivo" e "in vitro" y mayor liberación de PRL "in vitro" a los 13 días de edad. Aquí continuamos analizando los efectos del tratamiento neonatal sobre la apertura vaginal (AV), la ciclicidad y respuesta a GnRH en la adultez. **Metodología:** En hembras SD inyectadas, sc, del día 1 al 10 postnatales con BPA [500 µg/50 µl de aceite (B500), o 50 µg/50µl de aceite, (B50)], o con diluyente como control (C) se determinó: 1) edad y peso corporal a la AV; 2) ciclo estral por extendidos vaginales; 3) respuesta hipofisaria a GnRH a los 4-5 meses de edad. Bajo anestesia con ketamina/xilazina (60 mg /10 mg/ kg), se extrajo una muestra de sangre yugular, inyectándose por la misma vena 100 ng GnRH; nuevas muestras se tomaron a los 15 y 50 minutos. LH sérica se midió por RIA. **Resultados:** Los animales tratados con BPA abrieron vagina a edades más tempranas [edad a la AV (días): B500=30.15±0.58, B50=32.46±0.71, C=34.93±0.71; BPA distinto de C, B500 distinto de B50, p<0.05], no observándose diferencias en los pesos corporales. Se observaron ciclos estrales (CE) irregulares con predominio de estro en B500 [porcentaje de estro: B500=99.22±0.78, B50=25.78±2.67, C=25.52±1.25, B500 distinto de C, p<0.05]. La respuesta de LH a GnRH se observó disminuida en los B500 a los 15 minutos [Anova en dos sentidos (muestras apareadas) Interacción: p<0.05; comparaciones planeadas: B500 (15min)=16.18±1.84 ng/ml, B50 (15 min)=21.86±4.17 ng/ml, C (15min)=25.59±3.77 ng/ml; B500 distinto de C, p<0.05] no observándose diferencias en los valores basales ni a los 50 minutos. **Conclusiones:** El tratamiento neonatal con BPA altera patrones reproductivos: AV temprana, CE irregulares y menor respuesta a GnRH en la adultez. Esto aporta nuevas evidencias del efecto disruptor del BPA sobre el control neuroendocrino de la función adenohipofisaria (ANPCYT;CONICET;UBA).

**0218. (0149) LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A BISFENOL A (BPA) MODIFICA LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO TESTICULAR.** R Reynoso<sup>1</sup>, N Cardoso<sup>1</sup>, B Szwarcfarb<sup>2</sup>, S Carbone<sup>2</sup>, O Ponzio<sup>1</sup>, M Alonso<sup>3</sup>, M Pandolfi<sup>4</sup>, J Moguilevsky<sup>5</sup>, P Scacchi<sup>6</sup>

1 *Laboratorio de Endocrinología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA*, 2 *Laboratorio de Endocrinología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. CONICET*, 3 *Laboratorio Hospital Británico. Bs.As.*, 4 *Lab de Embriología Animal DBBE, FCEyN.UBA.*, 5 *Fundación Favaloro*, 6 *Laboratorio de Endocrinología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA. CONICET*

El BPA es un disruptor endocrino ampliamente utilizado en la fabricación de envases de productos de consumo habitual, en selladores dentales, resinas epoxi. Este se une a ambas isoformas del receptor estrogénico y al receptor androgénico, ejerciendo así

efectos adversos sobre el eje reproductor. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la administración crónica de BPA sobre el eje hipotálamo-hipófiso-testicular de ratas adultas. Se administró BPA en el agua de bebida (25 mg/l) a la rata madre desde el inicio de la preñez y durante la lactancia y a las crías hasta el momento del sacrificio, (70 días de vida), administrándose etanol al 0.1% al grupo control, (n= 15 por grupo). Se determinó LH, FSH, (RIA, ng/ml) y testosterona (EQLIA, nmol/ml). Para evaluar la posible acción a nivel hipotalámico se determinó actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), (Bredt y Snyder mod., pmoles NO/ 10 min/HMB) y contenido de Gn-RH en fragmentos de hipotálamo medio basal, (RIA, pmoles/mg HMB). Se registró el peso corporal (gs.), el testicular (mg) y se observó la presencia del testículo en el escroto. **Resultados:** Los niveles de LH no se modificaron significativamente con el tratamiento (Control:  $38 \pm 6$  vs BPA:  $31 \pm 3$ ), mientras que los de FSH y testosterona descendieron significativamente, (Control:  $340 \pm 26$  vs BPA:  $230 \pm 6$ , p<0.001), (Control:  $20 \pm 4.0$  vs BPA:  $0.6 \pm 0.07$ , p<0.001). La actividad de NOS y el contenido de Gn-RH no se modificaron con el tratamiento (Control:  $2.3 \pm 0.1$  vs BPA:  $2.2 \pm 0.05$ , Control:  $1.2 \pm 0.1$  vs BPA:  $1.3 \pm 0.1$ ). Los pesos corporales y de testículos no sufrieron cambios. En un 6% de los animales se observó criptorquidia unilateral. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que la exposición crónica a BPA afecta la normal secreción de gonadotropinas y de testosterona en animales adultos. La falta de efecto sobre los parámetros neuroendocrinos estudiados sugiere que el efecto de BPA se ejercería a nivel hipofisario.

**0219. (0051) MEDIADORES EN EL AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DE HORMONA ANTI-MÜLLERIANA (AMH) EN RESPUESTA A LA FSH.** C Lasala<sup>1</sup>, P Bedecarrás<sup>1</sup>, E Pellizzari<sup>1</sup>, H Scheingart<sup>1</sup>, N di Clemente<sup>2</sup>, R Rey<sup>1, 3</sup>

1 *Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires*, 2 *Endocrinologie et Génétique de la Reproduction et du Développement, INSERM U.782, Clamart, Francia*, 3 *Histología, Biología Celular, Embriología y Genética, Fac. Medicina, UBA, Buenos Aires*

En células de Sertoli, la FSH aumenta la expresión de la AMH exclusivamente a través de la vía que involucra al AMP cíclico (AMPC). Hasta el momento, sólo se ha demostrado la participación de los factores AP2 y NFκB como transactivadores de AMH. Sin embargo, mutaciones de los elementos de respuesta a AP2 y NFκB del promotor de AMH no anulan completamente la respuesta al AMPC. Para identificar otros posibles mediadores en la transactivación de AMH en respuesta a AMPC, usamos ensayos luciferasa: células de Sertoli inmortalizadas de la línea SMAT1 fueron transfectadas con vectores de expresión luciferasa de lucifernaga bajo control del promotor de AMH normal (pGL2B-5'hAMH-luc) o con mutaciones en los sitios AP1, SF1, GATA4 o SOX9, e incubadas en medio basal o con 1mM dbAMPc. Como control de transfección se utilizó un vector de expresión de luciferasa de *renilla*. Los resultados se expresan como media ± DE de unidades de luciferasa relativas (RLU), tomando como 1 RLU a la actividad basal del promotor normal (ver Tabla).

	Basal	dbAMPc 1 mM	P
pGL2B-5'hAMH-luc	1,00	1,52 ± 0,70	0,04 (#)
pGL2B-5'hAMH-AP1m-luc	2,18 ± 1,17	3,10 ± 1,80	0,03 (##)
pGL2B-5'hAMH-GATAm-luc	1,10 ± 0,18	1,57 ± 0,25	0,03 (##)
pGL2B-5'hAMH-SF1m-luc	0,24 ± 0,21	0,15 ± 0,09	0,85 (##)
pGL2B-5'hAMH-SOX9m-luc	0,06 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,98 (##)

(#) Test de t para muestra única, dbAMPc 1mM, comparación contra un valor teórico de 1.

(##) Test de t para muestras apareadas, Basal vs. dbAMPc 1 mM.

Concluimos que las mutaciones en los sitios AP1 y GATA 4 impiden la respuesta al AMPC, en tanto que las mutaciones de los sitios SF1 y SOX9 disminuyen la actividad basal e impiden la respuesta al AMPC, por lo cual podrían estar involucrados junto con AP2 y NFκB en la transactivación de AMH en respuesta a la FSH.

**0220. (0467) ACCION PROAPOPTOTICA RAPIDA DE LOS ESTROGENOS EN LACTOTROPOS.** S Zárate, G Jaita, V Zaldivar, D Radl, G Eijo, D Pisera, A Seilicovich

*Instituto de Investigaciones en Reproducción (IdIR), Facultad de Medicina, UBA*

Previamente hemos demostrado que tanto el estradiol (E2) como el estren, un ligando sintético del receptor de estrógenos sin actividad transcripcional clásica, inducen una rápida respuesta apoptótica en células adenohipofisarias y somatotropos. Además, utilizando un conjugado de E2 que no difunde hacia el interior de la célula, demostramos que la activación de receptores asociados a la membrana plasmática está involucrada en el efecto proapoptótico del E2. Considerando que los lactotropos constituyen la población con la mayor tasa de recambio en la pituitaria, evaluamos la participación de mecanismos no clásicos del E2 en la inducción de apoptosis de lactotropos. Determinamos el porcentaje de lactotropos apoptóticos (por TUNEL e inmunofluorescencia) en cultivos de células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas incubadas con E2 (10-9M) o estren (10-7M) durante 2 h. Ambos compuestos aumentaron el porcentaje de lactotropos apoptóticos (C: 0.7%, E2: 2.6%  $p < 0.01$ , Chi 2)(C: 0.9%, estren: 5.5%  $p < 0.001$ , Chi 2). Además, estudiamos la participación de las caspasas en la apoptosis de células adenohipofisarias inducida por activación de receptores asociados a la membrana plasmática. Determinamos el efecto de E2-BSA, un compuesto impermeable a la membrana, en presencia de un inhibidor de caspasas, Z-VAD-FMK (Z) evaluando el porcentaje de apoptosis (por Anexina-V y citometría de flujo) luego de 2 h de incubación. El Z bloqueó la apoptosis inducida por E2-BSA sobre dichas células (C: 14.2±0.7%, E2-BSA: 25.5±1.5%, Z: 16.7±1.2%, E2-BSA+Z: 19.0±1.3%;  $p < 0.001$  vs respectivo control sin E2-BSA,  $p < 0.01$  vs respectivo control sin Z, ANOVA. Estos resultados indican que tanto el E2 como el estren en tiempos cortos de incubación inducen apoptosis de lactotropos y sugieren que este efecto podría deberse a la activación de mecanismos no clásicos. La apoptosis inducida por el E2 al interactuar con receptores asociados a la membrana plasmática sería dependiente de caspasas.

**0221. (0669) MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PRL Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS POR ESTRADIOL-BSA EN INTERACCIÓN CON TRH Y FGF2.** LV Sosa<sup>1</sup>, S Gutiérrez<sup>1</sup>, M Soaje<sup>2</sup>, JP Petiti<sup>1</sup>, CM Palmeri<sup>1</sup>, AL De Paul<sup>1</sup>, Al Torres<sup>1</sup>

*1 Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC, Córdoba, Argentina., 2 Laboratorio de reproducción y lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza, Argentina.*

Los efectos del estradiol (E2) son mediados por receptores estrógenicos (RE) intracelulares y de membrana. La participación de estos últimos en las acciones del E2 en interacción con neuropéptidos y factores de crecimiento sobre las lactotropas no ha sido completamente esclarecida. Nos propusimos estudiar los efectos de la interacción del E2, TRH y FGF2 sobre la proliferación y secreción de PRL; determinar la participación de los RE de membrana y evaluar si PKC $\epsilon$  interviene en estos procesos. Cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata hembra fueron tratados con E2 (10nM); E2-BSA (forma impermeable a la membrana, 10nM); TRH (10nM); FGF2 (0,6 nM) solos o combinados, por 30 min. Se cuantificó la PRL por RIA y la proliferación de lactotropas por doble detección ICQ de BrdU/PRL. La expresión de PKC $\epsilon$  fue determinada por WB. Análisis estadístico: ANOVA-Fisher. E2-BSA y E2 aumentaron la secreción de PRL con respecto al control, mientras que el número de lactotropas en mitosis ( $p < 0.01$  vs C) solo incrementó por acción de E2-BSA. La secreción de PRL aumentó con E2-BSA/FGF2 mientras que E2/FGF2 incrementó la secreción de PRL y la proliferación de lactotropas en relación a los efectos observados con cada uno de los factores. En co-incubación con TRH, el E2-BSA promovió la liberación de PRL y el E2 la proliferación de lactotropas, con res-

pecto a cada factor. La adición de FGF2 al tratamiento con E2-BSA/TRH incrementó 2,5 veces la proliferación de lactotropas y revirtió parcialmente la secreción de PRL, efecto no observado en los modelos con E2 libre. La interacción de E2-BSA con TRH y FGF2 produjo una marcada expresión de PKC $\epsilon$ . Los datos obtenidos sugieren que la unión de E2 a receptores membrana en interacción con TRH y/o FGF2 regularía la secreción de PRL. En células lactotopas el máximo efecto mitogénico observado luego del tratamiento con E2-BSA/TRH/FGF2 indicaría una interacción entre receptores de membrana activando cascadas de señales con la participación de PKC $\epsilon$ .

**0222. (0599) PERFIL HORMONAL Y LIPOPROTEICO EN CANCER DE PROSTATA.** V Mesch<sup>1</sup>, H Grosman<sup>1</sup>, B Fabre<sup>1</sup>, L Boero<sup>1</sup>, P Maidana<sup>1</sup>, M Lopez<sup>2</sup>, O Mazza<sup>2</sup>, G Berg<sup>1</sup>

*1 Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOQ), Departamento de Bioquímica Clínica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA, 2 División Urología, Hospital de Clínicas-UBA, Buenos Aires, Argentina*

El cáncer de próstata (CaP) es la tercera causa de muerte oncológica en el varón adulto. Este tumor hormono-dependiente se relacionaría a obesidad e insulino-resistencia (IR) las que condicionarían el perfil de hormonas sexuales, cuyo papel en la prevalencia de CaP es controvertido. **Objetivo:** establecer posibles asociaciones entre hormonas sexuales y perfil lipoproteico en patologías prostáticas. Estudiamos 47 pacientes con CaP, 51 con hiperplasia prostática benigna (HPB) y 51 controles (C) con examen digital rectal normal y Antígeno Prostático Específico (PSA)  $< 2.5$  ng/ml. Se midió: Testosterona total (Tot), To libre (ToL, pg/ml), To biodisponible (Tob, ng/ml), SHBG (nmol/L); colesterol (c)total, c-HDL y triglicéridos (TG), expresados en mg/dl, se calcularon los índices TG/c-HDL, como marcador secundario de IR, andrógenos libres (FAI) e Índice de Masa Corporal (IMC). Los resultados se expresan como media±DS. El grupo CaP vs C presentó: mayor FAI (42,2±12,7 vs 31,2±11,8), ToL (89,8±30,9 vs 68,8±28,5) y Tob (2,06±0,71 vs 1,58±0,66),  $p < 0.002$ ; y menor SHBG (41,6±13,5 vs 47,9±15,8,  $p = 0,05$ ). No hubo diferencias significativas en los andrógenos entre los grupos HPB y CaP, siendo sus concentraciones significativamente menores en C en relación a HPB: FAI (31,2±11,8 vs 39,2±10,7) ToL (68,8±28,5 vs 84,6±24,3) Tob (1,58±0,66 vs 1,95±0,56),  $p < 0,001$ . El índice TG/c-HDL fue significativamente mayor en CaP vs C y vs HPB (4,3±0,45 vs 3,1±0,55 y vs 3,0±0,23,  $p < 0,01$ ). No hubo diferencias significativas en el IMC entre los 3 grupos. PSA correlacionó directamente con FAI (r; p) (0,27; 0,001), ToL (0,19; 0,02), Tob (0,19; 0,02) e inversamente con SHBG (-0,18; 0,03); SHBG correlacionó con TG/c-HDL (-0,26; 0,003). Los pacientes con CaP presentaron mayor grado de androgenicidad, con menores niveles de SHBG que resultan en aumento de las distintas fracciones de Tot y tendrían mayor grado de IR evidenciado por el descenso de SHBG y el aumento de TG/c-HDL, independientemente del IMC.

**0223. (0277) LA INHIBICIÓN DE 17-B-HSD 1 NO AFECTA EL MECANISMO DE ACCIÓN DE ESTRONA EN TEJIDO VASCULAR DE RATA.** MB Rauschemberger<sup>1,2</sup>, VL Massheimer<sup>1,2</sup>

*1 Cátedra de Análisis Clínicos II, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, 2 CONICET*

La estrona (E<sub>1</sub>) y el 17- $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) son esteroides interconvertibles, reacción catalizada por la familia de enzimas 17- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ HSD). Previamente demostramos que en tejido vascular de rata, la E<sub>1</sub> estimula la síntesis de vasoactivos e inhibe el crecimiento del endotelio vascular. Los principales componentes celulares de las arterias son las células endoteliales y las musculares lisas vasculares (CMLV). En el presente trabajo investigamos el efecto directo de la E<sub>1</sub> sobre la proliferación de CMLV y la participación de la 17- $\beta$ -HSD en el mecanismo de acción hormonal. En ensayos de proliferación celular (incorporación de <sup>3</sup>H-timidina) observamos que la presencia

del compuesto Equilín (Eq) inhibidor de 17-β-HSD tipo 1 (responsable de la conversión de E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub>) no modificó el estímulo sobre la síntesis de ADN inducido por 24 hs de tratamiento con E<sub>1</sub> 10nM (91 vs 97% s/c, E<sub>1</sub> vs E<sub>1</sub>+Eq, p<0.001). El inhibidor tampoco modificó la acción estimuladora de E<sub>1</sub> sobre la síntesis de NO (medido por el método de Griess) (0.82±0.05 vs 1.285; 0.78± 0.028 vs 1.283± 0.037 nmol NO/mg prot. control vs E<sub>1</sub> -/+ Eq, p<0.001). Usando ICI 182780, antagonista del receptor de estrógeno (RE), observamos que el mismo anuló completamente el incremento en la incorporación de timidina (78±6.0 vs 119±8.2; 60±4.3 vs 72± 6.8, cpm 103/mg prot Control vs E<sub>1</sub> -/+ ICI, p<0.01). Dado que E<sub>1</sub> estimula la actividad PKC, estudiamos su participación. 24 hs de tratamiento con TPA100nM (activador directo PKC) estimula la proliferación (116%/s/c, p<0.001). La inhibición PKC por el compuesto chelerythrine suprimió la acción proliferativa de la E<sub>1</sub> (53% vs 1% s/c, E<sub>1</sub> vs E<sub>1</sub>+Chel, p<0.01). En ensayos de migración celular se observó un mayor desplazamiento celular luego de 72 hs de tratamiento con E<sub>1</sub> vs control. Los resultados sugieren que los efectos de E<sub>1</sub> en tejido vascular no dependen de su conversión a E<sub>2</sub> y que la acción proliferativa del esteroide involucraría al RE y la vía PKC.

**0224. (0600) HORMONAS ESTEROIDEAS DISMINUYEN LA ACTIVIDAD DE 3 BETA HIDROXIESTROIDE DESHIDROGENASA EN HIPOTALAMO DE RATAS HEMBRAS CASTRADAS.** AS Vega Orozco<sup>1</sup>, VS Bazzocchini<sup>1, 2</sup>, F Nanfaro<sup>1</sup>, R Yunes<sup>1</sup>, RJ Cabrera<sup>1, 2</sup>

1 LINCE-IMBECU-CONICET-Area de Farmacología. FCM. Universidad Nacional de Cuyo, 2 Centro de Investigaciones Superiores-Universidad de Mendoza

La expresión génica de la enzima 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3-β-HSD) que permite la conversión de pregnenolona en progesterona, incrementa en hipotálamo en respuesta a la administración exógena de estradiol previo al pico preovulatorio de LH, produciéndose a su vez un incremento de los receptores para progesterona. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de variaciones en las concentraciones endógenas de hormonas esteroideas sobre la actividad enzimática de 3-β-HSD en hipotálamo de rata. Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Sprague-Dawley, divididas en nueve grupos: 1) hembras ovariectomizadas (OVX)(n=5), 2) OVX a las que se les administró estrógeno (E-s.c) (25 µg/rata 48 hs. antes de ser sacrificadas) (n=5), 3) OVX a las que se les administró progesterona (P-s.c) (1mg /rata)(n=5), 4) OVX +E+P (idem tiempo anteriores) (n=5), 5)OVX y adrenalectomizadas (ADX) (n=5), 6) ADX sacrificadas en proestro (n=5), 7) ADX sacrificadas en diestro I (n=5), 8) hembras enteras sacrificadas en proestro (n=5), 9) hembras enteras sacrificada en diestro I. Todos los animales fueron decapitados, y se les tomó la sangre troncal. Posteriormente se les extrajo el hipotálamo medio basal y se determinó la actividad de 3-β-HSD por método espectrofotométrico. Los resultados se expresaron como la media ±SEM en mU/µg de proteínas y analizadas estadísticamente por ANOVA 1 y post Hoc test. La actividad de 3-β-HSD es menor durante el proestro (0.012426± 0.0008) así como cuando se le administran E+P a ratas OVX (0.00856 ± 0.0012) comparado con aquellos grupos de ratas libres de influencias hormonales (grupo1=0.02613±0.0015), y con aquellos que se les administran E o P aisladamente (0.029±0.004; 0.026±0.002). Concluimos que el estatus esteroideal endógeno condiciona de manera diferencial a la neuroesteoidogénesis hipotalámica, indicando fuertemente la acción moduladora sistémica sobre esteroidogénesis central.

**0225. (0673) PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN HIPOCAMPO DE RATAS CON DIABETES EXPERIMENTAL POR ESTREPTOZOTOCINA (STZ).**

R Sanchez<sup>1</sup>, JM Cipelli<sup>1</sup>, EM Repetto<sup>1</sup>, F Astort<sup>1</sup>, C Martinez Calejman<sup>1</sup>, JM Di Guccio<sup>1</sup>, PD Cassaglia<sup>1</sup>, GG Piroli<sup>1</sup>, P Arias<sup>2</sup>, CB Cymeryng<sup>1</sup>

1 Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UBA. CEFYBO-CONICET, 2 Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA

El aumento del estrés oxidativo/nitrosativo se relaciona con la generación y la progresión de las complicaciones de la diabetes mellitus, incluyendo la afección del sistema nervioso central (encefalopatía diabética), que se refleja en modelos de diabetes experimental por alteraciones en las funciones de memoria y aprendizaje, con cambios patológicos en distintas áreas cerebrales como el hipocampo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el perfil temporal de parámetros bioquímicos indicadores de estrés oxidativo en hipocampo de ratas diabéticas por estrepotocina (STZ). **Metodología:** se emplearon ratas macho Wistar adultas, divididas en grupos control (C) y STZ (3 dosis ip de 40 mg/kg). Los animales fueron sacrificados por decapitación 1, 2, 4, 6 y 8 semanas después de este tratamiento, diseccionándose rápidamente el hipocampo sobre una placa enfriada. Se evaluaron actividad de NOS, parámetros de estrés nitrosativo (nitrosotioles) y oxidativo (TBARS y carbonilos), y mecanismos de citoprotección (GSH, tioles proteicos libres -PSH- y actividad de catalasa -CAT-). **Resultados:** en el grupo STZ aumentaron significativamente, en la semana 1, la actividad de NOS (C: 0,40 vs STZ: 0,10 pmol/min/mgprot, p< 0,001) y los niveles de GSH (C: 389,2 vs STZ: 590,1 nmol/mgprot, p<0,05), sin que se registraran diferencias significativas en las determinaciones ulteriores de estos parámetros. Los niveles de TBARS se mantuvieron significativamente elevados en el grupo STZ durante el período de estudio. No se observaron diferencias significativas en los niveles de nitrosotioles, carbonilos, PSH y CAT durante la evaluación. **Conclusión:** en el hipocampo de ratas con diabetes por STZ se observa un aumento transitorio en la generación de NO, y un incremento persistente de productos de estrés oxidativo (peróxidos lipídicos). La disminución registrada en la actividad de la NOS luego de la primera semana podría deberse a la inducción de mecanismos alternativos de citoprotección.

**0226. (0029) TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE INSULINA.** GA Passicot<sup>1</sup>, MC Camberos<sup>2</sup>, JC Cresto<sup>3</sup>

1 CEDIE - Fundación Diabetes - Htal. de Niños "R. Gutierrez", 2 CEDIE-CONICET - Htal. de Niños "R. Gutierrez", 3 CEDIE-GCBA - Htal. de Niños "R. Gutierrez"

**Objetivos:** La insulina regula la síntesis y actividad de varias enzimas mitocondriales importantes y controla el transporte de sustratos oxidables sugiriendo que la mitocondria es una organela insulino-dependiente. Nosotros demostramos que la enzima degradante de insulina (EDI) se encuentra en la matriz mitocondrial (MM). Nuestro objetivo fue determinar si EDI facilita la incorporación mitocondrial de insulina. **Métodos:** EDI se obtuvo de músculo de rata por sucesivos pasos cromatográficos. Mitocondrias hepáticas fueron aisladas según Parson y cols., recuperadas e incubadas a distintos tiempos a 25 °C con oxígeno 100% e insulina. De acuerdo al diseño experimental se agregaron EDI, sustratos o inhibidores. La reacción fue detenida con 1 mM de N-etilmaleimida. La MM fue aislada por digestión con digitonina y el transporte y la degradación de insulina se determinaron por cromatografía en Sephadex G50, electroforesis en SDS-PAGE, inmunoblot y autorradiografía. **Resultados:** La contaminación peroxisomal y citoplasmática en MM fue residual. EDI incrementa la incorporación a MM de insulina en forma dosis-dependiente. El dinitrofenol, vanadato y succinato+ADP lo disminuyen. En las condiciones del estudio, EDI no degrada la insulina, por lo tanto la degradación es debida a las proteasas mitocondriales (pg/seg/mg prot; control: 0.87; EDI: 0.88). Las cromatografías y autorradiografías de MM demostraron que la insulina se incorpora a MM a través del sistema de transporte mitocondrial, siendo EDI el que facilita el transporte. El estudio sugiere que la insulina es incorporada activamente a la MM. **Conclusiones:** EDI facilita la incorporación mitocondrial de insulina.

**0227. (0150) CORRELACION ENTRE LA MASA DE CELULAS PRODUCTORAS DE INGAP (ISLET NEOGENESIS ASSOCIATED PROTEIN) Y LA DE CELULAS BETA EN ANIMALES CON INSULINORRESISTENCIA FISIOLOGICA (PREÑEZ) CON O SIN DIETA HIPERHIDROCARBONADA.** VG Madrid, HH Del Zotto, MI Borelli, LE Flores, JJ Gagliardini

CENEXA. Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada.(UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata.

En animales adultos con insulinoresistencia (IR) inducida por dieta rica en sacarosa (DRS) hay un aumento simultáneo de la masa de células beta y sus precursores y de la de células productoras de INGAP. **Objetivo:** determinar la posible correlación entre masa de células INGAP y el incremento en la masa de células beta en ratas con IR fisiológica (preñez) sin y con DRS. Metodología: utilizamos ratas Wistar hembra normales alimentadas ad libitum durante 17 días de la gestación con dieta comercial estándar (C) o con DRS (sacarosa al 10% en agua de bebida). Al sacrificio se determinó glucemia (G), insulinemia (I) y peso del páncreas (PP) de las hembras e inmunocitoquímica y morfometría del páncreas. **Resultados:** No observamos diferencias significativas (DRS vs. C) en: G (154±3.21 vs. 130.7±16.25 mg/dl), I (1.15±0.46 vs. 2.2±0.31 ng/ml), PP (0.63±0.02 vs. 0.60±0.04 g), masa de células beta (1.18±0.42 vs. 1.12±0.24 mg), tamaño y número de células beta (110.8±5.7 vs. 114.9±15.3 µm y 43.6±13.2 vs. 38.6±4.6 mm<sup>2</sup> respectivamente), número de islotes (1.02±0.14 vs. 1.03±0.09/mm<sup>2</sup>), tamaño insular (4387.9±744.5 vs. 4405.6±909.7 µm<sup>2</sup>), número de células beta por islote (38.9±5.6 vs. 36.6±3.6), tasa de replicación beta (13.1±4.1 vs. 16.12±3.3 %), masa de células INGAP (0.25±0.18 vs. 0.22±0.05 mg), masa de células PDX-1 positivas (0.63±0.4 vs. 0.23±0.02 mg), masa de células CK19 positivas (0.15±0.02 vs. 0.20±0.08 mg), masa de células no-beta (0.22±0.06 vs. 0.23±0.1 mg) y número de células NKX 6.1 positivas (20.1±9.2 vs. 37.5±1.2/mm<sup>2</sup>). **Conclusión:** la DRS no induciría cambios en la masa de células beta y en los marcadores de neogénesis durante la preñez, debido a la falta de incremento de la masa de células INGAP. Posiblemente el aumento de la masa de células beta inducido por la preñez ejercería un mecanismo de retroalimentación con las células productoras de INGAP, impidiendo así que el INGAP promueva un aumento ulterior de la masa de dichas células.

**0228. (0153) DESBALANCE REDOX INDUCE EL AUMENTO DE PROTEÍNA PRO-APOPTÓTICA BAX Y LIBERACIÓN DE CITOCROMO C DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA EN RATAS DIABÉTICAS. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INSULINA.** DE Francés, MT Ronco, AD Quiroga, JP Parody, JA Monti, ML Álvarez, MC Carrillo, CE Carnovale

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) – CONICET. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.

La hiperglicemia aumenta la producción celular de especies reactivas del oxígeno (ROS) que inducen apoptosis a través de la activación de Bax. Previamente demostramos que los ROS alteran el proceso de regeneración hepática. En el estado diabético existe un retardo en mencionado proceso. **Objetivo:** Evaluar el rol del estrés oxidativo en las primeras horas post-hepatectomía en ratas diabéticas y el efecto del tratamiento con insulina. **Métodos:** Ratas Wistar macho adultas fueron divididas en tres grupos: Control (C) (n=20), inyectadas i.p. con vehículo; Diabético (D) (n=20) inyectadas i.p. con estreptozotocina (SZ) 60 mg/kg pc y Diabético+Insulina (D+I) (n=20) 15 días post-SZ, inyectadas s.c. con Insulina 30 UI/kg pc por día durante 15 días. A los 30 días C, D y D+I fueron subdivididos en: Sham (s) y Hepatectomizado (HP, hepatectomía del 65%). Los animales se sacrificaron a la hora (1) y a las 5 horas (5) post-cirugía. **Resultados:** Glicemia (gl): C=1,1±0,1; D=4,3±0,4\*; D+I=1,63±0,37. Porcentaje de glutatión oxidado (Met. Tiezte): Cs=4,96±0,41; CHP1=8,07±0,45\*; CHP5=10,61±0,71\*; Ds=11,37±0,45\*; DHP1=11,23±0,20\*; DHP5=8,91±0,71\*; D+Is=6,76±0,46; D+IHP1=7,85±1,05; D+IHP5=9,89±1,74\*. LPO (Mét. Ohkawa-HPLC, % de Cs): CHP1=134,2±6,6\*; CHP5=151,7±6,6\*; Ds=173,1±14,1\*; DHP1=198,3±30,9\*; DHP5=164,4±23,8\*; D+Is=138,7±16,1\*; D+IHP1=135,3±17,8; D+IHP5=142,9±10,7. Bax mitocondrial (Western Blot, % de Cs): CHP1=131,3±5,6\*; CHP5=160,9±25,9\*; Ds=176,8±14,3\*; DHP1=187,5±31,1\*; DHP5=178,9±15,5\*; D+Is=119,4±39,4; D+IHP1=147,6±40,3; D+IHP5=148,3±35,6. Citocromo c

citosólico (Western Blot, % de Cs): CHP1=156,5± 23,2\*; CHP5=179,2±31,2\*; Ds=286,0±64,5\*; DHP1=252,1±32,2\*; DHP5=425,4±52,2\*§; D+Is=194,9±29,7\*; D+IHP1=321,2±52,3\*; D+IHP5=317,3±48,2\* (\*p<0,05 vs Cs; §p<0,05 vs Ds; #p<0,05 vs D+Is). **Conclusión:** En el estado diabético se observó un aumento de ROS que produce activación de Bax y liberación de citocromo c; esta situación se revirtió sólo parcialmente con el tratamiento con insulina.

## ONCOLOGÍA III

**0229. (0763) ATENUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE COMO PARTE DEL MECANISMO DE EXACERBACION TUMORAL INDUCIDA POR INFLAMACION SISTEMICA.** J Bruzzo, P Chiarella, AF Maglioco, GV Camerano, GI Dran, OD Bustuabad, RA Ruggiero

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

El crecimiento del fibrosarcoma murino inmunogénico MC-C cursa con un proceso de inflamación sistémica (IS) que se manifiesta cuando el tamaño del tumor ha superado los 500 mm<sup>3</sup> y que se evidencia por neutrofilia y por un aumento de la concentración sérica de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1β, IL-6 y TNF-α y las proteínas de fase aguda A amiloide y C reactiva. Para determinar la influencia de esta IS sobre el crecimiento de MC-C, provocamos deliberadamente una IS en el huésped mediante la inoculación intraperitoneal de tioglicolato (Tg) 2 días antes del inóculo tumoral o cuando el tumor ya estaba implantado (día 10 post-inoculación), pero todavía no había generado la IS por sí mismo. El crecimiento se mostró acelerado tanto en el primer caso (día 8; volumen tumoral de tratados con Tg: 158.4 ± 16.7 mm<sup>3</sup>, n = 12; vs volumen control: 85.8 ± 11.0 mm<sup>3</sup>, n = 9; p < 0.01) como en el segundo caso (día 20; volumen tumoral de tratados: 2414.4 ± 298.6 mm<sup>3</sup>, n = 19; vs volumen control: 1253.8 ± 224.9 mm<sup>3</sup>, n = 19; p < 0.01). Para estudiar si esta exacerbación podía ser atribuida a una inmunodepresión provocada por la IS generada por Tg, evaluamos si la presencia de ésta, afectaba la inmunidad antitumoral tanto en ratones portadores de MC-C de menos de 500 mm<sup>3</sup> (inmunidad concomitante), como en ratones inmunizados (pre-tratamiento con células irradiadas) contra MC-C, no portadores de tumor (inmunidad sincomitante). Inmunidad concomitante: crecimiento del tumor 2° en portadores de tumor 1°: volumen tumoral = 23.5 ± 10.2 mm<sup>3</sup>, n = 16 al día 14 y en portadores de tumor 1° + Tg: volumen tumoral = 87.4 ± 26.3 mm<sup>3</sup>, n = 15; p < 0.05. Inmunidad sincomitante: crecimiento de un implante tumoral en ratones inmunizados: 3.8 ± 2.1 mm<sup>3</sup>, n = 13 al día 11 y en inmunizados + Tg: 22.5 ± 5.7 mm<sup>3</sup>, n = 16; p < 0.01. Estos resultados sugieren que la exacerbación del crecimiento del tumor MC-C inducida por IS, sería al menos en parte, resultado de una atenuación de la respuesta inmune anti-tumoral.

**0230. (0460) INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS NORMALES O TUMORALES Y ADIPOCITOS: REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DE LA PROGRESIÓN TUMORAL.** V Pistone Creydt<sup>1</sup>, P Sacca<sup>1</sup>, JC Calvo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, <sup>2</sup> Dto. Química Biológica, FCEN, UBA

Las células estromales afectan el crecimiento y la capacidad metastásica de células tumorales. La heparanasa cliva al heparán sulfato y se ha descrito la importancia de esta enzima en la metástasis tumoral. Además, las metaloproteinasas (MMPs) clivan proteoglicanos y degradan la matriz. El objetivo fue estudiar los cambios en la proliferación, migración, y actividades de la heparanasa y MMPs en líneas celulares epiteliales murinas normales (NMuMG) y tumorales (LM3) incubadas con medios condicionados de preadipocitos 3T3-L1 (modelo de células estromales mamarias) en tres estadios de diferenciación: preadipocitos (MC); poco diferenciados (MCPD); y diferenciados a adipocitos (MCD).

La proliferación celular se cuantificó por MTS; la migración por cicatrización de la herida; la actividad de heparanasa por degradación de heparina en geles de poliacrilamida teñidos con Rubipy; y las MMPs por zimografía. MC, MCPD y MCD aumentaron la proliferación de NMuMG luego de 24h ( $112\pm 3\%$ ;  $119\pm 3\%$ ;  $123\pm 3\%$  respectivamente) y 48 h ( $107\pm 4\%$ ;  $118\pm 3\%$ ;  $123\pm 1\%$  respectivamente) de incubación con respecto al control ( $p < 0,05$ ), mientras que no se observaron cambios en LM3. Por el contrario, MC aumentó la migración celular de LM3 ya que la herida se cerró en un  $44\pm 8\%$  luego de 6h de incubación ( $p < 0,05$ ), mientras que no estimuló la migración de NMuMG. Por otra parte, NMuMG y LM3 no presentaron actividad basal de heparanasa y MMPs detectable, pero la incubación de NMuMG por 24h con MCPD y MCD, y de LM3 con MCD, permitieron detectar actividad de heparanasa. Además, la incubación por 24 y 48 h con los tres MCs ensayados estimularon la actividad de la proMMP2 en las fracciones citosólicas de ambas líneas celulares, así como también en la fracción de membrana de LM3. Podemos concluir que los adipocitos, en diferentes estadios de diferenciación, regulan la proliferación y migración de células mamarias normales y tumorales de manera diferencial a través de factores liberados al medio de cultivo.

**0231. (0302) EFECTO DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS  $\beta$ -ADRENÉRGICOS SOBRE MODELOS *IN VIVO* DE CÁNCER DE MAMA.** A Bruzzone, C Pérez Piñero, L Castillo, I Luthy

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

Habíamos descripto la presencia de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos ( $\alpha_2$ -RA) en líneas tumorales mamarias humanas y murinas. Su estimulación induce un aumento en la proliferación celular y un aumento en el crecimiento tumoral. Se ha descripto la presencia de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. Sin embargo se desconoce el efecto de los compuestos  $\beta$ -adrenérgicos sobre modelos *in vivo* de cáncer de mama. El objetivo fue evaluar el efecto de estos compuestos sobre un modelo tumoral murino y sobre la línea humana MDA-MB-231 creciendo en ratones inmunodeficientes (NUDE). Con respecto al tumor MDA-MB-231, se inocularon 7 millones de células s.c en ratones desnudos. Estabilizado el tumor, se lo transplantó con trocar. Como modelo murino se utilizó el tumor CC4-3-HI en ratones Balb/c. Diariamente se administraron agonistas: isoproterenol (ISO) 1mg/Kg, antagonista: propanolol (PRO) 1mg/Kg, o ambos. En el tumor CC4-3-HI, el ISO disminuyó el crecimiento tumoral con respecto al grupo control ej. día 24:  $1148\pm 212$  vs  $2556\pm 187$  mm<sup>3</sup>,  $p < 0,01$ . El PRO fue capaz de revertir este efecto ( $2150\pm 216$  mm<sup>3</sup>), aunque no tiene efecto cuando se lo inocula solo ( $1744\pm 194$  mm<sup>3</sup>). En el tumor MDA-MB-231, el ISO también provocó una disminución del crecimiento tumoral ej. día 50:  $63\pm 35$  vs  $360\pm 108$  mm<sup>3</sup>,  $p < 0,05$ . El PRO fue capaz de revertir este efecto ( $361\pm 155$  mm<sup>3</sup>). No presenta acción alguna cuando se lo inocula solo ( $208\pm 72$  mm<sup>3</sup>). En el caso de este tumor, el tratamiento con ISO logró regresionar al 70% de los tumores (vs. 40% grupo control, 10% PRO, 30% ISO+PRO). Trabajos previos del laboratorio demostraron que el antagonista  $\alpha_2$ -RA rauwolscina disminuye el crecimiento del tumor CC4-3-HI. Se comprobó el mismo efecto sobre el tumor MDA-MB-231 (ej. día 40:  $63\pm 31$  vs  $120\pm 37$  mm<sup>3</sup>). Concluimos que *in vivo* la estimulación  $\beta$ -adrenérgica disminuye el crecimiento tumoral. En base a estos resultados se plantea el posible uso de terapia combinada: antagonista  $\alpha_2$ + agonista  $\beta$  adrenérgico.

**0232. (0743) ESTUDIOS SOBRE LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD TRANSFORMANTE DEL GEN RSP03, LOCUS DE INSERCIÓN DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO.** MN Zimmerlin, A Gattelli, N Rubinstein, OA Coso, EC Kordon  
*LEGMA IFIBYNE CONICET FCEN UBA*

El virus de tumor de mama murino (MMTV) induce tumores por mutagénesis insercional. En nuestro modelo, tres cepas de

MMTV inducen en ratones BALB/c tumores preñez-dependientes que, eventualmente, se independizan de la regulación hormonal. Nuestro grupo ha aislado y clonado 10 sitios de inserción viral en estos tumores. Uno de ellos fue identificado como una inserción localizada en las proximidades del gen Rsp03. En la línea tumoral en la que esta mutación fue hallada encontramos, por técnicas de RT-PCR semicuantitativo, la sobre-expresión de dicho gen. Además, por esta misma técnica hallamos alta expresión de Rsp03 en otras líneas de tumores inducidas por MMTV, en líneas de tumores inducidas por acetato de medroxiprogesterona y en líneas celulares originadas a partir de tumores espontáneos. Para determinar la actividad oncogénica de Rsp03, su cDNA fue clonado primeramente en un vector pGEM-T y luego subclonado en el vector de expresión pCEFL-HA. A continuación se encontró que células NIH-3T3 transfectadas con pCEFL-HA-Rsp03 eran capaces de formar focos de transformación. Estos focos fueron aislados y en estas células, denominadas 3T3-Rsp03 confirmamos la expresión de HA-Rsp03, por análisis de Western blot y RT-PCR, y también determinamos la fosforilación de algunas proteínas quinasas como AKT y JNK. Dado que ha sido reportado que la familia Rsp03 son proteínas de secreción capaces de inducir fenómenos de proliferación y/o diferenciación en distintos tejidos, decidimos determinar la actividad de medios condicionados por las células 3T3-Rsp03 en células NIH-3T3 "naïf". Hallamos que estos medios eran capaces de inducir la fosforilación de la proteína AKT en las células tratadas. A partir de estos ensayos podemos concluir que Rsp03 es un gen que se expresa con cierta frecuencia en tumores mamarios murinos de distinto origen y que induce fenómenos de transformación celular, los cuales podrían estar mediados por la activación de proteínas quinasas como AKT.

**0233. (0211) TERAPIA FOTODINÁMICA BASADA EN ACIDO 5-AMINOLEVULICO, TRATAMIENTO ALTERNATIVO EN CÉLULAS LEUCÉMICAS.** BA Diez<sup>1,3</sup>, M García<sup>2</sup>, S Hajos<sup>2</sup>, A Battle<sup>3</sup>, H Fukuda<sup>1,3</sup>

*1 Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, 2 Cátedra de Inmunología, IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, CONICET, 3 Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porfirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA*

La terapia fotodinámica (TFD) basada en ácido 5-aminolevulico (ALA) es útil para erradicar células malignas mediante la fotoactivación de porfirinas sintetizadas endogenamente a partir de su precursor biológico ALA. Para este trabajo se utilizaron líneas celulares obtenidas de una leucemia murina: LBR- (sensible a drogas antineoplásicas), LBR-D (resistente a doxorubicina) y LBR-V (resistente a vincristina). Se midió la síntesis de porfirinas por extracción química a partir de ALA 0.1 mM durante distintos tiempos de incubación. La síntesis total aumenta en función del tiempo de incubación (resultados en pmoles porfirinas/10<sup>6</sup>células: LBR-: 2 h:  $6.9 \pm 0.35$ ; 3 h:  $7.6 \pm 0.6$ ; 4 h:  $10.2 \pm 1.1$ ; LBR-D: 3 h:  $10.8 \pm 0.8$ ; 4 h:  $13.8 \pm 1.2$ ; LBR-V: 3 h:  $12.6 \pm 1.6$ ). La línea LBR-V fue la que mayor cantidad de porfirinas sintetizó. Se evaluó también la cantidad de porfirinas retenidas intracelularmente y las que se externalizan al medio de incubación. A tiempos cortos de incubación (2-3 h) la proporción de porfirinas que se externaliza es mayor que la intracelular. A medida que aumenta el tiempo de incubación, ambos valores se equilibran (% extracelular: LBR-: 2 h:  $71.74 \pm 0.5$ ; 3 h:  $76.22 \pm 6.24$ ; 4 h:  $57.05 \pm 7.22$ ; LBR-D: 3h:  $64.22 \pm 6.79$ ; 4h:  $55.36 \pm 5.77$ ; LBR-V: 3 h:  $71.21 \pm 7.21$ ; 4 h:  $50.87$ ). Se evaluó la viabilidad celular (Tripán Blue) luego de la incubación con ALA y posterior iluminación ( $0.18$  J/cm<sup>2</sup>). No se observaron diferencias significativas en la sensibilidad al tratamiento en las tres líneas estudiadas (% supervivencia 1 h post tratamiento: LBR-: 16.39; LBR-D: 14.03; LBR-V: 11.21; 18 h post tratamiento: LBR-: 10.42). Luego de 18 h no se observó viabilidad en las líneas resistentes. Los resultados obtenidos hasta el momento constituyen una base sobre la cual continuar futuras investigaciones que permitan dilucidar los efectos de la TFD como posible tratamiento de leucemias.

**0234. (0549) REGRESIÓN TUMORAL EN RATONES VACUNADOS CON CÉLULAS DENDRÍTICAS COCULTIVADAS CON CÉLULAS APOPTÓTICAS B16.** C Pollak<sup>1</sup>, S Gazzaniga<sup>2</sup>, Al Bravo<sup>3</sup>, S Mac Keon<sup>2</sup>, J Mallerman<sup>2</sup>, J Mordoh<sup>1</sup>, R Wainstok<sup>2</sup>

1 *Fundación Instituto Leloir, 2 Dpto. Química Biológica, FCEyN, UBA, 3 Hospital Eva Perón, San Martín*

Previamente demostramos que 80% de ratones vacunados con células dendríticas (CD) diferenciadas a partir de células de médula ósea y cocultivadas con células apoptóticas del melanoma murino B16 (CDApo) son protegidos frente a un desafío tumoral (J. Immunol. 2003; 171, 5940). Aún así, se observó que un 20% de los ratones desarrollan tumor y éstos crecen más lentamente que en los animales no vacunados. El propósito de este trabajo fue utilizar dichos ratones para estudiar los mecanismos por los cuales se produce el rechazo tumoral. Para ello se administraron en forma s.c. 4 dosis de CDApo (200000 células). El grupo control recibió PBS y el desafío se realizó en ambos grupos con 13000 B16 viables. Los ratones que aún vacunados desarrollaron tumores (20-30% de animales), así como los no vacunados, fueron sacrificados al detectarse un pequeño tumor por palpación para poder realizar el estudio en las primeras etapas del desarrollo tumoral. Los volúmenes evaluados oscilaron entre 1-40 mm<sup>3</sup>. Antes del sacrificio se les inyectó 15 mg de BrdU i.p. para determinar la tasa de proliferación celular. Sólo en los animales vacunados se observó un importante infiltrado leucocitario con evidencias de linfocitos, células endoteliales y fibroblastos BrdU+ peri o intratumorales; y los tumores mostraban necrosis. Sin embargo, el porcentaje de células tumorales BrdU+ no mostró diferencias significativas entre los animales vacunados y los controles (10.25% ± 3.67 vs 11.29% ± 3.11). Las diferencias en el volumen tumoral observadas no se deberían a diferencias en la tasa de proliferación de las células tumorales. Se propone, entonces, que uno de los factores que contribuiría a la regresión tumoral en los animales vacunados es el aumento de aflujo y proliferación de linfocitos que llegan al sitio tumoral a través de la angiogénesis que ocurre en la periferia tumoral y a la posterior necrosis tumoral, que sólo se observó en los animales vacunados.

**0235. (0524) DETECCIÓN MOLECULAR POR RT-PCR DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES EN PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO DE ALTO RIESGO.** V Vazquez<sup>1</sup>, M Castro<sup>2</sup>, MR Gabri<sup>1</sup>, G Cinat<sup>2</sup>, DE Gomez<sup>1</sup>, DF Alonso<sup>1</sup>

1 *Universidad Nacional de Quilmes, 2 Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"*

La detección molecular de material tumoral circulante contribuye a detectar la enfermedad residual en pacientes oncológicos. En este trabajo, desarrollamos un sistema de detección de células melánicas humanas basado en la retrotranscripción del mensajero seguida de PCR anidada (RT-PCR) de una secuencia del gen de tirosinasa. Para ello, se optimizaron las condiciones de amplificación in vitro utilizando células SKmel-28 y cebadores de diseño interexónico. La sensibilidad alcanzada fue de 1,5 pg del molde inicial de ARN, con una alta especificidad hacia melanoma humano. Para la valoración clínica se analizaron 126 muestras de sangre periférica provenientes de 38 pacientes con melanoma estadios III y IV libres de enfermedad, enrolados en un protocolo clínico con la vacuna GM3/VSSP (ANMAT). Al ingresar, se tomaron 5 ml de sangre como muestra basal y luego en muestras trimestrales consecutivas. El ARNm de la muestra fue preservado en una solución de tiocianato de guanidinio y guardado a -70°C hasta su procesamiento por RT-PCR. Se realizó un análisis interno de los resultados sobre los primeros 25 pacientes. Considerando la muestra basal, el 87% (14/16) de los casos positivos para tirosinasa mostró progresión de la enfermedad al año, mientras sólo lo hizo el 45% (4/9) de los negativos (p<0,05; chi<sup>2</sup>). Además, las 3 primeras determinaciones trimestrales mostraron valor pronóstico (p<0,05; Cox-Mantel). El análisis preliminar del total de los pacientes reclutados mostró una mediana de progresión de 8,5

meses (1-58) observándose signos de progresión en un 71% de los pacientes positivos. El análisis multivariado de los datos arrojó una tasa de riesgo de muerte asociada a una determinación positiva del marcador de 1,41 (0,28-7; NS). Los resultados sugieren la utilidad de este sistema de detección de tirosinasa en sangre por RT-PCR, con posibles aplicaciones pronósticas en el seguimiento de la enfermedad residual de pacientes con melanoma.

**0236. (0573) ROL DEL INOSITOL FOSFOGLICANO (IPG) COMO POSIBLE MEDIADOR DE LOS EFECTOS DE LA IRRADIACIÓN SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER INDIFERENCIADO DE TIROIDES (CIT).** MA Dagrosa<sup>1, 2</sup>, M Crivello<sup>2</sup>, M Perona<sup>2</sup>, M Casal<sup>3</sup>, S Thorp<sup>2</sup>, E Pozzi<sup>2</sup>, GJ Juvenal<sup>1, 2, 4</sup>, L Krawiec<sup>1, 2</sup>

1 *CONICET, 2 CNEA, 3 Instituto Roffo, 4 Facultad de Medicina - UBA*

En nuestro laboratorio demostramos que el inositol fosfoglicano (IPG) inhibe la actividad de tiroperoxidasa (TPO) y otras oxidorreductasas en cultivos de tiroides normal bovina, aumentando así los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, cuando una célula es irradiada, el daño es producido por un aumento de radicales libres (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otras especies reactivas del oxígeno: ROS) o por la ionización directa de moléculas, dependiendo de la calidad de la radiación. Con el objetivo de establecer si el IPG juega un rol en los mecanismos de daño por radiación, células de la línea tumoral de CIT (ARO) en proliferación, fueron sometidas a radiación de baja y alta transmisión linear de energía (LET): gamma, neutrones y núcleos de He y 7Li (estos últimos producidos por la reacción de captura neutrónica en boro). En todos los grupos las dosis físicas totales absorbidas fueron 3 y 8 Gy (flujo de neutrones del RA3=7.5 109n/cm<sup>2</sup> seg). Los resultados muestran un aumento significativo en la actividad del IPG en células irradiadas con gamma y neutrones, con respecto a los cultivos controles (p<0.01). En un segundo estudio, inmediatamente después de la irradiación las células fueron incubadas durante distintos tiempos con dos dosis del IPG (0.025 y 0.05 µg/µL). Se observó en las células controles y en las irradiadas con gamma y neutrones, pero no en las irradiadas con neutrones en presencia de boro, una disminución en la viabilidad celular para las dos dosis de IPG, a los 5 días post irradiación (p<0.01). Esta disminución en el número de células fue menos pronunciado en las no irradiadas. A este tiempo se produjo un aumento en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medio de cultivo (p<0.01). Estos resultados sugieren que la inhibición de las oxidorreductasas por el IPG produciría un aumento de peróxidos que se sumaría a los ROS generados por la irradiación de bajo LET, sumando así el daño y la disminución de la viabilidad celular.

**0237. (0343) ALTERACIONES EN LA ADHESIÓN CÉLULA-CÉLULA Y CÉLULA-SUSTRATO OCASIONADA POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA.** El Yslas<sup>1</sup>, VA Rivarola<sup>1</sup>, F Sanz-Rodríguez<sup>2</sup>, A Blázquez<sup>2</sup>, A Juarraz<sup>2</sup>

1 *Dpto Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, 2 Dpto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España*

La terapia fotodinámica (TFD) se emplea para el tratamiento de tumores pequeños y superficiales. El procedimiento comprende 2 etapas y requiere 3 elementos no tóxicos: fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno. Los FSs exógenos se acumulan preferentemente en el tejido tumoral y se activan cuando son expuestos a luz visible de longitud de onda específica. La droga activada ocasiona la formación de ROS, responsables de los efectos citotóxicos que conllevan a la muerte de las células tumorales. La TFD induce daño a nivel de membrana y alteraciones en la adhesión celular. El objetivo del trabajo consistió en evaluar los efectos fotodinámicos sobre la adhesión celular del derivado metilado del ácido 5-aminolevulínico (Me-ALA) en cultivos primarios de fibroblastos humanos (FH). La microscopía de fluorescencia reveló que la protoporfirina IX, fluoresce en rojo y se localizaba de

forma difusa en el citoplasma de los FH. Los estudios de toxicidad celular mostraron que el Me-ALA, en ausencia de luz, no ocasionó mortalidad celular cuando las células fueron incubadas durante 4 h con concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1mM (MTT y citometría de flujo). Por el contrario, se observó una disminución de la viabilidad celular cuando se emplearon concentraciones superiores a 0,4 mM y tiempos largos de incubación. El efecto fotodinámico fue variable y dependiente de las condiciones de tratamiento (concentración y tiempo de irradiación). Por otra parte, se analizaron los cambios provocados por la TFD en la morfología celular observándose 48 h que los tratamientos fotodinámicos con 0,8 mM de Me-ALA, 4 h de incubación y 12 min de irradiación desencadenaron la muerte por apoptosis (tinción con Hoechst). Las células que resistieron al tratamiento fotodinámico presentaron mayor organización y grosor de las fibras de estrés. Dichas células mostraron un incremento en la expresión de integrina, FAK y P-FAK (inmunofluorescencia). **Conclusión:** Me-ALA-TFD provocó alteraciones en la adhesión celular.

**0238. (0352) BACILO CALMETTE GUERIN (BCG) INDUCE ACTIVACIÓN DE FIBROBLÁSTOS.** A Guionet, C Lodillinsky, Y Langle, A Casabé, AM Eiján

*Instituto de Oncología "Ángel H Roffo" - UBA*

BCG combinado con L-NAME, inhibidor de la producción de óxido nítrico (NO), disminuye el crecimiento de tumores generados por la línea de cáncer de vejiga murina MB49 induciendo depósito de colágeno. Ésta línea celular es productora de NO bajo tratamiento con BCG. Para comprender los mecanismos involucrados en este fenómeno evaluamos la actividad de una línea de macrófagos RAW264.7 y células MB49 sobre fibroblastos NIH-3T3 in vitro. Ensayamos el efecto de BCG con o sin L-NAME y la actividad de los medios condicionados (MC) de RAW264.7 y de MB49 tratadas o no con BCG (1mg/ml) sobre NIH-3T3 evaluando a) la proliferación mediante recuento celular y MTS (Abs 492 nm) y b) producción de colágeno I por western blot e inmunofluorescencia. Análisis estadístico ANOVA-Tukey, n=6. BCG induce la proliferación de NIH-3T3 efecto potenciado por L-NAME (2mM), control:  $0.471 \pm 0.040$ , BCG  $0.582 \pm 0.041$ , BCG+L-NAME:  $0.651 \pm 0.050$  ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$  vs control respectivamente). El MC de MB49-BCG inhibe la proliferación de NIH-3T3, MC-MB49:  $0.189 \pm 0.015$ ; MC-MB49-BCG:  $0.011 \pm 0.005$  ( $p < 0.001$ ), mientras que el MC de RAW264.7 tratados con BCG induce su proliferación, MC-RAW  $0.541 \pm 0.010$ , MC-RAW-BCG:  $0.602 \pm 0.03$  ( $p < 0.001$ ). El MC-RAW-BCG induce incremento de colágeno I a las 12 h post tratamiento evidenciado por una banda con un peso estimado de 100 kDa y gránulos citoplasmáticos específicos. Nuestros resultados muestran que el mecanismo de acción de BCG implica un efecto directo sobre los fibroblastos induciendo su proliferación y la producción de colágeno I, como así también un efecto indirecto mediado por la liberación de productos solubles desde el macrófago. La célula tumoral y el NO regularían negativamente este proceso.

**0239. (0214) ANÁLISIS DE MICRODELECCIONES DE AZF EN PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO.** A Orlowski, N Cambados, SM Richard

*Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC-CONICET, La Plata*

El intervalo AZF (Azoospermic factor) está formado por seis familias de amplicones que comprenden secuencias palindrómicas múltiples. Esta particular estructura facilita la recombinación intracromosómica y la aparición de delecciones recurrentes que son causales de infertilidad en un 25-30% de las infertilidades masculinas. Desde hace unos años nuestro grupo ha orientado sus investigaciones a analizar esta asociación entre las microdelecciones de AZF y cáncer de testículo, también linfomas y cáncer de colon hereditario, por ser afecciones asociadas a una disminución en la calidad del esperma, habiendo encontrado en todos los tipos cancerosos nombrados presencia de algún tipo de delección. El objetivo de este trabajo fue analizar la presencia de

microdelecciones de AZF en pacientes con un tipo de cáncer no asociado a la disminución de la fertilidad. Mediante 9 reacciones de PCR en multiplex, se analizaron 46 loci de AZF que abarcan los 4 intervalos AZF a, b, c y d, en los tejidos tumorales y no tumorales de 15 pacientes con cáncer gástrico. Los tejidos tumorales y no tumorales estaban fijados e incluidos en parafina. La extracción de ADN se realizó retirando la parafina mediante la técnica por calor seguido por el procesamiento en columnas de extracción Qiagen. Se definieron tres patrones de delección, a. delección en ambos tejidos, b. sólo en tejido tumoral y c. sólo en tejido normal. En los casos que apareció alguna delección se verificó la misma mediante reacciones en duplex. El 20% de las muestras presentó para algunos loci ausencia de la banda. Luego de la amplificación en duplex, todos los casos presentaron la presencia de todas las bandas. A partir de nuestros resultados concluimos que la inestabilidad del cromosoma Y tomada como la presencia de microdelecciones de AZF parece ser característica sólo de aquellos tumores que presentan asociaciones con baja calidad espermática.

**0240. (0481) LA FIBRONECTINA CONFIERE RESISTENCIA AL TAMOXIFENO EN UN MODELO MAMARIO MURINO DE CÁNCER DE MAMA ESTRÓGENO DEPENDIENTE.** O Pontiggia, E Bal de Kier Joffé, M Simian

*Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"*

Demostramos previamente que en la línea celular LM05-Mix, derivada de un tumor mamario murino estrógeno dependiente, la población celular fibroblástica confiere resistencia al tamoxifeno a la población epitelial. El objetivo de este trabajo fue investigar si componentes de matriz extracelular eran capaces de conferir resistencia al tamoxifeno. Para ello primero se estudió la inmunolocalización de fibronectina, laminina y colágeno IV. En los tres casos se encontró deposición de los componentes de matriz especialmente asociada a la población fibroblástica. A continuación, para determinar si los mismos conferirían resistencia al tamoxifeno se sembraron células de la línea epitelial LM05-E sobre placas previamente cubiertas con laminina, fibronectina o colágeno IV, y se trataron con 1% SFBch + estradiol (10-8M), con o sin el agregado de 4-OH-tamoxifeno (10-6M). Se encontró que tanto la laminina como la fibronectina redujeron significativamente la muerte celular inducida por tamoxifeno ( $p = 0.001$ ). Estudios de western blot mostraron la fosforilación de FAK y MAPK/ERK1/2 al tratar las células LM05-E con fibronectina, implicando esta vía de señalización en el efecto protector. Por otra parte el efecto protector de la fibronectina también fue reproducible en la línea humana hormonodependiente MCF-7 ( $p = 0.01$ ). Nuestros resultados demuestran que la matriz extracelular del microambiente tumoral es capaz de modular la sensibilidad al tamoxifeno, planteando nuevos mecanismos que explicarían la hormono-resistencia en cáncer de mama. Este trabajo se realiza con el apoyo de la Fundación "Susan G. Komen for the cure".

**0241. (0189) RESPUESTAS INMUNES EN RATONES PORTADORES DE UN ADENOCARCINOMA DE PULMON (LP07).** AN Motter, ML Rodríguez, VA Rodríguez, MJ Diamant, SM Klein

*Área Investigación, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo, UBA*

**Objetivo:** Determinar el estado de inmunocompetencia de portadores de un adenocarcinoma de pulmón LP07, que desarrolla una respuesta inflamatoria sistémica. Evaluamos la actividad de linfocitos T: 1. ratones portadores de LP07 ( $3 \times 10^5$ ) sc (PLP07) fueron inoculados en el flanco contralateral con  $10^5$  células alogeneicas (alo) MB49 (MB49-PLP07); o con el tumor singeneico (sin) LP07 ( $1.5 \times 10^5$ ). 2. PLP07 de 15 días se operaron de su tumor primario y desafiaron con LP07 sc. Se determinó la capacidad de los esplenocitos de 1 y 2 de inhibir la proliferación de LP07 y MB49 (MTT). 3. Estudiamos la activación de macrófagos (mfg) en PLP07 inoculados con LPS (10  $\mu$ g, ip), al día -2 y 20. Se evaluó: a) disminución de peso corporal; b) producción de óxido nítrico (ON); c) el efecto de medios condicionados (MC) de mfgs

sobre la proliferación de LP07. **Resultados:** 1- PLP07 y controles rechazaron el tumor LMB49 (100%). Esplenocitos de BALB/c MB49 y MB49-PLP07, inhibieron la proliferación *in vitro* de cMB49 en 40% y 78% ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  vs normal y PLP07); el efecto fue menor sobre cLP07. 2- El desafío sin con LP07 en PLP07 ( $p < 0,001$ ) y en ratones operados ( $p < 0,01$ ), tuvo una latencia mayor y crecimiento menor que en los controles. 3- El tratamiento con LPS disminuyó el peso corporal (15%) en todos los grupos. PLP07 tratados al día 20 tuvieron una menor tasa de crecimiento tumoral ( $p < 0,01$ ). El inóculo al día -2 aumentó la tasa de crecimiento tumoral ( $p < 0,01$ ) y la producción de ON por mfgs. Conclusiones: Los LT de PLP07 están activados para el rechazo del tumor alo, y reducen el crecimiento del desafío posterior con células sin. LPS inoculado al día -2 estimula el crecimiento tumoral y los mfgs aumentan la producción de ON. En estadios tardíos de PLP07, reduce la velocidad de crecimiento tumoral, probablemente el LPS actúa sobre las células LP07. Es posible que estas respuestas no sean las que tengan lugar en el microambiente del tumor primario y no sean las necesarias para su rechazo.

### INMUNOLOGÍA III

#### 0242. (0753) LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATONES C57BL/6 CAMBIA CON LA EDAD. G Moron, MI Crespo, B Maletto, M Liscovsky, MC Pistoresi

CIBICI-CONICET, Fac. CS. Químicas, Univ. Nac. de Córdoba

Durante el envejecimiento, las células T y B cambian su capacidad para reaccionar frente a los antígenos. Sin embargo, se ignora si las células dendríticas (DCs) participan en estos cambios. En este trabajo, analizamos la capacidad de las DCs esplénicas de ratones C57BL/6 de 18 meses de edad (V) para capturar y procesar antígenos. Observamos que el bazo de ratones V contiene menos DCs que el bazo de ratones control de 2-3 meses de edad (J) ( $2,9 \pm 0,1\%$  vs  $0,6 \pm 0,4\%$ ). DCsV de ratones inyectados con LPS aumentan menos la expresión de CD80 y CD86 que DCsJ. Las DCsV de bazo, incubadas en presencia de ovalbúmina acoplada a FITC (OVA-FITC) en forma soluble, capturan una menor cantidad de OVA-FITC que DCsJ (para OVA a 50 ug/ml, MFI-FITC  $82 \pm 4$  vs  $123 \pm 3$ ). Cuando las DCs fueron incubadas con OVA en forma de complejo inmune, las DCsV mostraron niveles ligeramente inferiores de MFI que las DCsJ. Para observar la capacidad de procesamiento de Ag, las DCs fueron incubadas con DQTM-OVA, cuya fluorescencia se incrementa cuando OVA es degradada. DCsV incubadas con DQTM-OVA mostraron un nivel de MFI ligeramente mayor que las DCsJ ( $44 \pm 1$  vs  $52 \pm 10$ ), lo cual podría estar indicando una mayor degradación de antígeno por las DCsV que las DCsJ. Finalmente, DCsV purificadas de bazo poseen una menor capacidad que las DCsJ para presentar el epitope SIINFEKL a un hidridoma de células T CD8+. En suma, estos resultados sugieren que las DCs de ratones viejos manifiestan diferente capacidad para capturar y procesar antígenos a la de las DCs de ratones jóvenes.

#### 0243. (0580) EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA RESPUESTA DE MACRÓFAGOS. R Ranocchia, M Liscovsky, C Gorlino, D Alignani, G Morón, B Maletto, MC Pistoresi

CIBICI-CONICET- Facultad de Ciencias Químicas – UNC-Córdoba-Argentina - cpistore@fcq.unc.edu.ar

Durante el envejecimiento existe un aumento en la incidencia de enfermedades infecciosas que sugiere un compromiso de la inmunidad innata para detectar PAMPs y desencadenar una respuesta efectiva. Previamente demostramos que macrófagos (MO) peritoneales nativos de animales de 18 meses de edad (V) conservaban algunas propiedades proinflamatorias (secreción de NO e IL-12) tras la estimulación *in vitro* con LPS+IFN- $\gamma$  o CpG+IFN- $\gamma$ . En este trabajo utilizamos MO obtenidos post inyección i.p. de tioglicolato con el objeto de evaluar la respuesta de MO-V a un

desafío proinflamatorio *in vivo*. El análisis del número absoluto de monocitos-MO en el peritoneo 5 días post inyección indica que los monocitos V mantienen inalterada su capacidad de migrar al sitio de inflamación cuando son comparados con monocitos de animales de 2 meses de edad (J), (J:  $18 \pm 7 \times 10^6$  cél. vs. V:  $30 \pm 5 \times 10^6$  cél;  $p < 0,01$ ). Por FACS evaluamos la expresión de moléculas relacionadas con la actividad de CPA (MHCII, CD80 y CD86), moléculas de adhesión (CD11b) y marcadores pro (CD16/32) y antiinflamatorios (MMR, SRA, CD23). Los MO-V inflamatorios sufrieron un cambio de fenotipo similar a MO-J, aunque en menor grado, en comparación a los MO nativos controles. Además, MO-V conservan las funciones de endocitosis (J:  $30 \pm 7\%$  y V:  $66 \pm 10\%$ ) y fagocitosis (J:  $22 \pm 5\%$  y V:  $25 \pm 9\%$ ). Cuando los MO inflamatorios fueron estimulados *in vitro* observamos que la actividad de arginasa, basal o bajo el estímulo de IL-4, fue similar para ambos grupos. Cuando el estímulo fue LPS+IFN- $\gamma$  o CpG+IFN- $\gamma$  la producción de NO fue mayor para MO-V que para MO-J ( $p < 0,001$ ), pero la secreción de IL-12 estaba dramáticamente disminuida ( $p < 0,001$ ). En conclusión, si bien en una situación inflamatoria los MO-V conservan inalterado un amplio rango de funciones, la producción de IL-12, necesaria para iniciar la respuesta adaptativa, está disminuida.

#### 0244. (0453) ALTERACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE NF-KB EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATONES NOD. L Larocca<sup>1</sup>, M Calafat<sup>1</sup>, V Roca<sup>1</sup>, AM Franchi<sup>2</sup>, C Perez Leiros<sup>1</sup>

1 Depto. Química Biológica- FCEN CONICET, 2 CEFyBO Facultad de Medicina - UBA CONICET

Los ratones diabéticos no obesos (NOD), desarrollan una respuesta Th1 espontánea con pérdida de la función secretoria a partir de las 12 semanas. Ésta sintomatología se asemeja al Síndrome de Sjögren (SS) en humanos. El VIP (péptido intestinal vasoactivo) es el neuropéptido más abundante del sistema inmune y por acción sobre macrófagos y linfocitos T polariza la respuesta hacia Th2. El factor nuclear kB (NF- $\kappa$ B) tiene un papel central en la respuesta inflamatoria y su activación se describe en varias enfermedades autoinmunes. Se han informado alteraciones en la activación y función de los macrófagos de ratones NOD. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la activación de NF- $\kappa$ B por lipopolisacárido (LPS) en macrófagos peritoneales de ratones NOD comparados con ratones controles BALB/c. Se emplearon hembras de 16 semanas. La producción de nitritos se determinó por Griess, la expresión de I $\kappa$ B-alfa y p65 por western blot (WB) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Por WB se observó la degradación de I $\kappa$ B-alfa en citosol de macrófagos peritoneales BALB/c tras estimularlos 15 min con 10 ug/ml LPS (unidades arbitrarias de área -UA: X  $\pm$  ES; Basal  $37 \pm 3$ ; LPS  $14 \pm 1$   $p < 0,05$ ) y dicha degradación fue simultánea a la translocación al núcleo de p65 observada por IFI. VIP (10-7M) revirtió la degradación de I $\kappa$ B-alfa (UA: X  $\pm$  ES; LPS  $14 \pm 1$ ; LPS-VIP  $33 \pm 3$ ;  $p < 0,05$ ). En contraste, en macrófagos peritoneales de ratones NOD no se observó degradación de I $\kappa$ B-alfa y p65 está translocado en condiciones basales. Estos resultados son consistentes con las determinaciones de nitritos en presencia y ausencia de sulfasalazina. Mientras en el BALB/c el inhibidor de NF- $\kappa$ B revierte totalmente la producción de nitritos, en los macrófagos de ratones NOD no se observa este efecto. Los resultados indican una alteración en la activación de NF- $\kappa$ B en los macrófagos de ratones NOD que influye en la producción de óxido nítrico.

#### 0245. (0598) LOS LIPOARABINOMANANOS DE MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. AVIUM (LAMS) AFECTAN LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL DEL BOVINO FRENTE A DIFERENTES ANTÍGENOS. S Colavecchia, A Jolly, B Fernández, E Fernández, S Mundo

Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires

Los Lipoarabinomananos (LAMs) son componentes de las micobacterias y se describen como inmunomoduladores. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de los LAMs sobre la

respuesta inmune humoral (RIH) de terneros frente a antígenos solubles, particulados y micobacterias inactivadas. 15 terneros de 1 año de edad fueron inmunizados por vía subcutánea con 3 dosis de diferentes combinaciones de antígenos +LAMs cada 15 días. Los grupos experimentales fueron: GI: PBS en adyuvante de Freund incompleto (AFI); GII: 1mg de ovoalbúmina (OVA)-AFI y 2% glóbulos rojos caninos (GRC); GIII: 1mg de OVA +1 mg de LAMs-AFI y 2% GRC; GIV: 2 mg de Maa-AFI; GV: 2 mg de Maa+ 1 mg de LAM-AFI. La RIH fue evaluada antes y 21 días después de la última dosis por ELISA y Hemaglutinación (HA) determinándose título final e isotipos. Las diferencias entre grupos fueron analizadas por t de Student. \*  $p < 0.05$ .

Ag	Con LAMs	Solos
OVA	10.000-20.000*	80.000-160.000
GRC	50-100 (HA:8-128)*	400-800(HA:128-256)
Maa	4.000-64.000	64.000-160.000

Con LAMs los niveles de IgG2\* e IgG3\* frente a OVA disminuyeron a la mitad comparados con los inmunizados sólo con OVA, sin observarse diferencias en los demás isotipos. En los inmunizados con GRC las Igs disminuyeron al 10% para IgG2\*, 60% para IgG1\* y 50% para IgM e IgG3. Por otro lado, en los animales inmunizados con Maa y LAMs los niveles de IgG2\* se cuadruplicaron, no pudiéndose detectar IgM e IgG1. Nuestros resultados muestran que los LAMs afectan a la RIH de los terneros disminuyendo los niveles de anticuerpos circulantes en todos los antígenos evaluados. Además, afectan IgG2 en forma negativa cuando se asocian a antígenos no relacionados, tanto particulados como solubles. Sin embargo, en el caso de las micobacterias el nivel de IgG2 se incrementó de manera altamente significativa. Coincidiendo con el perfil Th1 característico de las infecciones por micobacterias.

**0246. (0340) LOS LINFOCITOS T REGULADORES MODULAN LA RESPUESTA EFECTORA T INDUCIDA POR CEPAS DE MTB EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS MULTIRRESISTENTE A DROGAS (MDR-TB).** L Geffner<sup>1</sup>, N Yokobori<sup>1</sup>, L Balboa<sup>1</sup>, M Alemán<sup>1</sup>, P Schierloh<sup>1</sup>, V Ritacco<sup>3</sup>, A García<sup>2</sup>, M Vescovo<sup>2</sup>, M Cufre<sup>2</sup>, P Gonzalez Montaner<sup>2</sup>, E Abbate<sup>2</sup>, MC Sasiain<sup>1</sup>, S de la Barrera<sup>1</sup>

1 IIHema, Academia Nacional de Medicina, 2 Servicio de Neumonología, Hospital Muñiz, Buenos Aires, Argentina, 3 ANLIS-Malbrán

Los linfocitos T (LT) reguladores (Treg, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) controlan la respuesta inmune suprimiendo respuestas Th1 o Th2, T citotóxica (CTL) y NK. Controlarían el daño tisular provocado en el huésped, pero contribuirían al establecimiento de enfermedades infecciosas como la TB. Previamente demostramos que pacientes MDR-TB expandían Treg frente a distintas cepas *Mtb*. Nuestro objetivo fue evaluar el papel de Treg en la producción de citoquinas y actividad CTL inducidas por las cepas Muñiz (MDR,M) y H37Rv (Rv) en MDR-TB. Se estudiaron 7 pacientes MDR-TB y 7 controles sanos PPD+ (N). Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CM) y se deplecionaron de células CD25<sup>+</sup> por métodos magnéticos, incubándose 5 días con M o Rv. Se determinó la expresión intracitoplasmática de IL-10 e IFN $\gamma$  en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y degranulación en CD8<sup>+</sup> (expresión de CD107). En N, Rv y M indujeron baja expresión de IL-10 en CD4<sup>+</sup> (%IL10+, C=0.6 $\pm$ 0.1, Rv=1.5 $\pm$ 0.2, M=1.4 $\pm$ 0.2) y CD8<sup>+</sup> (C=0.8 $\pm$ 0.2, Rv=1.6 $\pm$ 0.3, M=1.2 $\pm$ 0.2) y alta expresión de IFN $\gamma$  en CD4<sup>+</sup> (%IFN $\gamma$ , C=1.8 $\pm$ 0.3, Rv=4.4 $\pm$ 0.7, M=3.9 $\pm$ 0.6) y CD8<sup>+</sup> (C=1.8 $\pm$ 0.6, Rv=2.4 $\pm$ 0.4, M=2.4 $\pm$ 0.4). En MDR-TB se observó alta expresión de IL-10 en CD4<sup>+</sup> (C=0.9 $\pm$ 0.2, Rv=2.1 $\pm$ 0.5, M=1.7 $\pm$ 0.4) y CD8<sup>+</sup> (C=0.9 $\pm$ 0.1, Rv=2.0 $\pm$ 0.3, M=1.9 $\pm$ 0.2) con menor expresión de IFN $\alpha$  en CD4<sup>+</sup> (C=1.0 $\pm$ 0.2, Rv=1.7 $\pm$ 0.3, M=1.6 $\pm$ 0.3) y CD8<sup>+</sup> (C=0.6 $\pm$ 0.1, Rv=1.2 $\pm$ 0.2, M=1.2 $\pm$ 0.2) MDR-TB vs N:  $p < 0.05$  en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y todas las cepas. La expresión de CD107 difirió en N y MDR-TB (N, % CD107:C=2.7 $\pm$ 0.4, Rv=10.2 $\pm$ 0.7, M=6.5 $\pm$ 0.6; MDR-TB: C=2.4 $\pm$ 0.4, Rv=8.5 $\pm$ 0.6, M=5.3 $\pm$ 0.7). En MDR-TB la depleción disminuyó IL-10 y aumentó IFN $\gamma$  en CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> y CD107 en CD8<sup>+</sup> frente a Rv y M. Los resultados sugieren que los

Treg no solo alterarían el balance entre IL-10 e IFN $\gamma$  sino que inhibirían la actividad CTL de CD8<sup>+</sup> en MDR-TB. Además, M indujo menor degranulación de CD8<sup>+</sup> que Rv aún en ausencia de Treg, tanto en N como en MDR-TB, lo que podría estar asociado a su carácter de cepa hipervirulenta.

**0247. (0667) LA FLAGELINA BACTERIANA RETRASA LA APOPTOSIS DE NEUTRÓFILOS.** Y Petracca<sup>1</sup>, G Salamone<sup>1</sup>, J Foxman Bass<sup>1</sup>, J Geffner<sup>1</sup>, M Rumbo<sup>2</sup>, ML Gabelloni<sup>1</sup>, K Nahmod<sup>1</sup>, MM Amaral<sup>1</sup>, M Vermeulen<sup>1</sup>, A Trevani<sup>1</sup>

1 IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, 2 Universidad Nacional de La Plata - UNLP

En este estudio examinamos la capacidad de la flagelina (Fg), un componente del flagelo bacteriano, de modular la sobrevivencia de los neutrófilos humanos. Con este fin, empleamos flagelina libre de LPS, purificada de *S. typhimurium* (Fg St) y de *B. cereus* (Fg Bc). Nuestros resultados indicaron que la Fg St inhibió la apoptosis espontánea de los neutrófilos luego de 24 hs de cultivo a concentraciones de 1 a 100 ng/ml, mientras que la Fg Bc inhibió la apoptosis espontánea sólo al ser empleada a 100 ng/ml (% de apoptosis evaluada por microscopía de fluorescencia (MF): 55 $\pm$ 9, 42 $\pm$ 11, 21 $\pm$ 5 and 18 $\pm$ 4, en presencia de Fg St 0, 1, 10 y 100 ng/ml, respectivamente; y 55 $\pm$ 9, 61 $\pm$ 11, 49 $\pm$ 15 y 21 $\pm$ 5 en presencia de Fg Bc 0, 1, 10 y 100 ng/ml respectivamente (n=6,  $p < 0,01$  Fg vs basal). Obtuvimos resultados similares cuando evaluamos la apoptosis cuantificando el % del células anexina V-FITC<sup>+</sup> por citometría de flujo. El efecto antiapoptótico de Fg St (10 ng/ml) y de la Fg Bc (100 ng/ml) fue evidenciado a las 24, 48 y 72 hs de cultivo (% apoptosis por MF a las 48 hs de cultivo: 87 $\pm$ 2, 62 $\pm$ 5 y 52 $\pm$ 4, basal, Fg St y Fg Bc, respectivamente,  $p < 0.05$  Fg vs basal). Experimentos adicionales realizados por western blot para evaluar las vías transduccionales activadas por la Fg St, revelaron que la misma induce degradación de I $\kappa$ B y fosforilación de Rel A, la activación de la vía PI3k/akt y de las MAPKs p38 y ERK1/2. No obstante, estudios realizados con inhibidores específicos de cada una de las vías, sugirieron que sólo la MAPK ERK1/2, y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B se encuentran involucrados en la inhibición de la apoptosis espontánea por Fg St. En conjunto, nuestros resultados indican que la Fg retrasa la apoptosis espontánea de neutrófilos. Este efecto podría ser relevante en el desarrollo de enfermedades inflamatorias asociadas a la presencia de bacterias flageladas que cursan con infiltración marcada de neutrófilos.

**0248. (0777) REGULACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS MICROGLIALES POR LIPOLISACÁRIDO E INTERLEUQUINA 4.** JA Soria, DS Arroyo, P Iribarren

CIBICI-CONICET. Departamento de Bioq. Clínica, Fac. de Cs. Químicas, UNC. Córdoba. Argentina

Las células microgliales (CM) ejercen un función importante en las respuestas inmuno-inflamatorias del sistema nervioso central. Estas células fagocitan a los microorganismos invasores y células dañadas, colaborando en la reparación tisular. Cuando las CM se activan de manera descontrolada, pueden inducir degeneración neuronal, como se ha observado en isquemias cerebrales, la enfermedad de Alzheimer, demencia asociada al SIDA, etc. La inducción de muerte de CM ha sido postulada como un mecanismo regulatorio importante de la activación microglial. No está claro cuál es el efecto de moléculas pro- y anti-inflamatorias sobre la supervivencia de CM. En este trabajo preliminar evaluamos el efecto de lipopolisacárido (LPS) e interleuquina 4 (IL-4) sobre la supervivencia de dos líneas celulares de microglia murina en cultivos en presencia o ausencia de suero. Observamos un aumento de la muerte celular dependiente del tiempo en células N9 cultivadas en ausencia de suero fetal mediante la prueba de exclusión del azul de tripán ( $p > 0.05$ ). Esto correlacionó con un aumento en la detección de células con menor dispersión de la luz e hipodiploides evaluadas por citometría de flujo. En presencia de suero, la estimulación con LPS incrementó la muerte de células N9, evaluada por citometría de flujo (% de cel. muertas: 15.9 $\pm$ 0.5

vs.  $5.3 \pm 0.8$ ;  $p < 0.0001$ ,  $n=5$ ). La estimulación con IL-4 no produjo cambios significativos en la proporción de CM muertas. Interesantemente, la preincubación con IL-4 disminuyó parcialmente la muerte celular inducida por LPS (% de cel. muertas:  $11.9 \pm 0.5$  vs.  $15.9 \pm 0.8$ ;  $p < 0.001$ ,  $n=5$ ). Estos resultados preliminares sugieren que la activación de CM con LPS induciría la muerte celular de las mismas, y además IL-4 actuaría como un factor de supervivencia. Estos efectos tendrían relevancia en la regulación de la activación de las CM, la cual participa de los eventos patogénicos en enfermedades neuroinflamatorias.

**0249. (0851) CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA INCREMENTAN LA PRODUCCIÓN DE IL-12 INDUCIDA POR LPS EN MACRÓFAGOS COLECTADOS DE PERITONEO INFLAMADO.** J Maggini, C Cañones, S Raiden, M Vermeulen, I Piazon, I Nepomnaschy, J Geffner

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

Evaluamos la influencia de células mesenquimales estromales de médula ósea (CM) sobre la actividad proinflamatoria de macrófagos. Las CM fueron obtenidas a partir de médula ósea de ratones C57BL/6J adultos, de acuerdo a protocolos convencionales. Las células totales de médula ósea fueron cultivadas por 48 hs, descartándose la fracción no adherente. Se cultivaron por 24 días adicionales, repiciándose posteriormente, empleando finalmente células correspondientes a los pasajes 5 a 9. Las células obtenidas mostraron ser negativas para marcadores de linaje hematopoyético y endotelial (CD3, CD14, CD16, CD19, CD56, CD45 y CD31) y positivas para SCA-1. Los macrófagos peritoneales (Mac) se obtuvieron a partir de ratones C57BL/6J, luego del tratamiento por vía i.p. con tioglicolato por 96 hs (pureza > 80%). En placas de 24 pozos, fondo plano, se establecieron monocapas de CM, añadiéndose 350000 Mac. Luego de 24 hs de cocultivo se observó una densidad similar de Mac en los cultivos realizados en ausencia o presencia de CM. Los cultivos fueron estimulados por 24 hs con LPS (30 ng/ml) evaluándose: a) producción de IL-12 en los sobrenadantes y b) fenotipo de los Mac por citometría de flujo. Encontramos que las CM indujeron un notorio incremento en la producción de IL-12 por Mac estimulados por LPS: concentración de IL-12 en los sobrenadantes (ng/ml) =  $0.27 \pm 0.1$ ,  $0.25 \pm 0.1$ ,  $1.0 \pm 0.3$  y  $6.9 \pm 2.2$ , para Mac, Mac + CM, Mac + LPS y Mac + CM + LPS, respectivamente. Observamos, por otra parte, un marcado incremento en la expresión de CD86 en Mac coincubados con CM (% incremento en la intensidad media de fluorescencia para CD86:  $62 \pm 26\%$  (Mac coincubados con CM vs Mac solos) y  $281 \pm 55\%$  (Mac coincubados con CM en presencia de LPS vs Mac incubados sólo con LPS). Contrastando con el usual perfil inmunosupresor mediado por CM descrito en la literatura, nuestros resultados sugieren que las CM son capaces de potenciar la actividad proinflamatoria de macrófagos activados.

**0250. (0504) MONOCITOS TRATADOS CON SLPI AUMENTAN LOS NIVELES DE IL-4, IL-6 E IL-10 E INHIBEN LA PROLIFERACION LINFOCITARIA INDUCIDA POR IL-2.** D Guerrieri<sup>1</sup>, P Maffia<sup>1</sup>, N Tateosian<sup>1</sup>, M Barbosa<sup>2</sup>, E Chuluyan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 3° Cátedra de Farmacología de la Facultad Medicina, UBA., <sup>2</sup> LANAIS Citometría de Flujo de la Facultad de Medicina UBA

Trabajos previos en nuestro laboratorio demostraron que el SLPI disminuye la proliferación de linfocitos T en modelos de cultivo mixto linfocitario. Sin embargo, este efecto del SLPI sobre la proliferación linfocitaria no se observa en ausencia de monocitos en el cultivo. El objetivo de este trabajo fue identificar que factores son producidos por los monocitos cuando son estimulados con SLPI. Para ello se aislaron monocitos humanos, a partir de sangre periférica, los cuales fueron tratados con SLPI (4 ug/ml, 3 días, 37°C) y se analizó el patrón de expresión de citoquinas en el sobrenadante de cultivo con el kit BDTM CBA Human Th1/Th2 II que permite medir los niveles de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  por citometría de flujo. La presencia de rhSLPI en el medio de cultivo de monocitos aumentó la expresión de IL-4 (de

$0.12 \pm 0.05$  a  $1.3 \pm 0.2$  ng/ml), IL-6 (de  $2.44 \pm 1$  a  $7.5 \pm 1.5$  ng/ml), e IL-10 (de  $0.04 \pm 0.01$  a  $0.57 \pm 0.2$  ng/ml) mientras que no se observó ningún efecto significativo en las otras citoquinas. Posteriormente, se evaluó la capacidad de los sobrenadantes de monocitos de inhibir la proliferación de linfocitos estimulado con IL-2 (8 ng/ml, 5 días, 37 °C), a través de la incorporación de timidina tritiada. Los resultados con los medios condicionados de monocitos pretratados con SLPI, mostró una disminución de la proliferación del 49 $\pm$ 10%. Finalmente, células mononucleares totales estimuladas con IL-2 (8 ng/ml, 5 días, 37 °C) fueron tratadas con IL-6 (10 ng/ml) e IL-10 (0,1 ng/ml) obteniéndose una disminución de la proliferación de un 74 $\pm$ 7%. En conjunto estos resultados indican que los monocitos tratados con SLPI producen citoquinas del perfil Th2 y disminuyen la linfoproliferación inducida por IL-2.

**0251. (0425) LAS LIPOPROTEÍNAS DE BRUCELLA ABORTUS PROMUEVEN LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.** A Zwerdling, KA Pasquevich, P Barrionuevo, C García Samartino, J Cassataro, GH Giambartolomei

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA). Laboratorio Inmunogenética, Hospital Clínicas (UBA)

La brucelosis es una enfermedad causada por la infección con bacterias del genero *Brucella* y se caracteriza por la persistencia bacteriana e inflamación de distintos tejidos (bazo, corazón, hígado, medula ósea, cerebro y articulaciones). Esta inflamación tisular es acompañada por un característico infiltrado celular con predominio de monocitos y neutrófilos. En un trabajo previo hemos demostrado que las lipoproteínas de *B. abortus* son las moléculas que le confieren a esta bacteria potentes propiedades inmunoestimuladoras mediadas por citoquinas en monocitos, pudiendo explicar la correlación entre la invasión tisular y la inflamación localizada. Esto nos llevó a preguntarnos si las lipoproteínas de *Brucella* también podrían afectar la respuesta de los neutrófilos. Por consiguiente, en el presente trabajo evaluamos la capacidad de *Brucella* y sus lipoproteínas de inducir la activación de neutrófilos humanos. Para ello, utilizamos *Brucella abortus* muerta por calor (HKBA) y la proteína Omp19 como modelo de lipoproteína de *Brucella*. Para determinar además el efecto del dominio lipídico en la actividad de dicha proteína, la misma fue utilizada tanto en su versión lipídada (L-Omp19) como no lipídada (U-Omp19). Tanto HKBA como L-Omp19 indujeron en forma dosis y tiempo dependiente las respuestas características de la activación temprana y tardía de neutrófilos, como son la disminución de la expresión de la L-selectina CD62L, el aumento de la expresión de CD11b/CD18 y la producción de IL-8. Dicha activación resultó ser dependiente del dominio lipídico de la proteína, siendo U-Omp19 incapaz de inducir estos cambios. Asimismo el LPS de *Brucella* fue incapaz de mediar la activación de neutrófilos. Estos resultados demuestran que las lipoproteínas de *Brucella* son capaces de inducir la activación de neutrófilos mediada por HKBA y refuerzan el rol de estas moléculas como factores cruciales en la patogénesis de la inflamación en brucelosis.

**0252. (0429) LA APOPTOSIS DE ASTROCITOS MURINOS INDUCIDA POR B. ABORTUS INVOLUCRA SUS LIPOPROTEÍNAS Y ES MEDIADA POR TNF- $\alpha$ .** C García Samartino<sup>1</sup>, KA Pasquevich<sup>1</sup>, S DiGenaro<sup>2</sup>, P Barrionuevo<sup>1</sup>, A Zwerdling<sup>1</sup>, J Cassataro<sup>1</sup>, GH Giambartolomei<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA). Laboratorio Inmunogenética, Hospital Clínicas (UBA), <sup>2</sup> Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia Universidad Nacional de San Luis (UNSL)

La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella*. El síntoma característico de la neurobrucelosis es la inflamación en el sistema nervioso central originada por la invasión de *Brucella*. Dicha respuesta inflamatoria puede llevar a la astrogliosis induciendo apoptosis de los astrocitos. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que *B. abortus* es capaz de inducir la producción de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ ) en astrocitos y que las lipoproteínas serían uno de los com-

ponentes responsables de estas respuestas. En este trabajo evaluamos la capacidad de *B. abortus* y sus componentes para inducir apoptosis en astrocitos. A partir de cerebro de ratones C57BL/6 se obtuvieron cultivos primarios de astrocitos. Estos se estimularon durante 24 h con *B. abortus* muerta por calor (HKBA), LPS de *B. abortus* (LPSb) y una lipoproteína modelo de *B. abortus* (Omp19), lipidada (L) y no lipidada (U). Como control se utilizaron TNF- $\alpha$ , un lipoheptapéptido sintético (Pam<sub>3</sub>cys) y paraformaldehído (PFA). La apoptosis fue evaluada por citometría de flujo y por microscopía de inmunofluorescencia mediante la técnica de AnexinaV/PI. HKBA indujo apoptosis en forma dosis dependiente, mientras que LPSb no produjo tal efecto. Tanto Omp19L como Pam<sub>3</sub>cys indujeron apoptosis, dado que Omp19U no lo hizo, la porción lipídica sería la responsable de la apoptosis. También determinamos el mecanismo involucrado en la apoptosis. Para ello, se obtuvieron cultivos primarios de astrocitos de ratones TNFR<sup>-/-</sup>. A diferencia de lo observado en los astrocitos de ratones C57BL/6, en las células de los ratones TNFR<sup>-/-</sup> no se observó apoptosis con ninguno de los tratamientos excepto con PFA. Estos resultados demuestran que *B. abortus* y sus lipoproteínas de son capaces de inducir apoptosis en astrocitos, que la porción lipídica de las lipoproteínas es la responsable y que el mecanismo que media dicha respuesta involucra al TNF- $\alpha$ .

**0253. (0546) CARACTERIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS QUE RECONOCEN PEPTIDOGLICANOS (PGRPS).** MC De Marzi<sup>1</sup>, B Ganem<sup>1</sup>, MM Fernández<sup>1</sup>, AB Bauer<sup>1</sup>, Q Wang<sup>2</sup>, S Cho<sup>2</sup>, RA Mariuzza<sup>2</sup>, EL Malchiodi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> IDEHU- CONICET, Cátedra de Inmunología Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA, <sup>2</sup> CARB-UMBI Maryland USA

Las PGRPs son receptores de PAMPs capaces de reconocer peptidoglicanos (PGN). Poco se sabe sobre su localización y los mecanismos en los que están involucradas. PGRP-S de ratón actuaría en la destrucción intracelular de bacterias por PMNs, mientras que PGRP-L es capaz de hidrolizar a los PGNs. Con el fin de detectar las PGRPs en muestras humanas y estudiar su rol biológico construimos plásmidos que codifican para las 4 PGRPs (PGRP-S, -I $\alpha$ , -I $\beta$  y -L). Expresamos, replegamos *in vitro* y purificamos PGRP-S e -I $\alpha$ ; y obtuvimos antisueros policlonales específicos para ambas moléculas. Mediante inmunoprecipitación e inmunoblotting, detectamos la presencia de dímeros de PGRP-S en suero y saliva. Comprobamos la existencia de PGRP-S en PMN humanos y, mediante ensayos de inducción de la degradación, observamos que se secretaba un dímero formado por la oxidación de Cys libres en la superficie del monómero. Se postula que las PGRPs solubles son bactericidas y actuarían como conectores uniendo PGN y algún receptor para la inducción de señales intracelulares. Para estudiar la presencia de esos receptores en células mononucleares se realizó Citometría de flujo agregando PGRP-S e I $\alpha$  a linfocitos y monocitos de sangre periférica y de cultivo, y detectando su unión con los Acs específicos. Se observó un incremento en la intensidad media de fluorescencia en linfocitos de 1.74 y 4.08 veces, y en monocitos de 1.66 y 2.11 veces para PGRP-S e I $\alpha$ , respectivamente. Por Immunoblotting y realizando ensayos de unión en presencia de glutaraldehído, se observó que PGRP-S coprecipitaba con una molécula proveniente de los monocitos de ~10 kDa. Basándonos en lo descrito podemos concluir que PGRP-S humana sería un dímero natural que es expresado en PMN como una proteína de 45 kDa, que es secretada al medio cuando el PMN degranula. Los resultados preliminares sugieren que PGRPs reconocería un receptor en la superficie celular de los monocitos.

**0254. (0831) PRODUCCIÓN DE IL-6 EN QUERATINOCITOS: IMPLICANCIA DE DOPAMINA Y RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS.** B Ganem, T Gentile, E Malchiodi, E Rey

IDEHU Dr R.A.Margni- CONICET- Cátedra de Inmunología - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA

Se ha demostrado que agonistas dopaminérgicos y antagonistas de los receptores  $\beta$  - adrenérgicos favorecen la cicatrización

de la piel. Teniendo en cuenta que la IL-6 promueve la proliferación de los queratinocitos de la epidermis y que además sintetizan y expresan receptores para catecolaminas, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de dopamina (DA) sobre la secreción de IL-6 en una línea celular no tumoral de queratinocitos humanos (HaCaT) en presencia y ausencia de bloqueantes  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos y dopaminérgicos. La dopamina (10<sup>-5</sup> y 10<sup>-4</sup> M) estimula significativamente la producción de IL-6 luego de 24 h de cultivo: 417.8 $\pm$ 30.1 y 532.1 $\pm$ 55.0 % respectivamente vs control, p<0.001. El efecto es bloqueado por propranolol (PROP), antagonista  $\beta$ -adrenérgico, (DA 10<sup>-5</sup> + PROP 10<sup>-4</sup>: 154.0 $\pm$ 14.4%, p<0.001, DA 10<sup>-5</sup>+ PROP 10<sup>-5</sup>: 110.8 $\pm$ 3.2%, p< 0.01 vs DA 10<sup>-5</sup>, ns vs control) y también por haloperidol (HAL) en forma dosis-dependiente (DA 10<sup>-5</sup> + HAL 10<sup>-4</sup>: 203.3 $\pm$ 49.2%, p<0.001 vs DA 10<sup>-5</sup>, p< 0.05 vs control; DA 10<sup>-5</sup> + HAL 10<sup>-5</sup>: 458.9 $\pm$ 57% ns vs DA 10<sup>-5</sup>, p< 0.001 vs control). En cambio, la fentolamina (FENT), antagonista  $\alpha$ -adrenérgico, no tuvo efecto bloqueante observándose incluso un efecto aditivo: FENT 10<sup>-4</sup>: 161.7 $\pm$ 1.8%, DA 10<sup>-5</sup> + FENT 10<sup>-4</sup>: 573.2 $\pm$ 64.3% p<0.05 vs FENT 10<sup>-4</sup>, DA 10<sup>-5</sup> y control. Además determinamos la proliferación celular por incorporación de H<sup>3</sup>-timidina encontrando que sólo HAL 10<sup>-4</sup> disminuyó la proliferación de los queratinocitos (40%). **Conclusión:** En nuestras condiciones de trabajo no se observó proliferación de los queratinocitos por acción de DA pero sí un aumento de IL-6 mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos y dopaminérgicos de tipo D2, sin compromiso de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos. (PIP-CONICET 5503, 05/06, ANPCyT- PICT12693, UBA B094).

**0255. (0509) PRESENCIA DE NEUTRÓFILOS EN TEJIDO LINFÁTICO SECUNDARIO: REQUERIMIENTO DE RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA HUMORAL.** C Gorlino, B Maletto, R Ranocchia, M Liscovsky, S Zamory, G Morón, MC Pistoresi

CIBICI (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, UNC, Córdoba, Argentina

Previamente demostramos que en animales inmunizados con OVA más adyuvante de Freund completo (OVA/CFA) e inyectados en la almohadilla plantar con OVA-FITC, los neutrófilos (Ne) son la principal célula OVA-FITC+ reclutada en los ganglios linfáticos drenantes (LN). En este trabajo demostramos que Ne/OVA-FITC+ sólo están presentes en LN si una respuesta inmune específica está instalada y analizamos el requerimiento de la respuesta humoral y/o celular contra OVA en el desarrollo de este infiltrado. Se emplearon ratones inmunizados s.c. con PBS/CFA u OVA/CFA en los días 0 y 15 y las siguientes estrategias: a) para estudiar si una respuesta específica humoral es requerida, ratones PBS/CFA fueron inyectados i.p. en el día 25 y 26 con suero inmune o IgG purificada a partir de suero de animales OVA/CFA (grupos I y II) o con suero no-inmune o IgG purificada de suero no-inmune (grupos control III y IV). Estos cuatro grupos de animales fueron inyectados (día 27) en la pata con OVA-FITC y a las 6 horas se evaluó la presencia de Ne/OVA-FITC+ en LN. Los resultados se expresan como % de células OVA-FITC+ en la población de Ne, grupo I: 79 $\pm$ 4, grupo II: 36 $\pm$ 6, grupo III: 6 $\pm$ 2, grupo IV: 18 $\pm$ 2; p<0,05 (grupo I vs III) y p<0,05 (grupo II vs IV). b) para estudiar si una respuesta específica de células T es requerida, ratones OVA/CFA fueron inyectados i.p. en los días 23, 24 y 25 con anticuerpo anti-CD4 (problema) o con anticuerpo no relacionado (control). Estos animales fueron inyectados en la pata con OVA-FITC (día 26), 6 horas más tarde se evaluó la presencia de Ne/OVA-FITC+ en LN. Los resultados se expresan como % de Ne (el 100% de los Ne son OVA-FITC+) en la población total de LN; problema: 54 $\pm$ 7, control: 56 $\pm$ 1; p>0,05. Estos resultados nos permiten concluir que el desarrollo del infiltrado de Ne/OVA-FITC+ en LN requiere una respuesta inmune específica humoral, no así una respuesta específica de células T (al menos de CD4+).

**0256. (0791) LOS GRANULOCITOS EOSINÓFILOS INDUCEN LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.** S Raiden<sup>1</sup>, J Maggini<sup>1</sup>, A Ceballos<sup>2</sup>, J Sabatté<sup>2</sup>, E Gaddi<sup>3</sup>, J Balbaryski<sup>3</sup>, M Vermeulen<sup>1</sup>, J Geffner<sup>1</sup>

1 IHEMA, Academia Nacional de Medicina, 2 Centro Nacional de Referencia de SIDA (CNRS), Fac. Medicina, UBA., 3 Hospital General de Niños Dr Pdero de Elizalde, División Inmunología Clínica

Las células dendríticas (CDs) cumplen un papel crítico en la inmunidad adaptativa merced a su capacidad, única entre las células presentadoras de antígeno, de activar linfocitos T CD4+ naive, poniendo en marcha la inmunidad adaptativa. El origen de las CDs in vivo no ha sido aún definido con claridad. En el presente trabajo describimos la capacidad de los eosinófilos de inducir "in vitro" la diferenciación de monocitos en CDs. Los granulocitos eosinófilos fueron purificados a partir de la fracción de los granulocitos, por selección negativa, mediante el empleo de anticuerpos anti-CD16 inmovilizados a perlas magnéticas. Los monocitos fueron purificados a partir de la fracción de células mononucleares periféricas, por selección positiva, mediante el empleo de anticuerpos anti-CD14 inmovilizados a perlas magnéticas. Para ambas poblaciones celulares, su pureza fue superior al 90%. Los eosinófilos y monocitos fueron cultivados por 18 hs (relación 1:1), analizándose el fenotipo de los monocitos por citometría de flujo. Los monocitos incubados con eosinófilos mostraron una pérdida dramática en la expresión de CD14. En efecto, el 75 ± 15% de los monocitos perdieron completamente la expresión de CD14 (n = 7), mientras que los monocitos restantes mostraron, en todos los casos, una marcada disminución en la expresión de CD14. Por otra parte, estos monocitos mostraron una expresión incrementada de HLA-DR (% incremento en la intensidad media de fluorescencia = 79 ± 22), de CD83 (45 ± 13%), y de CD86 (66 ± 16%) (n=7, p<0.01 vs monocitos cultivados en ausencia de eosinófilos). Por otra parte, el 75 ± 24 % de los monocitos cultivados con eosinófilos mostraron ser positivos para la expresión de CD1a (n=6). Los resultados mostrados sugieren que los eosinófilos son capaces de inducir la rápida diferenciación de monocitos en células que expresan un fenotipo propio a CDs.

**0257. (0807) LA AUSENCIA DE RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II COMPROMETE LA GENERACIÓN, FENOTIPO Y FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS.** K Nahmod<sup>1</sup>, M Vermeulen<sup>1</sup>, J Geffner<sup>1</sup>, T Walther<sup>2</sup>

1 IHEMA, Academia Nacional de Medicina, 2 Medizinische Klinik II - Kardiologie und Pulmologie (CBF), Hospital Benjamin Franklin, Berlin, Alemania

Habíamos demostrado que la angiotensina (All) controla el proceso de diferenciación de células dendríticas (CD) humanas a partir de sus precursores mediante un loop autócrino/parácrino. El bloqueo de los receptores AT1 (R-AT1) comprometió la funcionalidad de las CD obtenidas, mientras que el bloqueo de los R-AT2 o el añadido de All resultó en la producción de CD dotadas de una funcionalidad incrementada, respecto de las CD controles. Resultaba interesante estudiar el fenotipo de las CD provenientes de ratones deficientes en receptores de All. Con este objetivo, trabajamos con ratones deficientes en los R-AT1a (—/—), R-AT1b (—/—) y DKO-AT1 (—/—). Las CD fueron obtenidas a partir del cultivo de precursores de médula ósea de ratones salvajes o bien deficientes para los receptores AT1a y/o AT1b durante 6 días en presencia de rmGM-CSF (200 U/ml) para analizar luego su fenotipo por citometría de flujo. Al comparar los resultados obtenidos en los cuatro genotipos analizados: WT (+/+), AT1ako (—/++), AT1bko (—/—) y DKO-AT1 (—/—) observamos lo siguiente en los cultivos provenientes de precursores deficientes para el R-AT1: a) una disminución significativa (p<0.05) en el porcentaje de células positivas para IA/IE y CD11c, b) una menor expresión de IA/IE (1304 ± 50 vs 1040 ± 132 vs 705 ± 106 vs 735 ± 117) y CD11c (101 ± 2.8 vs 49 ± 4.3 vs 89 ± 11 vs 63 ± 8.5) (intensidad media de fluorescencia ± ES, n=10, p<0.01, para WT, AT1ako, AT1bko y DKO, respectivamente). Al analizar la funcionalidad de las CD diferenciadas a partir de precursores hemopoyéticos deficientes en los R-AT1 observamos un severo compromiso en su capacidad aloestimulatoria (29220 ± 777, 12540 ± 2042, 17840 ± 2652, 11650 ± 2226 media cpm ± ES, n=10, p<0.01, para WT, AT1ako, AT1bko, DKO-AT1, respectiva-

mente). Estos resultados demuestran que la ausencia de receptor AT1 de angiotensina II compromete severamente la generación, fenotipo y funcionalidad de CD murinas.

**0258. (0836) EFECTO DE LA GLIADINA SOBRE LA MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS.** L Guillén, N Periolo, M Barboza, A Cherñavsky

Hospital de Clínicas "José de San Martín"

**Introducción:** La gliadina, disparadora de daño tisular en la enfermedad celíaca (EC), posee efectos directos sobre células de respuesta innata (macrófagos, monocitos: Mo, células dendríticas: CDs) cuyos perfiles de expresión de moléculas coestimuladoras determinan su potencial interacción con LT, LB, células NK, etc. La funcionalidad de SLAM (Molécula de Señalización y Activación Linfocitaria) en las CDs es dependiente del tipo de estímulo de maduración y condiciona la respuesta inmune. **Objetivos:** 1-Inducir la diferenciación/activación in vitro de CDs en presencia de gliadina (gTG) y 2-Evaluar el efecto de gTG sobre la expresión de SLAM en CDs. **Material/Métodos:** Obtuvimos Mo (n=6 individuos sanos) por purificación secuencial en gradientes de Ficoll-Hypaque y Percoll a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) provenientes de "buffy coats" y los incubamos por 5 días en presencia de GM-CFS(800U/ml) e IL-4(2ng/ml) como inductores de diferenciación a CDs inmaduras (Cdl). El antígeno específico gTG fue preparado por digestión de gliadina cruda (Sigma) con  $\alpha$ -chemotripsina en urea 2M, tratado con transglutaminasa tisular (tTG) y controlada su contaminación por LPS. Las CDs se activaron en presencia de gTG (100 y 250 ug/ml), LPS (1ug/ml), urea 2M, zeína (100 ug/ml) y RPMI. Se realizó marcación triple de las CDs con monoclonales anti-SLAM FITC, -CD11c PerCP y -CD83 PE. Se utilizó el test de Mann-Whitney (dos colas) para los análisis estadísticos. **Resultados:** La intensidad de fluorescencia media (IFM) en CDs para SLAM disminuyó en presencia de gTG (p=0.004 vs. cultivo con urea; p=0.036 vs. RPMI y p= 0.03 vs. cultivo con zeína) mientras que la IFM para CD83 fue mayor con gTG (p= 0.040 vs. urea, p= 0.043 vs. RPMI y p= 0.030 vs zeína. **Conclusiones:** Demostramos modulación negativa de SLAM por gliadina en CDs, la cual potencialmente interferiría durante la interacción de las CDs con diferentes células del sistema inmune, particularmente en el contexto de la EC.

**0259. (0350) PSG1A INSTRUYE A CÉLULAS DENDRÍTICAS HACIA UN FENOTIPO INDUCTOR DE TH17.** FF Martínez<sup>1</sup>, CP Knubel<sup>1</sup>, MC Miceli<sup>2</sup>, CC Motran<sup>1</sup>

1 Fac. Cs. Químicas. Dpto. Bioq. Clínica. CIBICI-CONICET. UNC, 2 Dept. of MIMG. UCLA

PSG1a, la principal isoforma de PSG en la circulación materna durante el embarazo, es capaz de modular el metabolismo y activación de monocitos. Considerando que las células dendríticas (CD) son las principales iniciadoras e instructoras de respuesta inmune (RI) adaptativa, el objetivo de este estudio fue determinar si PSG1a actúa sobre CD condicionando la RI específica. Se evaluaron los niveles de citoquinas liberadas al sobrenadante de cultivo y la expresión de marcadores de superficie en CD derivadas de médula ósea de ratones BALB/c incubadas por 18 con rec-PSG1a (PSG-CD) o sobrenadante control (c-CD). rec-PSG1a indujo un aumento en la producción de IL-6 (p<0.002) e IL12 (p<0.03) mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión de los marcadores de activación MHC-II, CD80, CD86, LFA-1 y CD40 ni en los niveles de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-23. Posteriormente evaluamos la participación de PSG-CD en la instrucción de la RI específica "in vitro" e "in vivo". PSG-CD o c-CD fueron cultivadas con Li T CD4+ purificados de bazo de ratones DO11.10 marcados o no con CFSE (relación T:CD=7.7) en presencia de 1  $\mu$ M del péptido OVA323-339. Luego de 96 hs. de cultivo se determinó la proliferación celular, la presencia de células CD4+INF- $\gamma$ +, CD4+IL-4+ y los niveles de IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , IL-17, TGF- $\beta$  e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo. PSG-CD fueron capaces de generar Li T capaces de secretar mayores niveles de IL-6 (p<0.05) e IL-17 (p<0.03) y menores niveles de IL-10 (p<0.03)

que los Li cultivados con c-CD mientras que no se observaron diferencias significativas en los otros parámetros estudiados. Finalmente observamos que la inmunización de ratones BALB/c previamente transferidos con LiT de ratones DO11.10 con PSG-CD pulsadas con el péptido OVA323-339 fue capaz de inducir LiT que secretan mayores niveles de IL-17 ( $p < 0.04$ ) que los de los animales inmunizados con c-CD. Concluimos que PSG1a instruye CD hacia un fenotipo inductor de Th17.

**0260. (0404) EVALUACION DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE Y LA FAGOCITOSIS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO DE LOS GLOBULOS ROJOS.** M Luján<sup>1</sup>, A Rucci<sup>1</sup>, C Cotorruelo<sup>1,2</sup>, S García Borrás<sup>1</sup>, L Racca<sup>1</sup>, I Acosta<sup>1</sup>, C Biondi<sup>1</sup>, A Racca<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR., <sup>2</sup> CONICET, <sup>3</sup> CIUNR

En el envejecimiento del glóbulo rojo (GR) participan mediadores bioquímicos e inmunológicos que no han sido totalmente dilucidados. Las modificaciones más frecuentes de biomoléculas de membrana resultan de su oxidación por especies reactivas del oxígeno que son depuradas por sistemas antioxidantes. Los GR Senescentes (GRSe) son eliminados por la circulación por las células fagocíticas mononucleares. El objetivo de este trabajo fue investigar la respuesta antioxidante y la fagocitosis durante el envejecimiento del GR. Las muestras de sangre periférica ( $n=15$ ) de dadores voluntarios, fueron centrifugadas en gradientes de Percoll para obtener poblaciones de GRSe y GR Jóvenes (GRJ). Se evaluó esta separación analizando el Volumen Corpuscular Medio (VCM). Se determinó la actividad de meta hemoglobina-NADH-reductasa unida a membrana (MHRm) y de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) por métodos espectrofotométricos. Se realizó el ensayo de eritrofagocitosis para determinar el % de monocitos activos (MA). En el análisis estadístico se utilizó la t de student para muestras apareadas. El VCM de los GRSe ( $87.03 \pm 1.76$  fL) significativamente menor al obtenido con GRJ ( $89.77 \pm 2.42$  fL) ( $p < 0.001$ ) demostró la eficacia del método de separación utilizado. Las actividades de MHRm y de G6PD en GRSe ( $450.25 \pm 32.39$  UHbi-R/mgProt;  $5.01 \pm 1.99$  UIG6PD/gHb) fueron menores a las observadas en GRJ ( $488.00 \pm 42.39$  UHbi-R/mgProt;  $7.78 \pm 1.45$  UIG6PD/gHb) ( $p < 0.005$ ). Los % de MA en GRSe ( $17 \pm 1.6$ ) fueron significativamente mayores a los obtenidos en GRJ ( $3 \pm 1.3$ ) ( $p < 0.0001$ ). Estos hallazgos indican que en los GRSe la disminución en la capacidad antioxidante incrementaría la alteración de las moléculas de membrana favoreciendo su interacción con las células fagocíticas.

**0261. (0765) ESTUDIO DE TGF- $\beta$ 1 Y EL RECEPTOR DE IL-8 EN ÚLCERAS CRÓNICAS DE PACIENTES CON PIE DIABÉTICO Y DE PACIENTES NO DIABÉTICOS CON ÚLCERAS CRÓNICAS DE MIEMBROS INFERIORES.** M Rachid<sup>1</sup>, N Gobbato<sup>1</sup>, L Olea<sup>2</sup>, P Valdecantos<sup>3</sup>, M Peral de la Torre<sup>4</sup>, M Huaman Martínez<sup>5</sup>, JC Valdez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología. Universidad Nacional de Tucumán, <sup>2</sup> Hospital Angel C. Padilla, Sala de Cirugía Ortopédica y Traumatología., <sup>3</sup> Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología. Universidad Nacional de Tucumán, <sup>4</sup> Cátedra de Biología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Tucumán., <sup>5</sup> Hospital Centro de Salud Zenón Santillán, Sección de Quemados

La microangiopatía, la disfunción de los leucocitos y las infecciones impiden la reparación tisular en el pie diabético. El factor transformante del crecimiento  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) y el receptor de IL-8 son dos parámetros estudiados en dicha reparación. El TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de componentes de la matriz extracelular y la IL-8 es quimiotáctica para leucocitos e interviene en la epitelización y angiogénesis. **Objetivo:** Estudiar comparativamente la expresión del receptor de IL-8 y TGF- $\beta$ 1 en células del lecho ulceroso de pie diabético con las obtenidas de úlceras crónicas

de miembros inferiores de pacientes no diabéticos, usando como control polimorfonucleares de sangre circulante (PMN) de sujetos sanos. **Materiales y Métodos:** Pacientes de 50 a 80 años: 6 pacientes con diabetes tipo II, con pie diabético (PD) y 5 pacientes con úlcera de miembros inferiores no diabéticos y tratados con aplicación tópica de *Lactobacillus plantarum* con franca manifestación de reparación tisular (U). Biopsias: obtenidas del lecho de la úlcera. Una parte fue destinada a estudios bacteriológicos, otra destinada a estudiar la expresión del gen que codifica para el TGF- $\beta$ 1 por RT-PCR semicuantitativa y otra fue digerida enzimáticamente y en la suspensión celular se determinó viabilidad y expresión de IL-8R por citometría de flujo. IL-8R fue determinada solo en muestras de pie diabético. Los PMN fueron obtenidos por Ficoll-Hypaque y dextrano al 6%. Las células fueron mantenidas en RPMI-1640+SBF al 10%. **Resultados:** Bacteriología: se aisló *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. La densidad relativa TGF- $\beta$ 1/b-Actina: PMN= 0,80; U= 0,64 vs PD= 0,32  $p < 0.0005$ . Viabilidad: PMN= 98%, PD= 87%, U= 91%. Células positivas para IL-8R: PMN= 89% vs PD= 1,5%  $p < 0.0001$ , U= no determinadas. **Conclusiones:** Una severa disminución de TGF- $\beta$ 1 y de IL-8R se correlaciona con una gran resistencia a la reparación tisular en el pie diabético en comparación a las úlceras donde el TGF- $\beta$ 1 es similar al expresado por los PMN.

**0262. (0670) ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INNATA DESENCADENADA POR UN PATÓGENO DE VÍAS RESPIRATORIAS HOY CONSIDERADO RE EMERGENTE.** G Moreno<sup>1</sup>, R Roberts<sup>2</sup>, M Rumbo<sup>1</sup>, D Hozbor<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune Fac Cs Exactas UNLP, <sup>2</sup> Instituto de Bioquímica y Biología Molecular Fac Cs Exactas UNLP

Bordetella pertussis es el principal agente causal de la tos convulsa que afecta preferentemente a niños. Si bien con el uso masivo de la vacunación la morbi-mortalidad de esta enfermedad ha disminuido significativamente, en las últimas décadas se ha registrado una resurgencia de la enfermedad aún en zonas con alta cobertura de vacunación. Las divergencias entre las cepas vacunales y la población bacteriana circulante podría explicar la disminución en la eficiencia de la cobertura de la vacunación. El objetivo del presente trabajo es analizar la respuesta inmune innata en el pulmón, desencadenada por la infección con distintas cepas de B. pertussis. Para estos estudios se empleó una cepa vacunal (Bp Tohama) y un aislamiento clínico local (Bp 006). Se incluyó en el análisis la comparación entre bacteria viva y muerta. Se utilizaron cinco ratones por condición, los cuales recibieron vía IN los distintos estímulos (107UFC/50  $\mu$ l). A 2 y 8 hs post-inoculación los ratones fueron sacrificados para cuantificar los marcadores de respuesta innata en pulmón mediante la técnica de qRT-PCR. Mediante esta técnica se pudo observar que a las 2 hs postinoculación la expresión de los marcadores analizados fue superior en el caso de la activación con B. pertussis tohama viva respecto de los obtenidos con PBS: CCL20:  $9.21 \pm 2.7$  vs  $1.26 \pm 0.68$ ; TNFa:  $37.8 \pm 20$  vs  $1.02 \pm 0.48$ ; IL6:  $65 \pm 22$  vs  $1.01 \pm 11$ . Para esta cepa no se observaron diferencias entre el estado vivo o muerto. Llamativamente cuando se analizó la expresión de genes en la cepa local hubo un incremento significativo de los valores obtenidos con bacteria muertas respecto a los valores obtenidos con bacterias vivas (ej: IL6:  $80 \pm 30$  vs  $20 \pm 10$ ). Este trabajo evidencia que existe una respuesta diferencial en la respuesta inmune innata en mucosas según la cepa de B. pertussis utilizada, pudiendo atribuirse este efecto a diferencias en la capacidad de las distintas cepas en interferir con la respuesta innata en el momento de la infección.

**0263. (0565) LARREA DIVARICATA CAV: PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE TNF-ALFA Y DE ZIMOSAN.** R Davicino<sup>1</sup>, C Martínez<sup>1</sup>, Y Casali<sup>2</sup>, A Mattar<sup>1</sup>, E Saidman<sup>3</sup>, S Correa<sup>4</sup>, B Micalizzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, <sup>2</sup>

*Cátedra de Ensayo y Valoración de Medicamentos. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, 3 Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos. Universidad Nacional de San Luis, 4 Inmunología, CIBICI (CONICET), Universidad Nacional de Córdoba.*

*L. divaricata* Cav. (jarilla) es una planta ampliamente usada en medicina popular en Argentina. Se le atribuyen muchos efectos "curativos" aunque son escasas las publicaciones que los corroboren. Hemos comprobado que la decocción (D) de jarilla (0.5 mg/kg) induce, "in vivo", la activación de macrófagos murinos (M) aumentando la producción de anión superóxido ( $O_2^-$ ). El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de TNF- $\alpha$  y de  $O_2^-$  y, la expresión de receptores de zimosan y TNF- $\alpha$ . Ratonos Rockland fueron tratados con 2 dosis de D(0.5 mg/kg) o PBS a intervalos de 48 h. Posteriormente los M se incubaron 24 h con D (0.1 mg/ml) y se trataron con: 1) zimosan-FITC, 2) zimosan opsonizado (opz) 3) Acs anti-dectina-1(2A11), 4) Cadmio (1mM) (inhibidor NADPH oxidasa) o Barbitol + Malonato y 5) peróxido de hidrógeno (2 mM) (inhibidor de CuZnSOD). Se determinó la reducción de NBT y de MTT; la producción de TNF- $\alpha$  (ELISA) y expresión de receptores de zimosan utilizando zimosan-FITC y de TNF- $\alpha$  usando TNF- $\alpha$  y anti-TNF- $\alpha$ . Los resultados mostraron que D aumentó la producción de TNF- $\alpha$  ( $p \leq 0.03$ ), la expresión de sus receptores ( $p = 0.002$ ) y de los de zimosan. Los Acs 2A11 inhibieron la producción de  $O_2^-$  en los M tratados con D y opz respecto a los grupos controles ( $p = 0.0037$ ) y no afectaron la producción del anión en M tratados con D. Cadmio inhibió la producción de  $O_2^-$  en M tratados con D y opz ( $p = 0.01$ ). Malonato y barbitol disminuyeron la producción de  $O_2^-$  ( $p = 0.008$ ) y la reducción de MTT ( $p = 0.009$ ), respecto al grupo de M tratados con D. El  $H_2O_2$  no modificó la producción de  $O_2^-$  respecto al grupo tratado con D + opz. Estos resultados confirman que D de *L. divaricata* Cav. a 0.5 mg/kg estimula la producción de TNF- $\alpha$  y la expresión, en M, de receptores de TNF- $\alpha$  y de zimosan. Estos resultados permiten inferir que D estimularía la producción de  $O_2^-$  a través de una vía mitocondrial y podría, por otra parte, inhibir la actividad de la CuZnSOD.

**0264. (0797) ANGIOTENSINA II INDUCE LA ACTIVACIÓN DE NF-KB EN CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS.** K Nahmod<sup>1</sup>, Y Petracca<sup>1</sup>, G Salamone<sup>1</sup>, C Cañones<sup>1</sup>, N Fernández<sup>2</sup>, S Raiden<sup>1</sup>, A Trevani<sup>1</sup>, J Geffner<sup>1</sup>

*1 IHEMA, Academia Nacional de Medicina, 2 LEGMA, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*

La angiotensina II (AII), el principal péptido efector del sistema angiotensinogénico (RAS), ejerce numerosos efectos citoquinámicos fundamentalmente a través del R-AT1 (receptor AT1) y es capaz de activar múltiples y diversas vías de señalización, transactivar receptores de factores de crecimiento y promover la formación de especies reactivas del oxígeno entre otras respuestas proinflamatorias. En trabajos previos demostramos que la AII era capaz de controlar el proceso de diferenciación de células dendríticas (CD) mediante un loop autócrino. Al estudiar la expresión de los receptores AT1 y AT2 en CD estimuladas con LPS o TNF- $\alpha$  observamos que ambos estímulos inducían un aumento en la expresión del R-AT1. Estudiamos entonces si la AII induce la maduración de CD diferenciadas. Para ello obtuvimos CD por cultivo de monocitos con IL-4+GM-CSF durante 6 días que fueron luego estimuladas por 48 hs con AII (10-6M-10-9M), evaluándose su fenotipo por citometría de flujo. El tratamiento con AII no indujo cambios en la expresión de HLA-DR, CD40, CCR7, CD80 o CD83 ni resultó en la modulación de su capacidad endocítica. No observamos tampoco un efecto sinérgico de la AII con dosis subóptimas de LPS o con CD40L. Sin embargo, la AII estimuló significativamente la capacidad aloestimuladora de las CD, evaluada a través de ensayos de cultivo mixto linfocitario (10.324  $\pm$  1764 vs 16.876  $\pm$  1342 cpm, media  $\pm$  ES, n=4,  $p < 0.05$ ). Analizamos entonces las cascadas transduccionales potencialmente involucradas en dicho proceso. Observamos, mediante western blot, que la AII indujo la degradación de la proteína I $\kappa$ B- $\alpha$ , marcador

indirecto de la activación de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción clave en la respuesta inmune, así como la fosforilación de p38 MAPK y c-jun. Describimos así un nuevo mecanismo inmunorregulatorio mediado por AII, capaz de explicar parcialmente algunos de los efectos terapéuticos inesperados en los antagonistas del RAS.

## ONCOLOGÍA IV

**0265. (0469) IMPLICANCIA DE LAS QUINASAS AKT Y ERK1/2 EN LA ADQUISICIÓN DE HORMONO-INDEPENDENCIA EN UN CARCINOMA MAMARIO MURINO INDUCIDO POR MEDROXIPROGESTERONA.** MV Arnoni, J Bolado, P Do Campo, C Lanari, V Novaro

*Inst. de Biología y Medicina Experimental -IByME- Bs. As.*

La adquisición de independencia hormonal es un evento crucial en el cáncer de mama. En el modelo experimental utilizado la administración de acetato de medroxiprogesterona (MPA) en hembras BALB/c induce carcinomas mamarios ductales hormono-dependientes (HD) y variantes hormono-independientes (HI) que crecen en ausencia de MPA. Ambas variantes expresan altos niveles de receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR). Resultados previos demostraron que inhibidores de PI3K (LY294002) y MEK1 (PD98059) disminuyen la proliferación y expresión de PR en forma similar en cultivos primarios derivados de ambas variantes, mientras que la expresión de ER $\alpha$  (ER $\alpha$ ) se ve más afectada en los cultivos HD. En este trabajo evaluamos el rol de PI3K/Akt y MEK/Erk1/2 en el crecimiento y la respuesta hormonal diferencial de tumores HI y HD. Al evaluar las variantes tumorales encontramos que PI3K/Akt está aumentada en el tejido tumoral HI y consistente con ello el tratamiento con LY294002 disminuyó el crecimiento tumoral HI ( $p < 0,01$ ) pero no el HD. El PD98059 no afectó el crecimiento tumoral de ninguna variante. La expresión de ER $\alpha$  en los tumores HI y HD fue inhibida luego del tratamiento con LY294002. Mediante un sistema de cultivo en Matrigel que mantiene la interacción de las células con su microambiente logramos reproducir la respuesta diferencial de los tumores HI y HD a LY294002 y PD98059, resultando mayor la muerte celular inducida por LY294002 ( $p < 0,01$ ) y a su vez mayor en los cultivos HI. Este sistema nos permitirá analizar la regulación de la expresión de PR y ER por las quinasas y su correlato con la diferente respuesta hormonal de los tumores. Nuestros resultados muestran que con el solo agregado intraperitoneal de un inhibidor de PI3K se puede modular el crecimiento tumoral hormono-independiente. Entender este mecanismo podría contribuir al conocimiento del por qué de la adquisición de diferente respuesta hormonal durante la progresión del cáncer mamario.

**0266. (0306) BRCA1 Y EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS COREGULAN LA VÍA DE APOPTOSIS MEDIADA POR GADD153 EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA.** P De Luca, J Chamorro, M Ruiz Grecco, G Gueron, M Ferrando, ES Vazquez, A De Siervi

*Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA, CONICET.*

La predisposición al cáncer de próstata se origina por la participación de múltiples genes. El gen de la susceptibilidad del cáncer de mama (BRCA1) se encuentra involucrado en la patogénesis de esta enfermedad debido a su interacción directa con el Receptor de Andrógenos (AR) regulando la muerte celular inducida por andrógenos. En estudios previos utilizando la técnica de ChIP/chip, identificamos a un nuevo gen blanco de BRCA1: GADD153, un factor de transcripción involucrado en la respuesta al daño al ADN y la apoptosis. En este trabajo, determinamos que BRCA1 es el componente central de la regulación del promotor de GADD153 en respuesta al daño al ADN en células de cáncer de próstata. A través de estudios in vivo (ChIP: Inmunoprecipitación de la cromatina) e in vitro (Ensayo de binding), encontramos que BRCA1 se pega al promotor de GADD153 luego del

tratamiento con agentes genotóxicos. La sobre-expresión de BRCA1 potenció la inducción producida por agentes genotóxicos de la actividad transcripcional de los genes reporteros que contienen al promotor de GADD153. Asimismo, el silenciamiento de los niveles endógenos de BRCA1 por ARNi causó marcada represión de la actividad del promotor de GADD153. Además, la reducción de los niveles de la proteína BRCA1 disminuyó marcadamente la apoptosis producida por doxorubicina, evaluada por la técnica de tinción con anexina V/Ioduro de Propidio mediante citometría de flujo. Finalmente, este modelo de regulación transcripcional de GADD153 por BRCA1 en respuesta al daño al ADN es dependiente de AR pero es independiente de p53, dos importantes coreguladores de BRCA1. En resumen, estos resultados sugieren un nuevo mecanismo para la regulación de la respuesta celular al daño del ADN en el cáncer de próstata que involucra a BRCA1, a AR y a GADD153. Un mejor entendimiento de estos procesos puede brindar nuevas opciones terapéuticas para el cáncer de próstata.

**0267. (0606) EFECTO DE AGONISTAS ESPECÍFICOS DE RECEPTORES DE ESTRÓGENOS (RE) ALFA Y BETA EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA.** RC Soldati<sup>1</sup>, MA Gorostiaga<sup>1</sup>, G Vollmer<sup>2</sup>, C Lanari<sup>1</sup>

*1 Inst. de Biología y Medicina Experimental -IByME- Bs.As Argentina, 2 Instituto de Zoología y Endocrinología, TU Dresden, Alemania.*

Es controvertido el papel de los RE en glándula mamaria y cáncer de mama. Existen evidencias que sugieren que el RE alfa (RE $\alpha$ ) está involucrado en respuestas proliferativas y el beta (RE $\beta$ ) en inhibitorias. En el laboratorio desarrollamos carcinomas mamarios murinos, que expresan ambas isoformas, cuya proliferación celular es inhibida por 17-beta-estradiol (E2), mientras que la estimula en las líneas celulares derivadas de los mismos. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto del agonista selectivo del RE $\alpha$  4,40,400-(4-propyl)-(1H)-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT) ó del RE $\beta$  (4-hydroxy-phenyl)-propionitrile (DPN) en el tumor C4-HI y en la línea celular MC4-L2 para investigar si los efectos diferenciales observados estaban mediados por las diferentes isoformas del RE. Se estudió el efecto de los agonistas sobre a) la proliferación celular, b) la expresión de RE $\alpha$  y receptores de progesterona (RP) por western blot (WB) e inmunofluorescencia (IF) y c) la expresión de la clusterina (proteína antiapoptótica) por Real Time PCR. El efecto de los agonistas (100nM a 0.01nM) y de E2 (1nM) se evaluó en medio con 1% de suero fetal bovino adsorbido con carbón, por incorporación de timidina tritiada. Se observó que tanto el PPT como el DPN se comportaron de manera similar al E2 en cada caso, mostrando curvas de dosis-respuesta, siendo los resultados obtenidos con el PPT más marcados que los del DPN ( $p < 0.05$ ). Por otra parte, PPT o DPN 100nM, aumentaron el mensajero para clusterina en MC4-L2 e indujeron una disminución en C4-HI ( $p < 0.001$ ). Ambos compuestos indujeron un incremento en la expresión de RP, evaluado por IF y por WB y una disminución de RE $\alpha$  (WB) en C4-HI, luego de 24hs de tratamiento. Estos datos demuestran que los efectos proliferativos o inhibitorios del E2 observados, no están causados por RE diferenciales y sugieren que ambas isoformas mediarían estos efectos.

**0268. (0244) HEMO OXIGENASA 1 (HO-1): UN TARGET NOVEL EN CÁNCER DE PRÓSTATA.** G Gueron, M Ferrando, P De Luca, A De Siervi, ES Vazquez

*Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires-CONICET, Argentina*

El cáncer de próstata (PCa) es uno de los tumores más frecuentes en el hombre. El riesgo de contraer un cáncer está aumentado en condiciones de inflamación crónica. La liberación de radicales libres de los leucocitos puede dañar el epitelio y las células estromales vecinas conduciendo al disparo de la carcinogénesis por alteración de targets y vías metabólicas cruciales para

mantener la homeostasis del tejido normal. En este contexto, hemo oxigenasa 1 (HO-1) la isoforma inducible de la enzima limitante en la degradación del hemo, podría contrarrestar el daño inflamatorio a través de la prevención del estrés oxidativo o vía la inmunomodulación local de las células inflamatorias infiltrantes. Dado el rol fundamental que ejerce la inflamación en la progresión tumoral, la modulación de HO-1 podría ser crítica en la carcinogénesis prostática. Para comprender el rol que juega HO-1 en PCa, analizamos su expresión en distintas líneas celulares de PCa. Se observó por WB bajos niveles basales de HO1 en PC3 (andrógeno independiente) comparado con MDA PCa 2b (sensible a andrógenos). El tratamiento de los cultivos celulares con hemina (70  $\mu$ M, 24h), un fuerte inductor de la expresión de HO-1, reveló un aumento significativo de la expresión de la misma en ambas líneas y una inducción a nivel transcripcional observada por PCR cuantitativa. También se indujo la actividad del promotor de HO1 en PC3. El efecto de la modulación de HO-1 con hemina sobre la proliferación celular (incorporación 3H-timidina) resultó en una reducción del 23% y del 45% ( $p < 0.05$ ) para PC3 y MDA PCa 2b, respectivamente. Mas aún, el análisis del ciclo celular (FACS) mostró un arresto en G0/G1 para ambas líneas celulares con hemina (30% y 17% ( $p < 0.01$ ) para PC3 y MDA PCa 2b, respectivamente). En conclusión, estos resultados muestran a HO-1 como un mediador de la proliferación celular en PCa pudiendo estar implicada en el arresto de estas líneas metastáticas, ofreciendo un blanco terapéutico novel para PCa.

**0269. (0778) ACCIÓN ESTROGÉNICA DE PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINO-SÍMILES (IGFS) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.** MA García<sup>1</sup>, CA Pontillo<sup>1</sup>, D Peña<sup>1</sup>, L Alvarez<sup>1</sup>, R Bergoc<sup>2</sup>, DL Kleiman de Pisarev<sup>1</sup>, AS Randi<sup>1</sup>

*1 Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 2 Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado promotor de tumores tiroideos y hepáticos en ratas. Hemos demostrado que el HCB aumenta el desarrollo y la malignidad de tumores mamarios inducidos en ratas y modifica la vía de IGFs. En células MCF-7 (RE $\alpha$ positivas), observamos que induce proliferación celular y altera los niveles de RIGF-I, RI e IRS-1. El objetivo de este trabajo fue estudiar si los efectos observados del HCB se encontraban mediados por el RE $\alpha$ . Se utilizó un inhibidor del RE $\alpha$ , ICI 182.780, para el estudio de: 1) proliferación celular, por conteo clonogénico e incorporación de BrdU, y 2) niveles de expresión de RIGF-I, IRS-1 y RE $\alpha$ , por inmunoblot. Las células fueron hambreadas 24 hs en DMEM con 2% de suero libre de estrógenos y luego tratadas con HCB en etanol (0.005, 0.05, 0.5 y 5  $\mu$ M para proliferación y 0.005 y 5  $\mu$ M para inmunoblot) durante 24 hs, en presencia y ausencia de E2 y/o ICI. **Resultados:** Se observó un aumento de la proliferación de  $200 \pm 37,9\%$  ( $p < 0.001$ ) sólo con HCB 0.005  $\mu$ M. El E2 produjo un incremento de  $454 \pm 10,9\%$ ; ( $p < 0.001$ ) que fue aumentado hasta  $651 \pm 38,9\%$ ; ( $p < 0.001$ ) por HCB 0.005  $\mu$ M. Ambos efectos fueron bloqueados por ICI. El nivel de RIGF-I aumentó con HCB 0.005 y 5  $\mu$ M, ( $159,3 \pm 3,7\%$ ;  $p < 0,05$  y  $240 \pm 56,6\%$ ;  $p < 0,01$ ), mientras que en presencia de E2 el HCB 5  $\mu$ M aumentó el RIGF-I ( $61,8 \pm 7,5\%$ ;  $p < 0,01$ ), revirtiéndose estos efectos por ICI. El contenido de IRS-1 fue incrementado con HCB 0.005 y 5  $\mu$ M ( $78,5 \pm 20,2\%$ , y  $62,5 \pm 24,6\%$ ;  $p < 0.01$ ), lo que fue bloqueado con ICI. El efecto estimulador del E2 sobre el IRS-1 no se modificó por HCB, sin embargo en presencia de ICI+E2, aumentó el IRS-1 con HCB 5  $\mu$ M ( $59 \pm 9,5\%$ ;  $p < 0,05$ ), sugiriendo para esta dosis un efecto independiente del RE $\alpha$ . El HCB 0.005  $\mu$ M disminuyó los niveles del RE $\alpha$  en ausencia ( $26,7 \pm 2,3\%$ ;  $p < 0.001$ ) y en presencia ( $16 \pm 2,5\%$ ;  $p < 0.001$ ) de E2. Estos resultados demuestran que el HCB posee actividad estrogénica en la dosis más baja ensayada, sobre la proliferación celular y los niveles de RIGF-I, IRS-1 y RE $\alpha$ .

**0270. (0160) LA SUSTITUCIÓN DE UN SOLO AMINOÁCIDO EN LA PROTEÍNA MAYOR DE LA CÁPSIDE DEL VIRUS POLIOMA MURINO SE ASOCIA A UNA SIGNIFICATIVA DISMINUCIÓN DE SARCOMAS RENALES.** A Aprile<sup>1</sup>, M Caruso<sup>2</sup>, A Busanello<sup>2</sup>, P Amati<sup>2</sup>, N Sanjuan<sup>1</sup>

1 *Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina (UBA), 2 Fipartamento di Biotecnologia cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza", Roma, Italia*

La relación entre la replicación viral y la inducción de neoplasias por el virus Polioma murino es uno de los puntos más controversiales para comprender su patogenia. El virus reconoce un receptor celular que contiene sialil-oligosacáridos y un co-receptor: la Integrina alfa 4-beta 1. La construcción de un mutante puntual en el aminoácido 138 de la proteína mayor de la cápside (VP-1) reemplazando Aspartato por Asparagina en el sitio que reconoce al co-receptor celular, reduce significativamente la replicación in vitro. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar comparativamente la capacidad de diseminación y el perfil oncogénico de ambos virus, mutante y salvaje, en ratones C3H BiDa. Se inocularon animales neonatos con  $5 \times 10^5$  ufp de uno u otro virus y un tercer grupo fue inyectado con el sobrenadante de células BMK no infectadas como control negativo. Entre los días 3 y 70 post-infección (pi) se sacrificaron grupos de ratones y se estudió la presencia del virus en diferentes órganos y tejidos por inmunoperoxidasa (PAP) contra VP-1, así como la viremia por adsorción de la sangre en cultivos de células NIH 3T3 y posterior Inmunofluorescencia Indirecta. El perfil oncogénico fue estudiado métodos histológicos en otros dos grupos de ratones inoculados con una u otra cepa. La progresión de ambos virus fue similar, habiéndose detectado antígenos virales en múltiples órganos y tejidos desde el día 3 pi hasta los 25 días pi. En el riñón ambas cepas replicaron hasta el final del experimento. La incidencia de sarcomas renales, en cambio, fue del 65% en los animales inoculados con la cepa salvaje y del 25% en los que recibieron el mutante ( $p=0,02$ ). Se concluye que ambas cepas, que sólo difieren en un aminoácido de VP-1, pueden replicar igual pero tienen diferente perfil oncogénico en el riñón. En consecuencia, no existe una relación lineal entre replicación y oncogénesis y probablemente una proteína viral estructural esté involucrada en el mecanismo de oncogenicidad.

**0271. (0360) MAMMARY TUMORIGENESIS IS ENHANCED BY TISSUE STIFFNESS AND COLLAGEN REORGANIZATION.** L Kass<sup>1</sup>, KR Johnson<sup>2</sup>, JT Erler<sup>3</sup>, K Csiszar<sup>4</sup>, VM Weaver<sup>5</sup>

1 *Department of Surgery, University of California, San Francisco, San Francisco, CA, USA. Present position: Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina., 2 Department of Bioengineering, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA, 3 Department of Radiation Oncology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, USA, 4 Cardiovascular Research Center, John A. Burns School of Medicine, The University of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA, 5 Center for Bioengineering and Tissue Regeneration, Department of Surgery, University of California, San Francisco, CA, USA*

Malignant transformation is associated with profound changes in the tissue microenvironment, and although inducing a reactive stroma in a tissue can enhance malignant transformation, the mechanism is poorly understood. We found that malignant transformation is associated with a significant increase in mammary gland stiffness and mature focal adhesions. We show that matrix stiffness and/or exogenous force independently induce cell contractility to promote focal adhesion maturation and a tumor-like behavior in mammary epithelial cells (MECs). MMTV-Her2/neu mice, organotypic MECs three-dimensional tissue models, and xenografts are being used to study how alterations in the physical properties of the extracellular matrix (ECM) could modulate mammary tumorigenesis. Using compression and shear

analysis, we show that malignant transformation is preceded by and associated with a progressive stiffening of the tissue. The stiffness of the ECM is linked to increased collagen deposition, bundling, and cross-linking. Studies with MECs that express p75.B2 (ie. an inducible homodimerizing ErbB2) and ribose-induced cross-linked collagen gels demonstrate that ECM stiffness can cooperate with oncogenes to drive breast invasion and transformation. In addition to the in vitro studies, when collagen cross-linking is stimulated by lysyl oxidase expression in fibroblasts that were co-injected subcutaneously with ras-transformed MCF10A cells, tumor invasion and increased angiogenesis were induced. On the contrary, when collagen cross-linking is decreased by beta-aminopropionitrile inactivation of lysyl oxidase tumor incidence is lower than in vehicle-treated MMTV-Her2/neu mice. These results indicate that gland stiffness, altered tissue morphology, and tumor invasion are functionally linked to collagen deposition, fiber orientation, and cross-linking.

## GENÉTICA I

**0272. (0757) PREVALENCIA DEL SÍNDROME METABÓLICO. POLIMORFISMO ASP299GLY DE TLR4.** MF Aranguren<sup>1</sup>, ML Tellechea<sup>2</sup>, MB Eyheramonho<sup>3</sup>, L Gómez Rosso<sup>4</sup>, A Penas Steinhardt<sup>5</sup>, F Brites<sup>4</sup>, GD Frechtel<sup>2,3</sup>, MJ Taverna<sup>3,5</sup>

1 *División Diabetología, Hospital de Clínicas "José de San Martín" (UBA), 2 Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), 3 División Genética, Hospital de Clínicas "José de San Martín" (UBA), 4 Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), 5 Instituto de Inmunología de la Inmunidad Humoral (IDEHU, CONICET/UBA)*

El síndrome metabólico (SM) es una constelación de alteraciones asociadas a resistencia a la insulina e integrada por la combinación de tres o más de las siguientes variables: elevación de la presión arterial, obesidad central, hipertrigliceridemia, hipoalfalipoproteinemia y elevación de la glucemia, que conduce a un elevado riesgo cardiovascular. El gen TLR4 (Toll-Like Receptor-4) participa en la regulación de la inmunidad innata. Se expresa en tejidos insulinosensibles, y su invalidación previene, en roedores, la obesidad y la resistencia a la insulina. Análisis funcionales han sugerido que el polimorfismo Asp299Gly de TLR4 (rs4986790) podría ser funcional. **Objetivos:** analizar la prevalencia del SM en población adulta argentina, y explorar asociaciones entre el rs4986790 de TLR4 y el SM. **Materiales y métodos:** reclutamiento de 734 adultos, no emparentados, donantes de sangre aparentemente sanos, exámenes antropométricos y bioquímicos, y genotipificación de rs4986790 por RFLP-PCR. Diagnóstico de SM según criterios del ATP III (Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults) e IDF (International Diabetes Federation). **Resultados:** la prevalencia de SM fue de 24,7% (n=181) y 31,7% (n=233) según criterios ATP III e IDF, respectivamente. La frecuencia de genotipos fue: Asp299Asp 89,8%, Asp299Gly 9,9% y Gly299Gly 0,3%, y respetaba la ley de Hardy-Weinberg. El colesterol LDL fue más elevado en portadores masculinos de Asp299 (122,1±2,5 mg/dl) que en Gly299 (101,0±6,7, P=0,0078). En hombres, el alelo Asp299 ha mostrado una modesta correlación positiva, pero no significativa, con el SM diagnosticado de acuerdo al ATP III (P=0,09). **Conclusiones:** la prevalencia del SM en adultos argentinos, aparentemente sanos, fue 24,7 (ATP III) y 31,7% (IDF). Aunque el polimorfismo rs4986790 de TLR4 no ha sido asociado significativamente al SM, su alelo Asp299 ha sido asociado, en hombres, a un nivel elevado de colesterol LDL.

**0273. (0175) VARIACIÓN GENÉTICA EN LA NEUROTRANSMISIÓN SEROTONINÉRGICA Y EL RIESGO DE EPILEPSIA MESIAL TEMPORAL REFRACTARIA.** M Kauffman<sup>1</sup>, D Consalvo<sup>1</sup>, D Gonzalez Morón<sup>2</sup>, F Aguirre<sup>2</sup>, S Kochen<sup>1</sup>

1 Consultorio de Neurogenética. Centro de Epilepsia. Hospital Ramos Mejía. CEFYBO. CONICET., 2 Residencia de Neurología. Hospital Ramos Mejía

**Introducción:** La Epilepsia del Lóbulo Temporal (ELT) es la forma de epilepsia focal más prevalente en la población adulta. La Esclerosis del Hipocampo (EH) es una anomalía patológica frecuentemente encontrada en estos pacientes. La ELTEH es refractaria al tratamiento farmacológico (TF) en aproximadamente un 70% de los casos. Factores genéticos serían responsables de la variedad clínica que evidencian los pacientes con ELTEH, en particular podrían modificar el grado de respuesta terapéutica al TF. **Métodos:** Desarrollamos un estudio de epidemiología molecular en una población de pacientes con ELTEH, utilizando un diseño de caso control. Se incluyeron 111 pacientes y 81 controles sanos. Se genotipificó un polimorfismo de número variable de elementos repetitivos en el intrón 2 del gen codificante del transportador de serotonina (5-HTT) mediante PCR y corrida electroforética en agarosa al 2%. Se estratificó la población de sujetos en función de la presencia de refractariedad al TF y la presencia de crisis generalizadas. Se compararon frecuencias alélicas y genotípicas entre los distintos grupos y estratos de sujetos mediante prueba de  $\chi^2$  y regresión logística multivariada. **Resultados:** Las frecuencias genotípicas y alélicas no fueron diferentes entre casos y controles ( $p=0,33$ ). Los sujetos homocigotas para el alelo 12 de 5-HTT tienen un riesgo casi 3 veces mayor de ser refractarios al TF (OR 2,82 IC 95% 1,21 – 6,56;  $p=0,01$ ) que los portadores del alelo 10 y presentan más frecuentemente generalización secundaria en sus crisis (OR 2,42 IC 95% 1,01 – 6,15;  $p=0,05$ ). **Conclusión:** Variantes Genéticas en el gen codificante del transportador de serotonina aumentan el riesgo a desarrollar una Epilepsia del Lóbulo Temporal con Esclerosis del Hipocampo refractaria al tratamiento farmacológico y modifican la expresión fenotípica de este síndrome.

**0274. (0615) INFLUENCIA DE LAS VARIANTES DE GLUTATION-S-TRANSFERASA P, M Y T (GSTP1, GSTM1 Y GSTT1) EN EL DESARROLLO DE LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA) EN PEDIATRÍA.** HV Aráoz<sup>1</sup>, MS Felice<sup>2</sup>, E Alfaro<sup>2</sup>, L Chertkoff<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Biología Molecular-Servicio de Genética. Hospital de Pediatría "Prof. Dr Juan P Garrahan", 2 Servicio de Hemato-oncología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr Juan P Garrahan"

**Introducción:** Las GSTs son enzimas esenciales para la detoxificación celular de carcinógenos, drogas y otros xenobióticos. Ciertos polimorfismos en los genes GSTM1, GSTT1 y GSTP1 se han asociado a susceptibilidad a diferentes tipos de cáncer, resistencia a quimioterápicos y variabilidad en la respuesta a drogas. Con el fin de evaluar la influencia de estos genes en el desarrollo de LLA en pediatría se analizaron las frecuencias genotípicas y alélicas de las variantes genéticas de GSTP1, GSTM1 y GSTT1 en niños con LLA y en una población general de Argentina. **Pacientes y Métodos:** Se determinaron los haplotipos y genotipos de GSTP1 105 y 114 mediante PCR-RFLP en muestras de ADN de 242 niños con LLA y 252 individuos de población general de Argentina. Las variantes de GSTT1 y GSTM1 se estudiaron mediante PCR múltiple en 151 niños con LLA y en 102 individuos de población general. Se calcularon los odd ratio utilizando el programa GraphPad Prism 5. **Resultados:** La distribución de frecuencias alélicas y genotípicas en los niños con LLA fue: 36% ILE105ILE, 45% ILE105Val, 19% VAL105VAL, 94% ALA114ALA, 6% ALA114VAL, para GSTP1; 51% para GSTM1 nulo y 13% GSTT1 nulo. El análisis independiente de cada polimorfismo en los pacientes no mostró diferencias significativas con respecto a los individuos de población general. En los niños con LLA se observó una mayor proporción de portadores del haplotipo\*B (VAL105VAL114) de GSTP1 y una ligera disminución del genotipo GSTT1 nulo. El análisis conjunto de los genotipos de GSTT1 y GSTP1 permitió establecer cuatro combinaciones más frecuentes. Dos de ellas, GSTT1nonulo-GSTP1\*A/\*A y GSTT1nonulo-GSTP1\*A\*B+\*B\*B, se presentaron con una fre-

cuencia significativamente mayor en los niños con LLA ( $p=0.0003$ ). **Conclusiones:** En nuestra población se encontraron dos genotipos combinados de GSTT1 y GSTP1 que serían factores de riesgo para el desarrollo LLA en edad pediátrica.

**0275. (0538). LONGITUD TELOMÉRICA Y RIESGO DE SÍNDROME CORONARIO AGUDO.** J Panero<sup>1</sup>, L Girotti<sup>2</sup>, M Elizari<sup>2</sup>, I Slavutsky<sup>1</sup>

1 Academia Nacional de Medicina, 2 Hospital "Ramos Mejía"

El acortamiento telomérico es un marcador de envejecimiento celular. La enfermedad coronaria es una patología relacionada a la edad. Diferentes estudios han demostrado asociación entre acortamiento telomérico y diversas enfermedades cardiovasculares, sugiriéndose que diferencias entre la edad biológica y cronológica podrían contribuir a su riesgo. En este trabajo se evaluó la longitud telomérica (LT) en 38 pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) (23 varones; edad mediana: 55 años; rango: 37-86 años) y 3 mujeres con angina inestable (AI) (46-50 años). Se efectuó extracción de ADN genómico de sangre periférica de pacientes y controles, y posterior digestión con Hinfl y RsaI. Se determinó la LT mediante la técnica de TRF (terminal restriction fragments). Se observó acortamiento telomérico significativo en IAM ( $6,62\pm 1,92\text{kb}$ ) y AI ( $4,23\pm 2,23\text{kb}$ ) respecto de los controles ( $8,05\pm 1,73\text{kb}$ ) ( $p<0,03$  y  $p<0,01$ , respectivamente), así como entre ambos grupos de pacientes ( $p<0,05$ ). En IAM no se detectó correlación entre la media de TRF y la edad de los pacientes ( $p=0,49$ ;  $r:0,12$ ), el sexo ( $p=0,49$ ), el nivel de proteína C reactiva ( $p=0,99$ ;  $r:0,001$ ), ni el número de vasos obstruidos (1 vs. 2 o más) ( $p=0,22$ ). Tres casos con antecedentes de IAM previo mostraron valores de TRF muy bajos (2,11kb; 2,86kb y 3,22kb) (edad: 50-69 años), respecto de lo esperado para su edad (~7kb), indicando aumento de la edad biológica. El análisis por grupo etéreo mostró 3 pacientes de edad avanzada (84-86 años) con primera manifestación de la enfermedad y alto TRF (7,91kb; 7,39kb y 8,06 $\pm$ 0,76kb), sugiriendo edad biológica disminuida. Nuestros datos muestran asociación entre acortamiento telomérico y síndrome coronario agudo, sugiriendo a este parámetro como predictor de enfermedad coronaria. Asimismo, indicarían que la diferencia entre edad biológica y cronológica podría contribuir al riesgo de patología cardiovascular, sustentando el origen genético de la variabilidad de aparición de la enfermedad.

**0276. (0119) INACTIVACIÓN DE SIX3 POR MUTACIONES CON PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN PACIENTES CON HOLOPROSENFALIA.** S Domené<sup>1</sup>, K El-Jaick<sup>2</sup>, E Roessler<sup>1</sup>, F Lacbawan<sup>1</sup>, B Feldman<sup>1</sup>, M Muenke<sup>1</sup>

1 National Institutes of Health (NIH), USA, 2 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil

La holoprosencefalia (HPE) es la anomalía estructural más común del desarrollo cerebral humano, con una prevalencia de ~1/250 concepciones y ~1/16000 nacidos vivos. Se han identificado mutaciones en al menos 8 genes diferentes. Previamente, hemos demostrado que SIX3, un factor de transcripción involucrado en la formación del ojo y prosencefalo durante el desarrollo, se encuentra asociado a HPE en humanos. Sin embargo, aún no se han realizado estudios funcionales de las mutaciones identificadas. El gen SIX3 consiste de 2 dominios conservados: un dominio SIX involucrado en la interacción con otras proteínas y un homeodominio de unión al ADN. SIX3 interactúa con el corepresor groucho a través de 2 motivos símil eh1, localizados dentro del dominio SIX. Esta interacción es necesaria para la regulación de otros genes durante el desarrollo. Hemos caracterizado el efecto funcional de 42 mutaciones en el gen SIX3, 17 previamente descritas y 25 recientemente identificadas. De las 42 mutaciones, 30 fueron con cambio de sentido, 5 sin sentido, 6 con pérdida del marco de lectura y 1 delección que conserva el marco. Para demostrar la función de estas mutaciones desarrollamos dos ensayos complementarios utilizando al pez cebra como modelo animal: 1) sobreexpresión de SIX3, 2) bloqueo con

morfolinos y ensayo de rescate. La pérdida de función pudo caracterizarse en el 21% (9/42) de las mutaciones por el ensayo de rescate y en el 74% (31/42) por el ensayo de sobreexpresión, alcanzando un total de 76% (32/42) por al menos un ensayo. Cabe destacar que las mutaciones puntuales en el motivo símil eh1 resultan en pérdida de función, sugiriendo que la interacción con groucho es esencial para la actividad de SIX3. Estos datos ayudan a elucidar el funcionamiento de SIX3 durante el desarrollo y su rol en la patogénesis de HPE, además de ser de utilidad para el asesoramiento genético de familias con pacientes afectados con HPE.

**0277. (0113) IMPLICANCIAS FUNCIONALES DE VARIANTES EN LA SECUENCIA EN EL GEN PAX8 IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON DISGENESIA TIROIDEA.** SA Esperante<sup>1</sup>, M Caputo<sup>1</sup>, CM Rivolta<sup>1</sup>, M Baralle<sup>2</sup>, HM Targovnik<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Genética y Biología Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, 2 International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology. ICGEB*

Diez mutaciones con pérdida de función en PAX8 han sido descritas en pacientes con Hipotiroidismo congénito debido a disgenesia tiroidea. En el presente trabajo se evalúa la implicancia funcional de variantes en la secuencia identificadas por nosotros en pacientes con disgenesia tiroidea y no observados en 500 alelos analizados de la población normal. En 60 pacientes no relacionados se identificaron una transición c.674C>T que resulta en una sustitución p.T225M, una transición c.699C>T que no cambia el aminoácido p.L233L y una transición c.1006G>A que resulta en una sustitución p.G336S. Se estudió la capacidad del factor de transcripción PAX8 salvaje y las mutantes p. T225M y p.G336S de inducir la activación del promotor de tiroglobulina humana (pTG). Se cotransfectaron células HeLa con vectores de expresión PAX8 y vectores con gen de luciferasa bajo el control del promotor de pTG. Por otro lado se construyeron minigenes de exones únicos y múltiples en el vector pTB para estudiar si los cambios en la secuencia tienen algún efecto en el procesamiento de los exones. Se transfectaron células HeLa con los minigenes salvajes y mutados y se evaluó el procesamiento del ARNm por RT-PCR. La inducción de la expresión de luciferasa fue equivalente para PAX8 salvaje y PAX8 mutado. Es decir p.T225M y p.G336S no afectan la capacidad de PAX8 de activar el promotor de pTG. Las variantes en la secuencia c.674C>T y c.699C>T no afectan el procesamiento del exón 7 en los minigenes construidos. La transición 1006 G>A aumenta la exclusión del exón 9 del ARNm, lo que alteraría el balance de las isoformas presentes en PAX8. Los resultados obtenidos permiten explicar un posible mecanismo patogénico de la variante en la secuencia 1006 G>A (G336S) no a nivel de la estructura-función de la proteína sino por la influencia sobre el procesamiento del exón 9.

**0278. (0240) VARIANTES DEL GEN DEL TRANSDUCTOR DE SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) SE ASOCIA A COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO EN ADULTOS.** T Fernández Gianotti, S Sookoian, C Gemma, A Burgueño, M Schuman, CJ Pirola

*Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas, A. Lanari. Universidad de Buenos Aires-CONICET, Argentina.*

El factor de transcripción STAT3 esta involucrado en la regulación de la homeostasis energética mediante la acción de la leptina, participando activamente en la vía de señalización intracelular de la misma. El objetivo del trabajo fue estudiar la posible asociación de variantes de nucleótido único (SNPs) en el gen STAT3 con distintos componentes del síndrome metabólico. Para esto se incluyeron en un estudio de sección transversal 1106 individuos, edad 34.4 ± 8.6, de sexo masculino seleccionados de población general: 616 sujetos (55.6%) presentaron sobrepeso (BMI>25), y 501 (45.3%) sobrepeso/obesidad (BMI>27), además 222 individuos (20.1%) mostraron insulinoresistencia (HOMA>2.4). Se seleccionaron de la base HapMap 3 SNPs del gen STAT3 (tagSNPs)

con una frecuencia del alelo menor >10% (rs2293152 C/G; rs6503695 C/T; rs9891119 C/A) comprendiendo 75.17 kb del cromosoma 17 y representando 24 sitios polimórficos con un r2 >0.8. El rs9891119 mostró una asociación con la insulinoresistencia (p<0.05), sin embargo la variante no se encontró en equilibrio de Hardy Weinberg en los controles. El rs6503695 se asoció con los niveles de colesterol (p<0.02), ya que los individuos homocigotas CC (n: 74) mostraron mayores niveles de colesterol (media ± DS, 203.6 ± 37.8 mg/dL) que los portadores del genotipo CT+TT (n: 987, 192.2 ± 36.8 mg/dL); p<0.01. Clasificando a los individuos de acuerdo a los niveles de colesterol, se observó que los portadores de genotipo CC presentan un OR de 1.82 (IC 95% 1.13-2.94). Además, los homocigotas C mostraron niveles mayores de LDL-colesterol (129.5 ± 34.0 mg/dL vs. 120.3 ± 33.4 mg/dL, p<0.05). No se observó ninguna asociación significativa entre los SNPs estudiados y el BMI o la hipertensión arterial. En conclusión, este estudio sugiere que las variantes del gen STAT3 estarían asociadas a algunos componentes de síndrome metabólico, como los niveles de colesterol. Los resultados no permiten definir su relación con resistencia a insulina.

**0279. (0022) POLIMORFISMOS EN LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ (MMPS) Y SU ASOCIACIÓN CON MELANOMA.** J Cotignola, N Ishill, A Patel, S Shah, I Orlow

*Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY, USA*

**Introducción:** La diseminación de las células tumorales a órganos distantes es la principal causa de mortalidad en pacientes con melanoma. La proteólisis de la matriz extracelular (ECM) y membranas basales (BM) promueve la invasión celular. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son enzimas proteolíticas que degradan la ECM y BM, y alteraciones en su expresión y/o actividad podrían modificar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, decidimos estudiar la posible correlación entre polimorfismos en los genes de MMP1, MMP2, MMP3 y MMP9, y características clinicopatológicas de los melanomas. **Materiales y Métodos:** Se reclutaron 1002 pacientes con melanoma en Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de New York, NY, USA. Cada individuo firmó un consentimiento escrito y completó un cuestionario que incluía preguntas sobre factores de riesgo conocido. Además, se obtuvo información clinicopatológica de cada espécimen. Se extrajo ADN germinal de todos los pacientes y la genotipificación de los polimorfismos fue realizada con métodos basados en PCR (DHPLC, pirosecuencia, temperaturas de desnaturalización, análisis de tamaño de los fragmentos). **Resultados:** El polimorfismo en el promotor de MMP1 (-1607 1G/2G) está asociado significativamente a la progresión del tumor y recidivas (p=0.04 y p=0.03, respectivamente), siendo el genotipo 2G2G de peor pronóstico en ambos casos. Para MMP2, MMP3 y MMP9 se encontraron asociaciones que perdieron la significancia estadística al ajustar el modelo por otros factores de riesgo al melanoma (sexo, edad, número de pecas y lunares, etc). **Conclusiones:** 1) El polimorfismo -1607 1G/2G en el gen MMP1 podría influenciar la progresión del melanoma; 2) Las asociaciones encontradas para MMP2, MMP3 y MMP9 previo ajuste del modelo podrían ser asociaciones azarosas; 3) La relación entre las MMPs y las características del melanoma garantiza un estudio más exhaustivo para comprender la biología del melanoma.

## REPRODUCCIÓN II

**0280. (0217) TERAPIA GENICA NEONATAL PARA EL PEPTIDO TIMICO TIMULINA COMO ESTRATEGIA PREVENTIVA DE LAS ALTERACIONES OVARICAS EN EL RATON CONGENITAMENTE ATIMICO.** PC Reggiani<sup>1</sup>, CG Barbeito<sup>2</sup>, MA Flamini<sup>2</sup>, GM Cónsole<sup>1</sup>, SS Rodríguez<sup>1</sup>, M Dardenne<sup>3</sup>, RG Goya<sup>1</sup>

*1 Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata-Cát. Histología B, Fac.Cs. Médicas, UNLP, 2 Cát. Histología,*

Fac. Cs. Veterinarias, UNLP, 3 CNRS UMR 8147, Université Paris V, Hôpital Necker, Paris

El ratón hembra congénitamente atímico (*nude*), presenta un envejecimiento ovárico acelerado caracterizado por una temprana caída del número de folículos y cuerpos lúteos y por una atresia folicular precoz. Previamente demostramos que la terapia génica neonatal para el péptido tímico timulina (TGN-timulina) en ratones *nude* restablece los niveles circulantes de timulina y previene la disminución de gonadotrofinas séricas que presentan estos mutantes en la adultez. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la TGN-timulina previene las mencionadas alteraciones ováricas en la hembra *nude* adulta. Para tal fin construimos un vector adenoviral recombinante (denominado RAD-FTS) portador de un gen sintético para timulina, y un vector control (RAD-GFP). Estos vectores se inyectaron neonatalmente en ratones *nude* atímicos (*nu/nu*) y heterocigotas (*nu/+*; fenotípicamente normales) por vía intramuscular ( $10^8$  pfu/ratón), sacrificándose los animales al día postnatal 70. La timulina sérica se dosó por bioensayo y los ovarios se analizaron por histomorfología cuantitativa. En las hembras *nu/nu* inyectadas con RAD-FTS y RAD-GFP, los niveles de timulina sérica fueron  $256 \pm 81$  y  $8 \pm 1$  fg/ml ( $p < 0,01$ ), respectivamente. El n° de folículos 2<sup>nos</sup> disminuyó ligeramente en los ratones atímicos mientras que la TGN-timulina indujo un aumento significativo en el n° folículos 2<sup>nos</sup> en estos mutantes ( $p < 0,001$ ). El n° folículos 3<sup>nos</sup> y de cuerpos lúteos de las hembras atímicas disminuyó significativamente respecto a los controles normales ( $p < 0,01$  en ambos casos), mientras que la TGN-timulina previno casi completamente la aparición de estas deficiencias. El n° folículos atresicos fue significativamente mayor en ratones *nude* respecto a sus contrapartes *nu/+* ( $p < 0,01$ ); la TGN-timulina previno casi completamente esta anomalía. Estos resultados revelan que la timulina juega un rol fisiológico relevante en la maduración del eje hipofiso-ovárico, posiblemente actuando sobre la secreción de gonadotrofinas.

**0281. (0186) HCG ESTIMULA LA EXPRESIÓN DE LEPTINA EN PLACENTA POR ACTIVACIÓN DE LA VÍA MAPK.** JL Maymó<sup>1</sup>, V Sánchez Margalet<sup>2</sup>, JC Calvo<sup>1,3</sup>, CL Varone<sup>1</sup>

1 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 2 Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Universidad de Sevilla, Sevilla, España., 3 Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina

La leptina es una hormona proteica de 16KDa descubierta originalmente en tejido adiposo, donde se secreta con la función de determinar el balance energético del organismo. La expresión de leptina y sus receptores se ha evidenciado también en placenta, pudiendo tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación, afectando funciones maternas y fetales, por mecanismos autócrinos y parácrinos. En cultivos de células trofoblásticas observamos que el promotor de leptina es activo. Demostramos que la hCG presenta un efecto inductor sobre la expresión de la proteína, tiempo y dosis dependiente. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos regulatorios involucrados en la estimulación de la expresión de leptina por hCG, utilizando como modelo la línea celular trofoblástica BeWo y explantos de placentas humanas a término. Se realizaron ensayos de transfección transitoria con un plásmido que contiene el promotor del gen de leptina río arriba del gen reportero luc. Los resultados se normalizaron a la eficiencia de transfección. Asimismo, se determinó la expresión de leptina por Western blot. Observamos que en explantos de placenta, hCG (50-100UI/ml) estimula la expresión de leptina. Por otro lado determinamos que el AMPc (0.1-1mM) inhibe tanto la activación del promotor así como la inducción de leptina, ejercida por hCG. Analizamos también la vía de señalización de MAPK. El tratamiento con PD 98059 50 µM (inhibidor farmacológico de MEK) y la contrafección con MAPKkd (dominante negativo de MAPK) suprimieron los efectos estimuladores de hCG sobre el promotor de leptina y sobre la expresión de la proteína. Mas aún, determina-

mos que hCG es capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2 y MEK 1/2 en explantos de placenta, y que esta activación se inhibe al tratar con PD 98059 50µM. Los resultados obtenidos mejoran la comprensión de los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión de leptina en placenta por hCG.

**0282. (0487) APOPTOSIS Y EXPRESIÓN DE FAS/FAS-L EN EL OVARIO FETAL Y PRE-PÚBER DE LAGOSTOMUS MAXIMUS (RODENTIA).** CF Jensen, ML Bacigalupo, MA Muscársel, MA Willis, ML Leopardo, AD Vitullo

CEBBAD-Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, y Diagnóstico- Universidad Maimonides, Buenos Aires, Argentina. jensen.federico@maimonides.edu

En trabajos previos demostramos que tanto en el ovario embrionario como pre-púber y adulto de *L. maximus* (LM) la apoptosis se encuentra fuertemente suprimida y se relaciona con una marcada expresión de BCL-2 frente a una nula o muy baja expresión de BAX que permiten sostener la poli ovulación masiva característica de esta especie, 400-800 oocitos. El objetivo de este trabajo fue analizar la participación de las proteínas de la vía extrínseca, FAS/FAS-L en la regulación de la apoptosis en ovarios embrionarios y pre-púberes de LM. Se utilizaron embriones (gestación temprana, media y tardía) y hembras pre-púberes. Se fijaron ovarios en PFA 4% para análisis histológico. FAS/FAS-L se detectaron por inmunohistoquímica (IHQ) indirecta y por western-blot (WB) usando anticuerpos específicos (Santa cruz Biotechnology). La inmunodetección se realizó utilizando un Kit de DAKO y Amersham ECL respectivamente. La apoptosis se analizó con el kit "In Situ Cell Death Detection" Roche. FAS mostró una alta expresión en ovarios embrionarios y pre-púberes por IHQ y WB, en oogonias y oocitos de folículos primordiales en ovarios embrionarios y en oocitos de folículos primordiales, primarios y secundarios de ovarios pre-púberes. FAS-L no fue detectado en ningún caso. Estos resultados indican que la vía extrínseca, señalizada por FAS/FAS-L se encuentra inactiva en el ovario de LM. Esto, junto a resultados previos de nuestro grupo (alta expresión de BCL-2 y escasa expresión de BAX) en ovarios embrionarios y pre-púberes, demuestra la supresión generalizada de la apoptosis en el ovario de LM como estrategia para sostener la poli ovulación masiva.

**0283. (0473) CARACTERIZACIÓN DE CANALES DE SODIO EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE TROFOBLASTO HUMANO (BEWO).** S del Mónaco, Y Asséf, G Marino, BA Kotsias

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari (IDIM - CONICET)

La membrana plasmática del sincitiotrofoblasto contiene sistemas de transporte de Na<sup>+</sup> que participan en la nutrición del feto y en el mantenimiento de la homeostasis celular. En estudios previos confirmamos la presencia del Canal Epitelial de Sodio (ENaC) en la línea celular BeWo, derivada de trofoblasto humano. El objetivo del presente trabajo es continuar la caracterización de los canales de sodio en células BeWo, utilizando la técnica electrofisiológica de patch clamp. Las células cultivadas con aldosterona (100 nM, 12h) y estimuladas con 8Br-AMPC (100 µM, 25 min) evidenciaron una corriente catiónica entrante sensible al amiloride (IC50 = 1.25 µM), con una permeabilidad selectiva de orden Li<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> > K<sup>+</sup> > NMDG (n = 7), que no se observa en células cultivadas en condiciones control (n = 8). Con la configuración de canal único (inside-out) detectamos dos grupos de canales de sodio de baja conductancia en las células tratadas con aldosterona. Un primer grupo de conductancia  $5.61 \pm 0.68$  pS (n = 10) no rectificante dentro de los potenciales estudiados (-120 a 120 mV) y con una frecuencia de aparición de 1 cada 3 canales activos. El segundo grupo presentó una conductancia lineal promedio de  $8.96 \pm 0.91$  pS y una frecuencia de aparición de 1 cada 6 canales activos (n = 5). Ambos grupos presentaron también una baja probabilidad de apertura ( $0.10 \pm 0.05$  y  $0.09 \pm 0.07$  a -80 mV, para el primer y segundo grupo, respectivamente), indepen-

diente del voltaje aplicado ( $p > 0.05$ ). Estas características concuerdan con las predichas para canales tipo ENaC, detectados en otros tejidos humanos. Las diferencias observadas entre grupos podrían deberse a variaciones en la composición de subunidades del canal o a distintas influencias de proteínas accesorias. Estos resultados se suman a la caracterización electrofisiológica y molecular del ENaC en la línea celular BeWo realizada previamente, confirmando la presencia, actividad y regulación hormonal del canal en células de placenta humana.

**0284. (0256) EFECTO DE INTERFERON GAMMA SOBRE METALOPROTEASAS EN UN MODELO DE INVASIÓN EMBRIONARIA.** V Fontana<sup>1</sup>, L Belluscio<sup>1</sup>, E Cebral<sup>2</sup>, M Cameo<sup>3</sup>, JC Calvo<sup>4</sup>

1 Depto Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 2 IFIBYNE, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 3 Biología de la Reproducción, 4 Instituto de Biología y Medicina Experimental

Las células trofoblásticas expresan metaloproteasas (MMP) -2 y -9, las cuales digieren la matriz extracelular endometrial durante la invasión embionaria. Las MMPs estarían reguladas espacio-temporalmente por citoquinas tipo TH-1 y TH-2. Previamente reportamos un efecto de IFN- $\gamma$ (TH1) sobre el desarrollo embrionario murino *in vitro* y confirmamos que las células JEG-3 (modelo de invasión embionaria) expresan leptina y MMPs. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de IFN- $\gamma$  en la invasión trofoblástica usando la expresión y actividad de MMPs como indicadores. Las células JEG-3 fueron cultivadas en presencia de IFN- $\gamma$  [0-160000 U/ml] durante 3 días y evaluamos la actividad de MMP-9 y -2 (zimografía) y la expresión de MMP-9 y Leptina (Western blot). La actividad de MMP-9 sobre las células en cultivo en presencia de IFN- $\gamma$  mostró una disminución significativa ( $p < 0.0001$  vs. Control,  $n=3$ ,  $R=0.82$ ), este efecto fue más evidente a la concentración de 160000 U/ml. Cuando analizamos la actividad de MMP-2 observamos una disminución más marcada que la observada en la de MMP-9 (vs. Control  $p < 0.0001$ ). La máxima disminución sobre la actividad de MMP-2 fue observada a 160000 U/ml ( $p < 0.0001$  vs. Control,  $n=3$ ,  $R=0.97$ ). El cultivo de células en presencia de diferentes concentraciones de IFN- $\gamma$  no modificó la expresión de MMP-9. En cuanto al efecto de IFN- $\gamma$  sobre la expresión de Leptina observamos que la cantidad de proteína secretada al medio de cultivo fue menor a la concentración de 160000 U/ml comparado con el control. Este efecto se correlaciona con la reducción de la actividad de MMPs descriptas anteriormente. Siendo el IFN- $\gamma$  una citoquina TH1 involucrada en el proceso implantatorio, demostramos que tendría un posible efecto deletéreo sobre la interacción madre-embrión que estaría relacionado con una invasión celular alterada por modificación de la actividad de MMP-2 y -9, sin afectar la expresión de MMP-9.

**0285. (0107) EFECTO DE PROLACTINA (PRL) SOBRE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA 2 (COX2) EN CÉLULAS DE LEYDIG.** ME Matzkin<sup>1</sup>, SI Gonzalez-Calvar<sup>1</sup>, MH Carino<sup>3</sup>, RS Calandra<sup>2</sup>, MB Frungieri<sup>1</sup>

1 IBYME, CONICET; Medicina, UBA, 2 IBYME, CONICET; IMBICE, La Plata, 3 IBYME, CONICET

Previamente, describimos que la isoforma inducible de la enzima ciclo-oxigenasa (COX2), clave en la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), se expresa en biopsias testiculares humanas de pacientes infértiles, aunque se halla ausente en el testículo normal. Además, establecimos que COX2 está presente en el testículo del hámster Dorado adulto expuesto a fotoperíodo normal (FN: 14h luz/día), pero no se expresa en testículos de rata, ratón, cerdo y mono. En este trabajo se evaluó por inmunohistoquímica el efecto de la edad y el fotoperíodo sobre la expresión testicular de COX2 en hámsteres Dorados. Detectamos COX2 en células de Leydig de hámsteres peripuberales, puberales y adultos mantenidos en FN; pero no, en testículos de hámsteres prepúberes mantenidos en FN o en testículos regresionados de

hámsteres adultos expuestos a fotoperíodo corto (FC: 6h luz/día) durante 16 semanas. Estudios *in vitro* realizados con células de Leydig purificadas seguidos por RT-PCR semi-cuantitativa, demostraron que COX2 es inducida por prolactina (PRL) (unidades arbitrarias (UA), 10 min incubación: Basal:  $1.0 \pm 0.2$ , PRL 25 ng/ml:  $31.1 \pm 5.2$ ,  $P < 0.05$ ; 30 min incubación: Basal:  $1.0 \pm 0.3$ , PRL 25 ng/ml:  $115.9 \pm 12.0$ ,  $P < 0.05$ ). **Resultados** similares se obtuvieron al evaluar la expresión de COX2 en la línea celular TM3 derivada de células de Leydig de ratones inmaduros (RT-PCR, UA, 10 min incubación: Basal:  $1.0 \pm 0.06$ , PRL 10 ng/ml:  $6.3 \pm 1.0$ ,  $P < 0.05$ ; 30 min incubación: Basal:  $1.0 \pm 0.04$ , PRL 10 ng/ml:  $2.1 \pm 0.1$ ,  $P < 0.05$ . Western blot, UA, 1h incubación: Basal:  $1.0 \pm 0.4$ , PRL 10 ng/ml:  $7.7 \pm 1.1$ ,  $P < 0.05$ ). PRL también estimuló la producción de PGD2 en células TM3 (Inmunoensayo colorimétrico, fmoles/millón de células, 1h incubación: Basal:  $8.2 \pm 0.2$ , PRL 10 ng/ml:  $16.0 \pm 0.9$ ,  $P < 0.05$ ; 3h incubación: Basal:  $5.7 \pm 0.2$ , PRL 10 ng/ml:  $18.2 \pm 0.8$ ,  $P < 0.05$ ). En resumen, COX2 se localiza en células de Leydig, y su expresión sería regulada por PRL durante el desarrollo puberal y la adultez en el hámster Dorado reproductivamente activo.

**0286. (0078) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA EN CÉLULAS PLACENTARIAS POR ESTRADIOL.** YP Gambino<sup>1</sup>, JL Maymó<sup>1</sup>, JC Calvo<sup>2</sup>, CL Varone<sup>1</sup>

1 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, 2 Instituto de Biología y Medicina Experimental

La leptina, hormona proteica de 16 KDa, es secretada principalmente por los adipocitos con la función de determinar el balance energético del organismo. Su expresión y la de sus receptores se evidenciaron también en placenta. Se sugiere que esta hormona podría tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación, afectando funciones maternas y fetales por mecanismos autócrinos y parácrinos. Sin embargo los efectos fisiológicos y moleculares de la leptina durante el embarazo aún no se comprenden totalmente. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de leptina en células placentarias, empleando como modelo la línea celular trofoblástica BeWo. Por Western blot se comprobó que estas células expresan tanto leptina como su receptor. Se realizaron ensayos de transfección transiente con plásmidos conteniendo diferentes fragmentos de la región promotora del gen de leptina río arriba del gen reportero luc y se relativizó la eficiencia de la transfección por la expresión del gen  $\beta$ -gal. Al transfectar con la construcción que posee la región promotora desde -1951pb en presencia de 100 nM de estradiol la expresión del gen luc se incrementa en un máximo de  $4.4 \pm 1.1$  veces respecto a la observada en ausencia de estradiol ( $p < 0.05$ ). Este efecto es dosis dependiente y se pierde al utilizar regiones promotoras menores a -1951pb. Similares resultados se obtuvieron al medir los niveles endógenos de leptina por Western blot, donde la inducción por estradiol es dosis y tiempo dependiente. Estos resultados refuerzan la idea de la importante función de la leptina en el diálogo endometrio-embrión y ayudan a esclarecer el mecanismo de regulación de su expresión en placenta por estradiol.

**0287. (0339) INFLUENCIA DEL ESTRÉS SOBRE CONDUCTA MATERNA, CALIDAD DE LA LECHE Y ESTADO DE LAS CRÍAS EN RATAS.** M Quercetti, M Torrecilla, A García, B Hapon, C Ferrari, G Jahn, E Rodríguez Echandía, A González Jatuff

IMBECU, CONICET - Facultad de Ciencias Médicas, U.N. Cuyo

**Introducción:** Las experiencias neonatales en un estadio crítico de plasticidad neuronal producen cambios permanentes. En nuestro modelo se expusieron ratas a Estrés Crónico Aleatorio (crías, madres y ambas) durante las dos primeras semanas de lactancia. **Objetivos:** Determinar si la conducta materna se modifica por exposición de la madre y/o de las crías a estrés. -Detectar alteraciones en la calidad de leche materna. **Metodología:** Sujetos: ratas hembras primíparas. Madres y/o crías fueron ex-

puestas a sesiones diarias de estrés. Grupos: I. Control, II. Estrés Neonatal, III. Estrés Materno y IV. Estrés Neonatal y Materno. Se observó conducta materna basal y posterior a separación. Se evaluó lactosa, triglicéridos y proteínas en leche, y prolactina sérica. **Resultados:** En condiciones basales la exposición de las madres a estrés incrementó los scores de conducta materna (DUNN,  $p < 0.05$ ). El estrés sobre las crías indujo menores scores en conducta materna diurna (DUNN,  $p < 0.05$ ), revirtiéndose en oscuridad. Se observaron diferencias en proteínas y lactosa (AN1- $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas en la curva de crecimiento de las crías. Conclusiones: El estrés neonatal disminuye la conducta materna diurna, que se compensa en oscuridad y ante mayor exigencia. El estrés materno estimula conductas maternas basales. El estrés materno y/o neonatal interfiere en la calidad de la leche, disminuyendo proteínas y aumentando lactosa. Se observó una sutil disminución de la prolactina sérica. Pese a estas diferencias, el estado nutricional de las crías no estaría mayormente afectado.

**0288. (0617) EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE LEPTINA EN LA DECIDUA HUMANA.** A Vaccarezza<sup>1</sup>, G Cerchi<sup>1</sup>, AT Fazleabas<sup>2</sup>, P Cameo<sup>1</sup>

1 *CEBBAD- Universidad Maimonides*, 2 *Department of Obstetrics and Gynecology, University of Illinois at Chicago, USA*

**Introducción:** A lo largo del embarazo la decidua, como parte de la unidad materno-fetal regula el desarrollo y crecimiento del feto, generando un ambiente intra-uterino adecuado. La leptina ha sido propuesta como un jugador clave en la fisiología de la interface materno-fetal. Esta proteína y su receptor (OB-R) se expresan en el trofoblasto y el endometrio de primates y regulan funciones como la secreción de hCG y progesterona. Más de 5 isoformas del OB-R se han descrito en distintos tejidos. Se detectaron al menos una isoforma en placenta humana (180KDa), y dos isoformas en trofoblasto (130KDa y 150KDa) y decidua (130KDa) de primates no humanos. El objetivo de este trabajo fue identificar la expresión de las isoformas del OB-R en decidua humana y durante el proceso de decidualización. **Metodología:** Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos uterinos (HuF) y decidua humana, ambos provenientes de placentas normales a término. Las células HuF se cultivaron y decidualizaron *in vitro* en presencia de hormonas y AMPc. El cultivo de células HuF es un modelo de decidualización *in vitro* internacionalmente aceptado (BOR1995;52:609). La expresión del OB-R fue analizada por Immunoblot en extractos de proteínas totales de decidua y células HuF. **Resultados:** Observamos la expresión de distintas isoformas del OB-R en células HuF (180, 82, 50 KDa) y en decidua humana (50KDa y 180KDa). La expresión de estas isoformas es modificada diferencialmente durante el proceso de decidualización. **Conclusiones:** En este trabajo mostramos la expresión de distintas isoformas del OB-R en la decidua y durante el proceso de decidualización. Particularmente, observamos la expresión de una isoforma pequeña soluble de 50KDa que no se expresa en el trofoblasto. Esta isoforma soluble podría cumplir un rol importante en la regulación de la disponibilidad y transporte de la leptina en la interfase materno-fetal. (Subsidios: NIH D43 TW 00671, Universidad Maimonides, ORT 2007).

**0289. (0110) EL HIPERTIROIDISMO EXPERIMENTAL PRODUCE ADELANTO DE LA LUTEOLISIS EN LA RATA.** P Navas<sup>1</sup>, AB Motta<sup>2</sup>, GA Jahn<sup>1</sup>, MB Hapon<sup>1,3</sup>

1 *Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CONICET*, 2 *Laboratorio de Fisiopatología Ovarica-CEFYBO, UBA-CONICET*, 3 *Instituto de Cs. Básicas, Un. Nac. de Cuyo*

La función normal del cuerpo lúteo (CL) es crítica para el mantenimiento de la preñez en la rata, ya que es la principal fuente de progesterona (P4) circulante. El hipertiroidismo (hiperT) experimental en ratas adelanta aproximadamente 12 horas la luteólisis, que se caracteriza por la abrupta caída en la secreción

de P4 luteal. La prostaglandina F2alfa (PGF2a) es la principal luteolisina en los mamíferos ya que induce la expresión de 20alfa hidroxisteroide deshidrogenasa (20a HSD), que convierte P4 a 20alfadihidrop4, un metabolito inactivo. Nuestro objetivo fue determinar el mecanismo por el cual el hiperT adelanta la luteólisis, para lo que determinamos la expresión de enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo de P4 y los niveles intraluteales y séricos de P4, PGF2a y prostaglandina E2 (PGE2). El hiperT se indujo por inyección sc de T4 (0.25 mg/kg/día), comenzando 8 días antes del apareamiento. En día 19 (G19) y 21 (G21) de gestación se midió TSH, T4 y T3 séricas por RIA. En el ARN luteal se midió por RT-PCR la expresión relativa a L19 de 3beta hidroxisteroide deshidrogenasa (3bHSD) y 20aHSD. En G21 se midió P4, PGF2a y PGE2 sérica e intraluteal por RIA. Hubo aumentos ( $p < 0.05$ ) en T3 en G19 (Co=63.1  $\pm$  3.5 vs HiperT= 151.1  $\pm$  9.0 ng/dL) y G21 (Co= 60.1  $\pm$  4.6 vs HiperT= 132.5  $\pm$  14.6) y T4 séricas en (G19 Co= 1.49  $\pm$  0.1 vs. HiperT= 5.55  $\pm$  0.9  $\mu$ g/dL) y G21 (Co= 1.57  $\pm$  0.12 vs HiperT= 4.91  $\pm$  0.8) y en el ARNm luteal de 20aHSD en G19 (Co= 0.35  $\pm$  0.10 vs. HiperT= 0.82  $\pm$  0.18), sin cambios en 3bHSD. En G21, PGE2 intraluteal (pg/mg) disminuyó (Co= 7.67  $\pm$  2.35 vs. HiperT= 2.33  $\pm$  0.50) y en suero PGF2a aumentó (Co= 3,70  $\pm$  0.70 vs. HiperT= 8,29  $\pm$  0.45 ng/mL) y P4 disminuyó (Co= 70  $\pm$  9 vs. HiperT= 25  $\pm$  8 ng/mL). En conclusión, el adelanto en la luteólisis provocado por el hiperT esta mediado por aumentos en la expresión del mRNA de 20aHSD y de PGF2a sérica y caída en la PGE2 intraluteal, factores que favorecen este proceso.

**0290. (0358) EL ENTORNO HORMONAL MODIFICA LA MICROHETEROGENEIDAD DE CARGA DE FSH EN HÁMSTERES DORADOS.** M Carino<sup>1,2</sup>, G Cónsole<sup>2</sup>, S Gonzalez Calvar<sup>3</sup>, S Rulli<sup>4</sup>, S Campo<sup>4</sup>, R Calandra<sup>1,5</sup>

1 *Instituto de Biología y Medicina Experimental*, 2 *Facultad de Medicina UNLP*, 3 *Facultad de Medicina UBA*, 4 *Centro de Investigaciones Endocrinológicas*, 5 *Instituto Multidisciplinario de Biología Celular*

La FSH presenta diversas isoformas moleculares que difieren en la estructura de sus oligosacáridos y en su biopotencia. El hámster Dorado es una especie estacional y la exposición a fotoperíodos cortos produce un descenso en los niveles de LH, FSH y testosterona (regresión testicular). El objetivo de este trabajo fue caracterizar las isoformas de carga de FSH en hipófisis de hamsters Dorados machos inmaduros (I, 35 d) y adultos (A, 90 d) mantenidos en condiciones lumínicas normales (14hs luz:10hs osc.), y machos adultos sometidos a fotoinhibición (6hs luz:18hs osc.) (AR) durante 14 sem. Los homogenatos hipofisarios fueron fraccionados por isoelectroenfoque (pH 3-10), y se valoró FSH (RIA) en cada fracción. Los resultados obtenidos muestran en cada rango de pH los siguientes porcentajes relativos de FSH: pH4-5: I 1.7 $\pm$ 0.5%, A 33.7 $\pm$ 3.0%, AR 11.8 $\pm$ 1.0% ( $p < 0.01$ ); pH5-6: I 33.3 $\pm$ 3.0%, A 64.8 $\pm$ 3.0%, AR 56.7 $\pm$ 4.0 ( $p < 0.01$  I vs A,AR); pH6-7: I 44.6 $\pm$ 4.0%, A 1.5 $\pm$ 0.5%, AR 25.6 $\pm$ 1.5% ( $p < 0.01$ ). La presencia de glicoproteínas en el extracto hipofisario fue determinada por Western blot y revelado con tinción específica (reacción de Schiff). La fracción glicoproteica fue menor en I y AR con respecto a A. Por inmunohistoquímica se determinó la localización tisular de los gonadotropos y subcelular de las enzimas Sialiltransferasa-6 y -3 (ST6Gal-I, ST3Gal-III). La enzima ST3Gal-III está presente en los gonadotropos en los 3 grupos experimentales con similar valor de área inmunomarcada, mientras que para la enzima ST6Gal-I, fue significativamente superior en A respecto de I y AR ( $p < 0.05$ ). En conclusión, estos resultados sugieren que la heterogeneidad de la FSH hipofisaria del hámster se refleja en un perfil de isoformas de carga que varía en función del entorno hormonal, exhibiendo un aumento de las isoformas más ácidas durante la maduración sexual y la fotoinhibición del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal en concordancia con los niveles relativos de las sialiltransferasas presentes.

**0291. (0199) LA LEPTINA PREVIENE LA APOPTOSIS DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS POR LA ACTIVACIÓN DE LA**

**VIA MAPK.** A Pérez-Pérez<sup>1</sup>, J Maymó<sup>2</sup>, JC Calvo<sup>2,3</sup>, C Varone<sup>2</sup>, V Sánchez-Margalet<sup>1</sup>

*1 Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Universidad de Sevilla. Sevilla. España, 2 Departamento de Química Biológica. FCEN. UBA. Buenos Aires. Argentina, 3 Instituto de Biología y Medicina Experimental. Buenos Aires. Argentina*

La leptina, señal producida por el adipocito para regular el metabolismo energético, puede ser también secretada por la placenta, donde puede jugar un papel como regulador autocrino. Recientemente, hemos demostrado que la leptina promueve la proliferación y la supervivencia de células trofoblásticas. En este trabajo nos propusimos estudiar las vías de transducción de señales que median el efecto trófico de la leptina sobre la placenta, usando la línea celular de coriocarcinoma JEG-3. Hemos analizado la fase temprana de la apoptosis desencadenada por la falta de suero, detectando por citometría de flujo, la exposición de fosfatidilserina en superficie con la tinción de Anexina-V marcada con FITC, simultáneamente con la exclusión de iodo de propidio. También analizamos la activación de caspasa-3 (clivaje proteolítico), por Western blot. Hemos investigado además las principales vías de señalización, y hemos comprobado la importancia relativa de estas vías en el efecto trófico de la leptina usando inhibidores farmacológicos. Hemos encontrado que la leptina estimula la vía JAK-STAT promoviendo la tirosín fosforilación de MEK y MAPK (Erk1/2). La vía PI3K también se dispara en respuesta a la leptina, como demostramos estudiando la fosforilación de PKB. El efecto de leptina sobre la supervivencia de las células JEG-3 se revirtió completamente bloqueando la activación de p43/44 MAPK usando el inhibidor farmacológico de MEK PD98059, mientras que no se afectó por la inhibición de PI3K usando Wortmanina. Estos datos sugieren que los efectos tróficos de leptina sobre la supervivencia de las células trofoblásticas JEG-3 está mediada por la vía p42/44 MAPK.

**0292. (0202) NIVELES DE EXPRESIÓN Y EFECTO DE TGF-BETA1 EN CÉLULAS DE LEYDIG DEL HAMSTER DORADO (MESOCRICETUS AURATUS).** C Gonzalez<sup>1</sup>, MB Frungieri<sup>1,2</sup>, RS Calandra<sup>1,3</sup>, SI Gonzalez Calvar<sup>1,2</sup>

*1 IBYME, CONICET, 2 Facultad de Medicina, UBA, 3 IMBICE, CONICET-CICPBA*

El factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) cumple un rol importante en la modulación de la función gonadal, ya que inhibe la esteroidogénesis, controla la actividad proliferativa de las células progenitoras de las células de Leydig (CL) y estimula la apoptosis. El hámster Dorado presenta ciclos reproductivos estacionales y la exposición a fotoperíodos cortos produce un descenso en los niveles séricos de LH, FSH y testosterona (regresión testicular). El objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de TGF- $\beta 1$ , el receptor TGF- $\beta$ R1 y p15, así como el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA) en CL obtenidas a partir de hámsteres inmaduros (I, 30 días) y adultos (A, 90 días) mantenidos en fotoperíodo normal (14h luz:10 h osc) y adultos expuestos durante 16 semanas a fotoinhibición (AR, 6h luz: 18 h osc). Por inmunohistoquímica se determinó que la expresión de VEGFA y TGF- $\beta 1$  se localiza en CL. Por RT-PCR semicuantitativa se detectó un aumento en la expresión génica de TGF- $\beta 1$  (Densidad Relativa Integrada (DI)= I:1.08, A:0.42, AR:1.57) y TGF- $\beta$ R1 (DI= I:0.55, A:0.72, AR:1.27). La expresión de TGF- $\beta 1$  fue estimulada por melatonina (Mel, 10-5M) en A (DI= basal:0.2, Mel:0.39). La incubación "in vitro" de CL con TGF- $\beta 1$  1ng/ml indujo la expresión de VEGFA en I sin cambios en A y AR. Además, p15 (factor inhibidor de CDK4 regulado por TGF- $\beta 1$ ) aumentó a tiempos cortos en AR y largos en I. Dosis altas de TGF- $\beta 1$  (10ng/ml) no produjeron cambios apreciables en la expresión de VEGFA en I, A y AR, mientras que la expresión de p15 aumentó en A y AR. En conclusión, estos estudios sugieren que Mel podría ser responsable de la mayor expresión basal de TGF- $\beta 1$  observada en AR. Además, los niveles basales de TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta$ R1 y p15, así como a la respuesta al estímulo con TGF- $\beta 1$  en los

niveles de expresión de p15, indicarían que la acción de TGF- $\beta 1$  sobre la funcionalidad de la CL sería de importancia en la regresión gonadal.

**0293. (0111) ACCION DEL HIPERTIROIDISMO SOBRE EL METABOLISMO LIPIDICO MAMARIO Y LA CALIDAD DE LA LECHE EN RATAS LACTANTES.** C Alvarez<sup>1</sup>, MB Hapon<sup>1,2</sup>, GA Jahn<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CONICET., 2 Instituto de Cs. Básicas, Un. Nac. de Cuyo*

El hipertiroidismo (HiperT) afecta el equilibrio hormonal durante la gestación y la lactancia, y disminuye el crecimiento de los neonatos. Ratas tratadas crónicamente con dosis altas de T4 tienen conducta maternal deficiente y bloqueo de la lactancia con muerte de las crías. Con dosis moderadas de T4 (0.1 mg/kg/día) pueden mantener la lactancia, pero las camadas tienen una tasa reducida de crecimiento, causada por bloqueo parcial de la eyección láctea e involución prematura de la glándula mamaria (GM). Con el objetivo de determinar el efecto del HiperT en la rata Wistar sobre el metabolismo lipídico y su impacto sobre la lactancia se trataron las ratas con 0.1 mg/kg/día T4 s.c. desde 8 días antes del inicio de la preñez. Los días 2, 7 y 14 de lactancia (L2, L7, L14) evaluamos la tasa de crecimiento de las crías, las concentraciones de glucosa, triglicéridos, colesterol y PRL séricos y de lactosa, proteínas y triglicéridos (tg) en leche y la expresión de enzimas involucradas en la síntesis de tg (ACC, FAS y LPL) en GM por RT-PCR en las ratas madres. El crecimiento de las crías hiperT disminuyó a partir de L7 ( $p < 0.01$ ). Los tg (Co=  $0.76 \pm 0.1$ , HiperT=  $0.40 \pm 0.1$  mg/dl), colesterol (Co=  $0.54 \pm 0.03$ , hiperT=  $0.38 \pm 0.02$  mg/dl) y PRL (Co=  $56 \pm 21$ , HiperT=  $3 \pm 1$  ng/ml) séricos disminuyeron ( $p < 0,05$ ) en L15. En leche la lactosa disminuyó en L14 (Co=  $3.87 \pm 0.2$ , hiperT=  $2.05 \pm 0.4$  mg/ml), aumentaron las proteínas en L2 (Co=  $5.7 \pm 0.5$ , HiperT=  $8.8 \pm 0.9$  mg/ml) y los tg disminuyeron en L7 (Co=  $7.1 \pm 1.0$ , HiperT=  $4.0 \pm 0.8$  mg/ml). En GM disminuyó la expresión de ACC (Co=  $0.92 \pm 0.27$ , HiperT=  $0.31 \pm 0.05$ ) y de LPL (Co=  $55.9 \pm 12.7$ , HiperT=  $9.1 \pm 4.8$ ). En conclusión, el HiperT materno reduce PRL y tg circulantes y la capacidad de la GM de captar y sintetizar lípidos y posiblemente lactosa, produciéndose leche de menor valor nutritivo. Esto, junto al bloqueo parcial de la eyección láctea, serían responsables del pobre crecimiento de las crías.

**0294. (0328) CORRELACION ENTRE ALTERACIONES EMBRIO-PLACENTARIAS Y VARIACIONES EN LOS NIVELES DE OXIDO NITRICO LUEGO DE LA EXPOSICION MATERNA DE ALCOHOL.** T Coll<sup>1</sup>, C Hofmann Orsetti<sup>1</sup>, V Fontana<sup>2</sup>, E Cebral<sup>3</sup>

*1 Lab. Biología del Desarrollo. Dept. Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA., 2 Depto. Química Biológica, FCEN-UBA, 3 DBBE/FCEN-IFIBYNE-CONICET/UBA. Buenos Aires, Argentina*

La morfogénesis del tubo neural (TN) y el desarrollo veloso del laberinto decidual requieren adecuados niveles de óxido nítrico (NO). Para estudiar el rol del NO en alteraciones de la interacción materno-embriónica inducidas por el consumo perigestacional de alcohol (OH), analizamos la localización/distribución de las sintasas eNOS, nNOS e iNOS y la producción de NO en embrión (E) y decidua (De) asociados con anomalías del E y del sitio de implantación (SI). Se trataron hembras murinas con 10% de OH por 15 días y durante la gestación hasta el día 10 de preñez (T). Los controles recibieron agua (C). En los SI-T, se detectó menor decidualización y crecimiento de las velosidades, colapso de espacios intervellosos y células gigantes del trofoblasto anormales. Comparando con los SI-T, la expresión de las isoformas NOS (inmunohistoquímica) fue menor en decidua, velosidades y placa coriónica, viéndose cambios en la distribución NOS citotrofoblástica. La producción in vitro de nitritos (Ns) (Griess) por la De-T disminuyó respecto de las De-C ( $p < 0.05$ ). En las T, se detectó un elevado % de embriones organogénicos con TN abierto (5,4% vs 23,5%,  $p < 0,001$ ) o con cierre defectuoso (4%

vs 12%,  $p < 0,001$ ), neuroepitelio desorganizado con bajo Nro. mitótico ( $p < 0,01$ ) (H-E), tamaño cefálico reducido (Scanning) y menor % de TN nNOS-inmunoreactivos. Los niveles endógenos e in-vitro de Ns embrionarios resultaron menores que los C ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ ). Sin embargo, observamos elevado % de embriones-T con intensa tinción para actividad NOS endógena (reacción NADPH-diaforasa). En conclusión, la exposición periconcepcional de OH induce neurodegeneración del TN cefálico, deficiencia de NO, desregulación de la expresión/actividad de la NOS embrionaria probablemente por defectos en la placentación, por alteraciones del NO, distribución anómala e inhibición parcial de la actividad de la NOS del laberinto veloso y tejido decidual.

## PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR I

**0295. (0511) PARTICIPACIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) Y LA PROTEÍNA QUINASA C ATÍPICA (PKC)ZETA EN LA APOPTOSIS DE LINFOCITOS T MURINOS MEDIADA POR HORMONAS TIROIDEAS.** ML Barreiro Arcos<sup>1</sup>, H Sterle<sup>1</sup>, AJ Klecha<sup>1,2</sup>, C Vercelli<sup>3</sup>, AM Franchi<sup>3</sup>, AM Genaro<sup>1,2</sup>, GA Cremaschi<sup>1,2</sup>

*1 Lab. de Inmunofarmacología, CEFYBO-CONICET-UBA, 2 Cátedra de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 3 Lab. de Inmunología Reproductiva, CEFYBO-CONICET-UBA*

Las hormonas tiroideas (HTs) regulan la respuesta inmune y modulan la proliferación y diferenciación en varios tipos celulares, pero sus acciones directas sobre los linfocitos aún no han sido esclarecidas. Previamente demostramos in vitro que el cultivo a corto plazo (hasta las 72 hs) con HTs induce la división celular del linfoma T murino BW 5147 (BW) en estado quiescente. En este trabajo estudiamos las acciones de las HTs sobre las células BW cultivadas en presencia de tiroxina (T4) o triiodo-tironina (T3) por tiempos prolongados y las señales intracelulares desencadenadas. Después de los 5 días de cultivo, las HTs inhibieron la proliferación (%inh:  $38.3 \pm 3.0$ ,  $p < 0.01$ ) e indujeron apoptosis en la línea celular, observado mediante tinción con Hoechst (%cél apoptóticas vs control:  $>30\%$ ). La apoptosis celular fue corroborada por la técnica de DNA ladder. Estos efectos fueron acompañados por un incremento en la actividad de NOS medida por conversión de [14C]-Arginina en [14C]-citrulina (Act. NOS (pmol/107cel), Basal:  $95 \pm 8.0$  vs T4:  $217 \pm 19.1$ ,  $p < 0.01$ ). Asimismo hemos encontrado por western blot y por RT-PCR un incremento en los niveles proteicos y de ARN mensajero de iNOS y una disminución en los de la isoforma atípica PKCzeta. A tiempos prolongados de cultivo, hemos hallado un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS) que fue determinado por conversión de diclorofluoresceína-diacetato a su forma fluorescente (IFM, Basal:  $10 \pm 0.9$  vs T4:  $18 \pm 1.6$ ,  $p < 0.01$ ). Adicionalmente, las HTs indujeron un incremento en la nitrosilación de proteínas. Estos resultados muestran que la exposición prolongada de las células BW a las HTs lleva a un incremento exacerbado en la actividad de iNOS, que podría resultar en una disminución de la expresión de PKCzeta probablemente a través de la nitrosilación proteica. Estas señales intracelulares podrían disparar mecanismos apoptóticos a través de los cuales las HTs podrían regular la actividad linfocitaria.

**0296. (0262) LA QUINASA DEPENDIENTE DE AMP CÍCLICO MEDIA LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEPRIVACIÓN DE GLUCOSA EN CÉLULAS HEPÁTICAS.** AC Ferretti, C Favre, JM Pellegrino, MC Larocca

*Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, CONICET, Universidad Nacional de Rosario*

La glucólisis y la apoptosis son procesos conservados evolutivamente, que cuentan con una fina regulación. Ambas vías se conectan en diferentes niveles, aunque la relación no está to-

talmente dilucidada. Los hepatocitos tienen un rol clave en el metabolismo de la glucosa. La quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) media la modulación de diversas funciones del hepatocito, siendo asegurada su especificidad a través de la compartimentalización por sus proteínas de anclaje (AKAPs). Nuestro objetivo fue estudiar si la privación de glucosa induce apoptosis en cultivo primario de hepatocitos o en células hepáticas inmortalizadas, y si PKA está involucrada en la vía. Hepatocitos de rata y células HepG2 derivadas de hepatocarcinoma fueron incubados durante 6 h en presencia (C) o ausencia (Glc0) de glucosa, con o sin el inhibidor de PKA H89. La viabilidad celular, evaluada por la exclusión del colorante Azul de Tripán y por la liberación de lactato deshidrogenasa, no difirió entre grupos. La falta de glucosa indujo la activación de la Caspasa 3 en cultivo primario de hepatocitos (C:  $8.6 \pm 1.8$  pmol producto/min/mg proteína (pUA/mg); Glc0:  $12.0 \pm 2.2$  pUA/mg;  $p < 0.05$ ) pero no en células HepG2. Este efecto fue prevenido por la incubación con H89 (C + H89:  $7.6 \pm 4.7$  pUA/mg; Glc0 + H89:  $7.0 \pm 2.7$  pUA/mg). Estos resultados fueron consistentes con el análisis microscópico de fragmentación nuclear por tinción con DAPI. Nuestros estudios indican que la privación de glucosa induce apoptosis en hepatocitos normales, pero no en células HepG2, y que PKA participa en la activación de esta vía de muerte celular. Existe un complejo ensamblado por la AKAP WAVE-1 en mitocondrias hepáticas que asocia la glucoquinasa, enzima clave en la utilización de la glucosa por el hepatocito, PKA, y la proteína proapoptótica BAD. En estudios futuros analizaremos si este complejo tiene un rol en la integración del metabolismo de la glucosa y la apoptosis en hepatocitos normales.

**0297. (0762) EFECTO ANTIAPOPTÓTICO DE ERITROPOYETINA EN CÉLULAS NEURONALES INDUCIDAS A DIFERENCIACIÓN.** S Wenker, N Pregi, D Vittori, A Nesse

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

El rol biológico de la eritropoyetina (Epo) se expandió por el hallazgo de receptores específicos en tejidos no hematopoyéticos. Si bien la Epo constituye un factor importante en la protección celular frente a estímulos apoptóticos, poco se sabe de su participación durante la diferenciación neuronal. El objetivo de este trabajo es estudiar si la acción antiapoptótica de la Epo sobre células neuronales de la línea SH-SY5Y se relaciona con el estadio de diferenciación celular inducida por ácido retinoico (AR) o por staurosporina (STP). Los cambios morfológicos observados por técnicas de microscopía óptica y electrónica de barrido demostraron que ambos, AR ( $10$  o  $30 \mu\text{M}$ , 7 d) y STP ( $25 \text{ nM}$ , 12 h), inducen diferenciación celular (C  $4 \pm 4,3\%$ ; AR  $79 \pm 1,9\%$ ; STP  $75 \pm 1,9\%$ ,  $p < 0,05$ ). Estos cambios coincidieron con el aumento de la expresión de los marcadores de diferenciación GAP-43 y Bcl-2, evaluada por RT-PCR. La apoptosis fue determinada por Ladder y tinción con Hoechst. El tratamiento con STP produjo un aumento significativo de células apoptóticas (STP  $51,9 \pm 3,1\%$  vs. C  $14 \pm 2,0\%$   $p < 0,05$ ), efecto no observado en presencia de AR (AR  $9,5 \pm 0,8\%$ ). Más aún, la diferenciación por AR aumentó la resistencia a la muerte celular inducida por STP (AR-STP  $22,6 \pm 1,7\%$  vs. STP  $p < 0,05$ ). El pretratamiento con Epo ( $25 \text{ U/ml}$ , 12 h) también previno significativamente la acción apoptótica de STP, tanto en células indiferenciadas como en aquellas diferenciadas por acción de AR (Epo-STP  $24,8 \pm 4,1\%$ ; AR-Epo-STP  $23,5 \pm 0,5\%$  vs. STP  $p < 0,05$ ). Mientras que la acción protectora de AR se vería explicada por un aumento de Bcl-2, el efecto de Epo se basaría en la expresión de Bcl-xL y en la actividad de la vía PI3K. En conclusión, los resultados expuestos indican que la diferenciación celular no alteraría el efecto antiapoptótico de la Epo. Además, las vías involucradas en la diferenciación neuronal por AR y STP presentan efectos opuestos en la inducción de muerte de células SH-SY5Y por apoptosis.

**0298. (0656) APOPTOSIS EN ACINOS AISLADOS DE GLANDULAS SUBMAXILARES DE RATONES NOD: ROL DE TNF-ALFA, NFKB Y VIP.** M Calafat<sup>1</sup>, L Larocca<sup>1</sup>, V Roca<sup>1</sup>, N Pregi<sup>1</sup>, A Nesse<sup>1</sup>, N Dusetti<sup>2</sup>, C Perez Leiros<sup>1</sup>

1 Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA-CONICET, 2 Inserm U.624, Marsella, Francia

El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune caracterizada por alteraciones histológicas y funcionales de las glándulas exócrinas, se propone que un fallo funcional y/o una apoptosis inapropiada en glándulas salivales podría iniciar la respuesta autoinmune. En trabajos previos demostramos un aumento en la apoptosis de glándulas submaxilares y en los niveles de TNF-alfa en suero de los ratones NOD. TNF puede inducir apoptosis en algunos tipos celulares. La activación del factor de transcripción NFκB participa en la vía de señalización de TNFα induciendo la expresión de genes blanco pro y anti apoptóticos. El VIP (péptido intestinal vasoactivo) es un neuropéptido prosecretorio y antiinflamatorio común a los sistemas nervioso e inmune. Nuestro objetivo fue estudiar la participación de TNF-alfa en la apoptosis temprana de acinos aislados de glándulas submaxilares de ratones NOD, el rol de NFκB y la posible regulación por VIP. Se emplearon hembras de 16 semanas, la apoptosis se determinó por Hoescht y por expresión de bax y TP 53INP1 (RT-PCR y Western Blot). Receptor 1 de TNF (rTNF1) por PCR e iNOS por inmunohistoquímica. Observamos que TNF-alfa indujo apoptosis en forma concentración dependiente con un mayor porcentaje a 5 ng/ul en acinos NOD vs control BALB/c y mayor expresión de bax (unidades arbitrarias de área-UA: X±ES; BASAL 51±4; TNF 107±5 p<0.05) y de TP53. En los NOD se observó una activación basal de NFκB con falta de respuesta al TNF (p65 translocada, UA X±ES BALB BASAL 60±4; TNF 126±11\*; NOD BASAL 129±12\*; TNF 120±9; \*p<0.05 vs BASAL BALB). En cambio, no se observaron diferencias en la expresión de rTNF1 e iNOS. El tratamiento con VIP (10-7) inhibe la inducción de bax por TNF (UA: X±ES; TNF 107±5; VIP 51±4; p<0.05) y tp53 sólo en NOD y de rtnf1 en ambos. En acinos de ratones NOD con una activación basal de NFκB, TNF induce apoptosis a menor concentración junto con un incremento de TP53 y bax. VIP inhibe la expresión de estos mediadores.

**0299. (0156) LA DISMINUCIÓN DEL COACTIVADOR RAC3 EN CÉLULAS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA LAS SENSIBILIZA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TRAIL.** GP Colo, MF Rubio, CV Alvarado, MA Costas

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, IDIM-CONICET

El coactivador de receptores nucleares RAC3 se encuentra sobre-expresado en varios tumores y juega un rol importante en distintos procesos biológicos. Demostramos previamente que RAC3 se encuentra sobre-expresado en una línea leucémica mielóide crónica (K562), la cual es resistente al tratamiento con la citoquina de la familia de TNF, TRAIL. Por medio de la técnica de RNA de interferencia (RNAi), disminuimos los niveles endógenos de RAC3 en clones estables de K562 y observamos un aumento del 71±3% de la apoptosis inducida por TRAIL a las 24 horas. En este trabajo demostramos por medio de la técnica de citometría de flujo, usando anticuerpos específicos para los receptores DR4 y DR5, que la disminución de RAC3 por RNAi involucra un aumento de estos receptores. Mediante la técnica de western blot observamos un aumento en la formación del DISC; activación de Bid, caspasas y PARP. La activación de la vía mitocondrial se midió con el fluorocromo DiOC6 por citometría de flujo y observamos una pérdida en el potencial de la membrana mitocondrial del 69±2%. Mediante la técnica de western blot se detectó un aumento en la liberación de citocromo c, AIF y Smac/DIABLO al citoplasma en los clones estables con bajos niveles de RAC3, comparados con células control de K562. Se determinó la actividad de NF-κappaB por Elisa, observamos una disminución del 48±3% en la activación de NF-κappaB, de acuerdo a lo previamente descrito por nuestro grupo, donde RAC3 además de ser coactivador de los receptores esteroideos, es coactivador de NF-κappaB. Concluimos que la sobre-expresión del coactivador RAC3 en K562, contribuye en la resistencia al tratamiento con TRAIL de células leucémicas y su función anti-apoptótica es independiente al rol conocido como coactivador de receptores hor-

monales. RAC3 estaría contribuyendo al desarrollo tumoral y podría ser un posible blanco para futuras terapias en tumores dependientes o no de hormonas.

**0300. (0750) ROL DE LA CA2+-CALMODULINA KINASA II EN LA MUERTE CELULAR INICIADA POR ANGIOTENSINA II.** J Palomeque, CA Valverde, JO Velez Rueda, MA Salas

Centro de Investigaciones Cardiovasculares

La Angiotensina II (Ang II) y la proteína quinasa dependiente de Ca2+ y Calmodulina (CaMKII) son moléculas que independientemente se las ha vinculado con la regulación de la homeostasis del Ca2+, modulando así el acoplamiento excito-contráctil, y con la muerte celular, contribuyendo a la pérdida de unidades contráctiles en el corazón. Ambos procesos, contractilidad alterada y apoptosis, contribuyen a la disfunción contráctil observada en el corazón insuficiente. Además, en la insuficiencia cardíaca tanto los niveles de Ang II como la actividad de CaMKII se encuentran elevados. La Ang II a través del aumento de Ca2+i que produce podría activar a la CaMKII y de esta manera iniciar cascadas de señales apoptóticas que vinculen una molécula con la otra. Más aún, la CaMKII podría también activarse por estrés oxidativo y PKC, moléculas también producidas por Ang II. Sin embargo esta hipótesis no se ha comprobado hasta el momento. Con el fin de evaluarla, realizamos cultivos de miocitos aislados de gatos adultos por 24h en condiciones controles, tratados con Ang II (1μM) y con Ang II + KN-93 (1μM), un inhibidor específico de la CaMKII. Evaluamos la viabilidad celular y la activación de CaMKII por Western blot de P-CaMKII y de P-Thr17 de fosfolamban, un sustrato de la CaMKII activada, y por inmunohistoquímica. El tratamiento con Ang II produjo muerte celular en un 64.6±3.6% de las células tratadas con la hormona, vs 29.4±3.3% de las células controles (p<0.05). La mortalidad celular inducida por Ang II fue anulada por el tratamiento concomitante de los miocitos con el inhibidor de CaMKII. El aumento de la actividad de CaMKII que se asoció con la muerte celular inducida por Ang II, se detectó por inmunofluorescencia y a través de un aumento del 32.6±5.6% en P-CaMKII (p<0.05) y el concurrente aumento en P-Thr17. Estos resultados establecen un vínculo previamente desconocido entre la Ang II y la CaMKII en la vía de señalización para la muerte de células cardíacas.

**0301. (0355) BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE SURVIVINA EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO Y SU EFECTO SOBRE EL ÍNDICE DE APOPTOSIS.** IS Cogno, NB Rumie Vittar, VA Rivarola

Departamento Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Survivina, miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), actúa como mediador entre la apoptosis y la división celular. Se encuentra selectivamente expresado en la mayoría de los cánceres humanos y no en tejidos normales adultos. Estas características hacen a survivina un potencial candidato como blanco en tratamientos anticancerígenos. El objetivo de este estudio fue determinar el modelo apropiado para el silenciamiento contra survivina en células de cáncer de mama humano y estudiar el efecto que produce sobre el mecanismo y los niveles de apoptosis. Con tal propósito, se transfectaron vectores de expresión eucariota a células de carcinoma mamario (T47D). Los análisis de Western Blot (WB) revelaron una marcada inhibición de los niveles de survivina en las células T47D, en comparación a las células transfectadas con el plásmido control. El siguiente paso fue investigar el efecto de la inhibición de survivina sobre la apoptosis, considerándose este mecanismo como funcionalmente afectado en las células tumorales. A pesar de que los cultivos transfectados mostraron diferente eficiencia en la inhibición de la expresión de la IAP, el incremento en el índice de apoptosis (citometría de flujo) resultó significativamente mayor con respecto a los cultivos controles. Debido a que se observó translocación del factor inductor de la apoptosis (AIF) hacia el núcleo (microsc-

copia confocal) y no se evidencio activación de Bid ni caspasa-3 (WB), es posible que el mecanismo implicado en la inducción del proceso apoptótico sea a través de la vía independiente de caspasas. En conclusión, la inhibición de survivina en células de carcinoma mamario promovió el proceso de apoptosis a través de un mecanismo que no involucraría la participación de caspasas.

**0302. (0205) PARTICIPACION DEL COACTIVADOR RAC3 Y DE LA CICLINA D1 EN LA PROGRESION TUMORAL.** MF Rubio, CV Alvarado, GP Colo, MA Costas

*Instituto de Investigaciones Medicas Dr A Lanari, Lab BMyA*

Se ha visto que el coactivador RAC3 estaría involucrado en la progresión del ciclo celular. Mientras que en trabajos previos hemos demostrado que, vía un complejo conteniendo al ER y NF- $\kappa$ B, modula la expresión de Ciclina D1 en células de tumor mamario y además observamos que CD1 no solo interacciona con el factor de transcripción NF- $\kappa$ B sino que es capaz de modular negativamente su actividad de manera dosis dependiente. En este trabajo quisimos determinar si este efecto era contrarrestado, ya sea por la sobreexpresión de RAC3 (20 ng) o por la inhibición de deacetilasas (30 nM TSA), para ello se realizaron ensayos reporteros donde pudimos observar que el efecto de inhibición mediada por CD1 (a 100 ng 60% de inhibición) se ve revertida (TSA 64185 $\pm$  3940 vs 106362  $\pm$  10822 y RAC3 28059  $\pm$  4296 vs 59070  $\pm$  8021) en ambos casos. Esto podría implicar que existiría una modulación temporal de reclutamiento de complejos a nivel del promotor y para corroborar esto se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina de las secuencias  $\kappa$ B del promotor de CD1 observándose que dicho reclutamiento existe y que NF- $\kappa$ B y CD1 son reclutadas al promotor en forma sincrónica. Para determinar como sería la respuesta proliferativa cuando RAC3 y/o CD1 son sobreexpresados realizamos ensayos de proliferación en la línea no tumoral HEK 293 transfecteda con plásmidos expresando una o ambas proteínas y observamos que la presencia de ambos tendrían un efecto antagónico sobre la proliferación celular a 24 hs (CD1 0,294  $\pm$  0,073, RAC3 0,608  $\pm$  0,098 vs CD1 + RAC3 0,066  $\pm$  0,014). Dado que el coactivador RAC3 se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de tumores y día a día su importancia en el desarrollo de los mismos aumenta, encontrar de que manera esta interaccionando con otras proteínas que están involucradas en la progresión tumoral ayuda al entendimiento y al diseño de nuevas estrategias para su tratamiento.

**0303. (0387) LA PROTEÍNA DE AUTOFAGIA VMP1 INTERACTÚA CON LA PROTEÍNA S100A10. ESTUDIO REALIZADO MEDIANTE LA ESTRATEGIA DE DOBLE HÍBRIDO.** R Pardo, A Lo Re, ML Sacchetti, MI Vaccaro

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

El gen VMP1 (Vacuole Membrane Protein 1) se caracterizó por su temprana y fuerte expresión durante la fase aguda de la pancreatitis. VMP1 es necesaria en la autofagia y su expresión induce la formación de autofagosomas. Con el objetivo de analizar a nivel molecular la función de VMP1 se buscaron proteínas interactoras utilizando la estrategia de Doble Híbrido. Este sistema *in vivo* se basa en poner en contacto la proteína en estudio con cada una de las proteínas que se expresan en una línea celular. Se amplificaron por PCR 4 fragmentos correspondientes a los dominios hidrofílicos de VMP1 y se subclonaron en el vector pSOS. Se realizaron 3 experimentos de Doble Híbrido con cada uno de los fragmentos de VMP1 utilizando una biblioteca de células Hela. Los clones positivos validados, se amplificaron por PCR y luego se purificaron y secuenciaron. De los 94 clones positivos obtenidos se identificaron 11 proteínas interactoras S100A10, EIF, EEF1G, FADD, HSPA5, Alpha-1 Fucosidase, Ribosomal protein S10, Kinesin 2, TARBP2, LARP1 y USP9X. Para cada interactor encontrado se realizó una búsqueda bibliográfica y se seleccionaron los que se relacionan con el posible rol de VMP1. Comenzamos nuestros estudios con la proteína S100A10 porque se en-

cuentra sobre-expresada en tumores pancreáticos y se relaciona con el transporte vesicular. Mediante ensayos de "pull-down" confirmamos su interacción con VMP1. Analizamos por microscopía confocal el efecto de la interacción VMP1-S100A10 sobre la formación de autofagosomas, utilizando como marcador el reclutamiento de la proteína de fusión fluorescente pRFP-LC3. Encontramos que la sobre-expresión de S100A10 disminuyó significativamente ( $p = 0.05$ ) el agrupamiento de LC3 inducido por la sobre-expresión de VMP1. En conclusión nuestros resultados permitieron seleccionar un grupo de genes que potencialmente interaccionan con VMP1 *in vivo* y demostraron que la interacción VMP1-S100A10 disminuye la formación de autofagosomas.

**0304. (0371) DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MATRIZ DE POLI (ÉPSILON-CAPROLACTONA) PARA INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO.** JM Fernández<sup>1</sup>, AM Cortizo<sup>2</sup>, MS Cortizo<sup>3</sup>

*1 Bioquímica Patológicas, INIFTA, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 2 Bioquímica Patológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 3 INIFTA, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata*

El uso de técnicas de ingeniería de tejidos a hecho posible la reparación del tejido óseo. La poli (epsilon caprolactona) es un polímero usado en como scaffold en reconstrucción de tejidos, o como liberador de fármacos. Es biocompatible, biodegradable, no tóxico y posee una tasa de degradación menor que otros polímeros usados (por ejemplo: poliláctico) tanto *in-vitro* como *in-vivo*. Desarrollamos y caracterizamos dos películas de poli (epsilon caprolactona) y comparamos sus propiedades de degradación y biocompatibilidad con osteoblastos en cultivo. Las películas fueron obtenidas por casting (12%*p/v*) a partir de cloroformo (Film-C) o trifluoroetanol (Film-T). Los osteoblastos MC3T3E1 se plaquearon e incubaron a 37 °C por diferentes períodos de tiempo. Se evaluó la morfología celular, la adhesión (a 1h de incubación), el crecimiento celular (24h) (conteo de células teñidas con Giemsa) y la expresión del marcador osteoblástico fosfatasa alcalina (48h, método de p-NPP). Se utilizó un disco de plástico como control. Las características de las superficies se evaluaron por microscopía electrónica de barrido. El ensayo de degradación se hizo a 37 °C en buffer fosfato-100  $\mu$ g/ml Albúmina. Los pesos moleculares fueron medidos por Cromatografía de Exclusión Molecular. El Film-T mostró mayor capacidad de interacción con las células que el Film-C, pero crecen mejor en este último. Estas características se atribuyen a las diferencias superficiales observadas. El estudio de degradación no mostró cambios significativos en el peso molecular promedio en el período de tiempo analizado, pero sí un aumento en el índice de polidispersidad, indicando aparición de cadenas más cortas. Las películas desarrolladas mostraron buena biocompatibilidad, sin toxicidad y lenta degradación, los que las haría adecuadas para su en ingeniería de tejido óseo.

Tratamiento	Adhesión	Proliferación	Diferenciación
Control	100 +/- 10	100 +/- 8	100 +/- 7
Film-C	166 +/- 17	113 +/- 7	82 +/- 2
Film-T	217 +/- 17	79 +/- 5	69 +/- 10

**0305. (0247) CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO EQUINO: CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO CELULAR Y SU DIFERENCIACIÓN OSTEOGÉNICA Y ADIPOGÉNICA.** AJ Cardozo, LE Benedetti, PF Argibay

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

**Introducción:** Un potencial modelo de fisiología regenerativa de trauma por grandes esfuerzos es el caballo deportivo, el cual presenta lesiones traumáticas que remedan las asociadas al alto rendimiento en humanos. Las células stem mesenquimales (MSCs) son una fuente celular atractiva para el tratamiento de lesiones. **Objetivo:** Aislar MSCs de tejido adiposo equino

(eMSCs), caracterizarlas, y evaluar su potencial adipogénico y osteogénico, con el fin de inyectarlas en animales modelo de traumas de partes blandas. **Materiales y Métodos:** Las eMSCs (n=17) se obtuvieron por digestión enzimática y adherencia al plástico. Se evaluó su viabilidad, y fueron cultivadas y diferenciadas adipogénica y osteogénicamente con factores específicos para cada linaje. Se colorearon con Oil Red O y Alizarin Red para evidenciar lípidos y depósitos de calcio característicos del tejido adiposo y óseo, respectivamente. La fracción estromal-vascular se implantó localmente en tendinitis y desmitis (n=6) y la evolución se controló con ecografías mensuales. **Resultados:** Las eMSCs presentaron buena adherencia y una viabilidad del  $81.2 \pm 4.8\%$ . El análisis morfológico durante la diferenciación, reveló cambios característicos de tejido adiposo (vacuolas) y óseo (cristales). Con Oil Red O se observó que  $31.5 \pm 7.5\%$  de las eMSCs se diferenciaron adipogénicamente; y con Alizarin Red se detectó que  $60.3 \pm 4.8\%$  de las células se diferenciaron a un linaje osteogénico. En los casos de tendinitis/desmitis se observaron importantes cambios y reparación de la lesión luego del implante, mientras que antes del mismo habían permanecido estáticas. **Conclusiones:** La morfología y el potencial de diferenciación adipogénica y osteogénica de las eMSCs son similares a aquellas documentadas en otras especies. Como los estudios in-vivo mostraron un importante efecto regenerativo en el caso de lesiones tendinosas de difícil cicatrización, estos animales serían un buen modelo de fisiología regenerativa de partes blandas.

**0306. (0801) EFECTO DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS SOBRE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y APOPTOSIS EN HÍGADO Y TIROIDES DE RATA.** FA Chiappini, L Alvarez, R Kólliker, F Strawich, A Randi, DL Kleiman de Pisarev

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

El hexaclorobenceno (HCB), un pesticida organoclorado, desencadena porfiria, efectos neurotóxicos, inmunológicos y disfunciones reproductivas y tiroideas. En ratas induce enzimas microsomales hepáticas, y cáncer de hígado, mama y tiroides. Demostramos que el HCB (1000 mg/Kg p.c.) induce hipotiroxinemia y aumento de TSH, sin cambios en el peso tiroideo. Aumenta el peso del hígado, sin alterar el status tiroideo hepático. **Objetivo:** analizar el efecto del HCB sobre parámetros regulatorios de la proliferación celular en hígado y tiroides de ratas Wistar hembras, tratadas durante 30 días con HCB (0,5; 5; 50 y 500 mg/Kg p.c.). El HCB altera la histomorfología tiroidea, la apoptosis y el contenido de proteínas pro y anti apoptóticas, y aumenta la expresión del gen del TGF  $\beta$ 1. Nuestro objetivo fue analizar en tiroides de rata, si la vía apoptótica mitocondrial está involucrada, evaluando: a) la fragmentación del DNA (TUNEL), b) los niveles del citocromo C y de Caspasa 9 (Westernblot). En hígado analizaremos el efecto del HCB sobre: a) marcadores de proliferación celular por inmunoblot con anti-PCNA, b) la apoptosis y c) los niveles del citocromo C, (Westernblot). **Resultados:** En tiroides se observó un aumento en: a) el número de núcleos apoptóticos en función de la dosis, de 600, 660, 305 y 280% con HCB (0,5; 5; 50 y 500, respectivamente,  $p < 0,05$ ); b) los niveles de citocromo C (50%,  $p < 0,05$ ; 109% y 115%,  $p < 0,001$ ) en HCB 0,5; 5 y 50 respectivamente, y c) los niveles de caspasa 9 (150%,  $p < 0,05$  y 287%,  $p < 0,01$  en HCB 5 y 50, respectivamente. En hígado el HCB: a) aumentó la proliferación celular 218%, con HCB 500;  $p < 0,001$ ; b) aumentaron los núcleos apoptóticos, 320, 140 y 50% con HCB (0,5; 5 y 50 respectivamente,  $p < 0,05$ ) y no se alteraron los niveles de citocromo C. **Conclusión:** El aumento de la apoptosis inducido por el HCB involucra la vía mitocondrial en tiroides, mientras que en el hígado la apoptosis no involucraría esta vía.

**0307. (0576) ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DE CÉLULAS DEL SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO EXPUESTAS A IONES COBRE.** N Arnal<sup>1</sup>, MA Reigosa<sup>2</sup>, MA Fernández Lorenzo<sup>1</sup>

*1 INIFTA, 2 IMBICE*

Los dispositivos intrauterinos (DIU) que contienen cobre son ampliamente usados y basan su funcionamiento anticonceptivo en la inflamación del endometrio que se genera a partir de la liberación de iones cúpricos. Por dicha razón se estudió el efecto citotóxico de los iones cobre sobre células del sistema reproductor femenino (células de ovario de Hamster Chino; CHO-K1). Se realizaron 2 experiencias (exp.D y exp.E) empleando discos de cobre puro. En ambas se agregaron  $2,5 \times 10^4$  células totales. En las exp.D, el disco de cobre se colocó en el centro de cápsulas de Petri, a la que seguidamente se le agregaron las células, mientras que en las exp.E, las células se expusieron a extractos provenientes de la disolución de los discos en el medio de cultivo Ham F-10. Los controles se realizaron con el mismo número de células a las que sólo se les agregó medio de cultivo Ham F-10. Se determinó el número de células vivas luego de distintos tiempos de exposición (entre 3 y 48 h) tanto al disco como a los extractos. La viabilidad celular fue determinada en función de la distancia al disco de cobre y al tiempo de exposición en las exp.D, y sólo en función del tiempo en las exp.E. Con ese fin se empleó una mezcla 1:1 de bromuro de etidio y naranja de acridina y se utilizó microscopía de epifluorescencia. Pudo concluirse que los iones cobre ejercen un notable efecto citotóxico sobre las células, evidenciado a través de la disminución de la adhesión celular y del número de supervivientes. Se notaron ciclos de crecimiento de los cultivos celulares que podrían implicar cierta capacidad de las células para adaptarse a los incrementos de concentración de iones cobre. En el caso de la exp.D dicho efecto también aumentó con la cercanía al disco de cobre.

**0308. (0062) EVALUACIÓN DE FOCOS NUCLEARES (GAMMA H2AX) EN CÉLULAS IRRADIADAS CON PROTONES Y IONES DE LITIO.** C Bracalente<sup>1</sup>, A Maglioco<sup>2</sup>, B Molinari<sup>1</sup>, M Palmieri<sup>3</sup>, H Durán<sup>1</sup>, I Ibañez<sup>4</sup>, A Kreiner<sup>4</sup>, A Burlón<sup>4</sup>, A Valda<sup>4</sup>, J Davidson<sup>4</sup>, M Davidson<sup>4</sup>, M Vázquez<sup>4</sup>, M Ozafrán<sup>4</sup>, M Muhlmann<sup>2</sup>

*1 Departamento de Radiobiología, Comisión Nacional de Energía Atómica, 2 Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas, 3 Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 4 Departamento de Física, Comisión Nacional de Energía Atómica*

Las propiedades especiales tanto físicas como biológicas de la radiación con partículas de alto LET (transferencia lineal de energía) han llevado a su utilización creciente en terapia para el cáncer. En este trabajo se comparó el efecto de radiaciones de bajo y alto LET sobre líneas celulares con distinta radiosensibilidad (Irs-20 y CHO-10B2) cuantificando el número y tamaño de los focos nucleares que se forman a partir de la fosforilación de la histona H2AX ( $\gamma$ H2AX), la cual interviene en la reparación del daño al ADN. La detección de los focos se realizó por métodos inmunocitoquímicos y microscopía de fluorescencia. Los cultivos celulares se irradiaron con protones en fase *plateau* (14 MeV, LET:3 keV/ $\mu$ ), en pico de Bragg (3 MeV, LET:14 keV/ $\mu$ ) y con iones de Li (7 MeV, LET:250 keV/ $\mu$ ) en el acelerador Tandem, CNEA. Se realizó el estudio clonogénico de las dos líneas celulares. La irradiación con protones (bajo LET) mostró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en las curvas de sobrevida entre las líneas celulares indicando la disímil radiosensibilidad de ambas. Por el contrario la irradiación con Li (alto LET) presentó un patrón de respuesta similar para ambas líneas por inhibición de los mecanismos de reparación. El análisis de la  $\gamma$ H2AX se realizó luego de la irradiación con protones y Li. Los datos mostraron un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) en el número de focos/núcleo en función de la dosis recibida para todas las condiciones de irradiación. El tamaño de los focos nucleares aumentó considerablemente en las células irradiadas con iones de Li comparados con los generados por protones, evidenciando el daño densamente localizado inducido por partículas de alto LET. La formación de focos nucleares mediada por la  $\gamma$ H2AX en células irradiadas con haces de partículas con diferentes características permitió analizar la magni-

tud del daño, la reparación de las DSBs y detectar la generación de focos nucleares de mayor tamaño inducidos por partículas de alto LET.

**0309. (0737) EVALUACIÓN IN VITRO DEL METABOLISMO CELULAR EN MACRÓFAGOS ALVEOLARES EXPUESTOS A NITRATO DE URANILO.** N Orona<sup>1</sup>, P Mandalunis<sup>2</sup>, A Ubios<sup>2</sup>, D Tasat<sup>1,2</sup>

*1 Escuela de Ciencia y Tecnología - UNSAM, 2 Facultad de Odontología- UBA*

Los efectos tóxicos de los compuestos de uranio (U) sobre la salud dependen del tipo de exposición (ingestión, inhalación), de la dosis, tamaño y solubilidad. La exposición al U involucra un riesgo ocupacional y constituye un peligro ambiental para la población. In vivo es nefrotóxico e inhibe la actividad osteoblástica y de reparación del tejido óseo. In vitro el efecto del nitrato de uranio (NO<sub>3</sub>U) provoca, sobre la línea celular de osteoblastos fetales humanos Hfob 1.19, un incremento dosis-dependiente de la producción de anión superóxido, inhibición de la actividad fosfatasa alcalina sin modificar la proliferación ni la apoptosis. Por lo expuesto y dado que los metales alteran distintos procesos celulares, resulta de interés estudiar y evaluar la respuesta de los macrófagos alveolares (MA), a la exposición de dosis crecientes del NO<sub>3</sub>U (12.5-25-50-100-200 µM). La viabilidad celular se cuantificó colorimétricamente (ABS:570nm) mediante el ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Los niveles de las especies activas del oxígeno (EAO) se determinaron analizando el porcentaje de células capaces de reducir el nitroblue tetrazolium (NBT) y la capacidad fagocítica mediante la habilidad de endocitar esferas de látex fluorescentes. La exposición al NO<sub>3</sub>U provocó inhibición de la viabilidad a partir de 50 µM (Co: 0.089±0.027 vs. 50 µM: 0.037±0.010, p<0.05) y reducción en la generación de EAO a partir de 100 µM (Co: 24.12±2.45% vs. 100 µM: 17.44±4.20%, p<0.05). La capacidad fagocítica se incrementó para las dosis bajas disminuyendo a partir de 50 µM (Co: 58.35±1.60%, 12.5 µM: 69.15±2.30%, 50 µM: 48.07±4.28%, p<0.001). Estos resultados muestran que el NO<sub>3</sub>U disminuye los valores de parámetros biológicos involucrados en la respuesta inmune como el metabolismo oxidativo y la fagocitosis de MA, sugiriendo el posible incremento de la susceptibilidad de la población a patógenos y/o contaminantes nocivos para la salud.

**0310. (0686) ECHINOCOCCUS GRANULOSUS: ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO A PARTIR DE PROTOESCÓLICES.** CM Albani<sup>1,3</sup>, AN Chisari<sup>2,3</sup>, MC Elissondo<sup>1,3</sup>, G Denegri<sup>1,3</sup>

*1 Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, FCEyN, UNMdP, Mar del Plata., 2 Instituto de Investigaciones Biológicas, FCEyN, UNMdP, Mar del Plata., 3 CONICET.*

La posibilidad de obtener cultivos de células de helmintos parásitos ha sido raramente explotada hasta el presente. Por lo cual, el establecimiento del cultivo primario del estadio larval de *E. granulosus* sería de gran importancia no solo para comprender con mayor profundidad el ciclo de vida de este parásito, sino también para analizar sus propiedades bioquímicas y metabólicas con el objetivo de desarrollar nuevas y más eficientes alternativas terapéuticas. El objetivo de este trabajo fue poner a punto el método de cultivo celular in vitro de *E. granulosus* a partir de protoescólices. Los protoescólices fueron digeridos con tripsina al 0.25% durante 30 min a 37 °C con agitación constante. Luego las células fueron colectadas por centrifugación. Se evaluó la vitalidad con azul tripan y se las colocó en frascos plásticos conteniendo medio 199 suplementado con antibióticos, glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 5.10-5 M, 10% de líquido hidatídico y 10% de suero fetal bovino. Las botellas fueron colocadas en estufa a 37 °C y el cambio de medio se realizó cada 48 hs. Las células fueron observadas diariamente. Empleando la técnica descrita fue posible obtener cultivos primarios a partir de células de protoescólices. Entre las 24 y 48 hs se pudieron observar diferentes tipos celulares y en todos los casos grupos de células adaptadas emitiendo prolongaciones. Hacia el

futuro se espera lograr el establecimiento de una línea celular, lo cual constituye una poderosa herramienta para llevar a cabo estudios a nivel molecular, estudios inmunológicos y para realizar screening de nuevas drogas.

## ENDOCRINOLOGÍA III

**0311. (0158) CAMBIOS EN LA REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DEL EJE REPRODUCTOR EN RATAS MACHO Y HEMBRA ADULTAS POR LA EXPOSICIÓN INTRAUTERINA A 4-METHYL-BENZYLIDENE-CAMPHOR (4-MBC).** ME Carou<sup>1</sup>, ML Deguiz<sup>1</sup>, R Reynoso<sup>1</sup>, B Szwarcfarb<sup>1</sup>, S Carbone<sup>1</sup>, JA Moguilevsky<sup>2</sup>, P Scacchi<sup>1</sup>, OJ Ponzo<sup>1</sup>

*1 Lab. de Endocrinología - Inst. de Fisiología - Fac. de Medicina. U.B.A., 2 Fundación Favaloro*

El 4-methyl-benzylidene-camphor(4-MBC) es un disruptor endocrino utilizado en pantallas solares con acción estrogénica. **Objetivo:** evaluar el efecto de la exposición intrauterina a 4-MBC sobre la regulación neuroendócrina gonadal en ratas macho y hembra adultas. **Materiales y Métodos:** Ratas hembra adultas recibieron 4-MBC 100 (M1) y 500 (M5) mg/kg (sc) y los controles (C) aceite, desde el primer día de preñez hasta la parición. Sus crías fueron sacrificadas a los 70 días de edad (n= 8-12 por grupo), las hembras en diestro. Se determinó LH y FSH sérica (ng/ml) y la liberación "in vitro" hipotalámica de GnRH (pg/ml/10 mg tej) por RIA y de aspartato (ASP), glutamato (GLU) y GABA (pmol/100 ul de medio) por HPLC-UV. **Resultados:** En machos disminuyó la liberación de GnRH (C: 4.2 ± 0.6, M1: 0.8 ± 0.2 p<0.001, M5: 3.1 ± 0.6), los niveles séricos de LH (C: 12.6 ± 2.0, M1: 6.5 ± 0.9 p<0.02) y FSH (C: 654.3 ± 21.7, M1: 405.7 ± 8.4 p<0.001, M5: 551.5 ± 20.3 p<0.005). La liberación de aminoácidos disminuyó ASP (C: 502.9 ± 45.8, M1: 251.9 ± 11.6 p<0.001, M5: 362.0 ± 29.6 p<0.02); GLU (C: 1361.1 ± 113.2, M1: 612.3 ± 28.3 p<0.001, M5: 914.8 ± 70.1 p<0.005); GABA (C: 950.2 ± 87.7, M1: 526.9 ± 52.8 p<0.001, M5: 670.5 ± 79.4 p<0.025). En hembras aumentó de la liberación de GnRH, aunque no significativamente, con ambas dosis (C: 7.7 ± 1.4, M1: 8.8 ± 1.2, M5: 9.9 ± 2.0) y significativamente los niveles de LH (C: 21.5 ± 2.8, M1: 107.1 ± 5.6 p<0.001, M5: 34.4 ± 4.9 p<0.001) y FSH (C: 114.6 ± 3.4, M1: 208.0 ± 13.2 p<0.001, M5: 146.2 ± 6.2 p<0.001). También aumentaron los valores de ASP (C: 319.5 ± 22.6, M1: 412.8 ± 16.9 p<0.01, M5: 639.6 ± 95.1 p<0.01) y disminuyeron los niveles de GABA (C: 673.6 ± 34.6, M1: 398.2 ± 14.8 p<0.001, M5: 411.1 ± 46.1 p<0.001). El GLU no se modificó. Conclusiones: La exposición intrauterina a 4-MBC modifica la actividad neuroendocrina del eje gonadal de ratas hembra y macho adultas, presentando un efecto estimulador en las primeras e inhibitorio en los machos.

**0312. (0382) INFLUENCIA DE LA TERAPIA DE HEMODIALISIS SOBRE LOS NIVELES DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN PACIENTES RENALES CRÓNICOS.** CM Melillo<sup>1</sup>, MO Suescun<sup>2</sup>

*1 Cátedra de Endocrinología. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP Laboratorio Instituto Médico Mater Dei, La Plata. Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, IMBICE, La Plata, 2 Cátedra de Endocrinología. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, IMBICE, La Plata*

En la Insuficiencia renal crónica (IRC) se observan anomalías en los niveles de hormonas tiroideas que involucran tanto la funcionalidad del eje hipotálamo-hipofiso-tiroideo como el metabolismo periférico de dichas hormonas. En estos pacientes se recurre a terapias sustitutivas, como la Hemodiálisis, con la finalidad de depurar la sangre de metabolitos que de otra manera se acumularían debido a la disminuida función renal. El efecto de esta terapia puede evaluarse a través de la concentración de urea pre y post diálisis. La urea sérica pre diálisis es un parámetro que depende de la ingesta de proteínas, de la dosis de diálisis y de la función renal residual y

la urea post diálisis depende de la efectividad del procedimiento. En este trabajo estudiamos la influencia de la Hemodiálisis sobre los niveles de Tirotrófina (TSH) y Tiroxina total y libre (T4T y T4L) y su correlación con la concentración de urea. Se evaluaron 48 pacientes adultos, de ambos sexos, con IRC, obteniendo las muestras a partir de la fístula arterio-venosa pre y post diálisis. Los valores de TSH y de T4T pre diálisis vs post diálisis no evidenciaron ninguna modificación relevante. En cambio, los niveles de T4L pre diálisis  $0.950 \pm 0.165$  ng/dl fueron significativamente menores que los post diálisis  $1.230 \pm 0.230$  ng/dl,  $p < 0.05$  (media  $\pm$  SEM, test t no apareado). Por otra parte, se observó una correlación estadísticamente significativa entre los valores de  $\Delta T4L$  (diferencia entre T4L post y pre diálisis) y la concentración de urea alcanzada en estos pacientes post diálisis (Spearman  $p < 0.05$ ). Se concluye que en estos pacientes existe una clara fluctuación de los niveles de T4L debido al efecto depurador de la Hemodiálisis que se correlaciona con el estado urémico luego de la terapia.

**0313. (0197) EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA SOBRE LA ACTIVIDAD DE GLUCOQUINASA INSULAR.** B Maiztegui, MI Borelli, JJ Gagliardino

*CENEXA. Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), Facultad de Ciencias Médicas UNLP, La Plata, Argentina.*

La administración de una dieta rica en fructosa a ratas normales induce insulinoresistencia (IR), aumento de la producción insular de  $CO_2$  y de la secreción de insulina in vitro en respuesta a la glucosa. **Objetivo:** Estudiar los cambios ocurridos en la actividad de glucoquinasa (GQ) en islotes de ratas con IR inducida por dieta rica en fructosa (DRF). Metodología: Alimentamos ratas Wistar macho durante 3 semanas con dieta comercial sin (C) o con fructosa al 10% en el agua de bebida. Al sacrificio determinamos glucemias, triglicéridemias e insulinemias y aislamos islotes pancreáticos (colagenasa); midiendo en ellos la actividad (producción de G-6-P) y la expresión (Western blot) de hexoquinasa y GQ en homogenado entero y en fracciones subcelulares (citósol [forma activa de la enzima] y particulada [forma inactiva]) de islotes C y DRF. La densidad de las bandas se cuantificó utilizando una cámara digital y software Kodak 1D. **Resultados:** (Los datos son expresados como  $X \pm$  EEM; C vs. DRF). Glucemias:  $131 \pm 4$  vs.  $132 \pm 3$  mg/dl, NS; Triglicéridemias:  $98 \pm 4$  vs.  $159 \pm 5$  mg/dl,  $p < 0.001$ ; Insulinemias:  $0.77 \pm 0.1$  vs.  $1.2 \pm 0.1$  ng/ml,  $p < 0.001$ ; Actividad de GQ: homogenado,  $0.9 \pm 0.1$  vs.  $1.9 \pm 0.3$  pmol G-6-P/ $\mu$ g proteína/min,  $p < 0.005$ ; citósol,  $36.4 \pm 5\%$  vs.  $75.5 \pm 11\%$  de la actividad total,  $p < 0.001$ ; Western blot GQ: homogenado,  $100.0 \pm 6.4\%$  vs.  $154.1 \pm 17.9\%$  intensidad neta,  $p < 0.02$ ; citósol,  $36.0 \pm 2.3\%$  vs.  $67.6 \pm 2.6\%$  de la intensidad neta medida en el homogenado;  $p < 0.001$ . No observamos diferencias en la masa y actividad de la hexoquinasa entre ambos grupos. Conclusiones: La traslocación de la GQ al citósol sería el mecanismo responsable del aumento de la actividad de GQ medido en las células beta y consecuentemente del aumento del metabolismo de glucosa y de la secreción de insulina en ratas con IR inducida por la DRF. El fracaso de esta adaptación sería uno de los mecanismos patogénicos de la diabetes tipo 2.

**0314. (0368) BROMOCRIPTINA INDUCE UN MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDEPENDIENTE DE CASPASA 3. PARTICIPACIÓN DE PKC DELTA Y P38 MAPK.** CM Palmeri, JP Petiti, S Gutiérrez, LV Sosa, AL De Paul, AI Torres

*Centro de Microscopía Electrónica. FCM. UNC.*

Bromocriptina (BC) induce diferentes tipos de muerte celular en modelos proliferativos de células lactotropas. En estudios previos observamos un patrón predominante de "célula negra" en el que intervendrían PKC $\delta$  y p38 MAPK. En el presente trabajo se caracterizó este tipo de muerte celular diferenciándolo de otros mecanismos y se evaluó la localización subcelular de las quinasas mencionadas. Ratas macho fueron tratadas con cápsulas subcutáneas de benzoato de estradiol (15 mg) durante 25 d (grupo E) y los últimos 5d con BC (0,3mg/100g/d)(grupo E+B). Grupo control sin tratamiento (C). La caracterización y cuantificación de la

muerte celular se realizó por microscopía electrónica. Se evaluó la expresión de marcadores de apoptosis, caspasa 3 y citocromo c, por Western Blot en homogenatos hipofisarios y la fragmentación del ADN por electroforesis. La localización ultraestructural de PKC $\delta$  y p38 MAPK fosforilada (P-p38) se estudió mediante inmunocitoquímica. Análisis estadístico: ANOVA-Tukey. BC indujo un patrón de muerte caracterizado por la condensación nuclear y vacuolización de las organelas citoplasmáticas. El porcentaje de muerte celular en los grupos C, E y E+B fue de 6%, 10% y 24% respectivamente ( $p < 0.001$ ). En E y E+B se observó un aumento de pro-caspasa 3 (32 kDa) no detectándose los fragmentos maduros (17 kDa) en ningún grupo. La expresión de citocromo c no exhibió cambios en los modelos analizados y el ADN no mostró degradación intranucleosomal. En todos los grupos experimentales, PKC $\delta$  y P-p38 fueron observadas en núcleo, citósol, retículo endoplásmico y mitocondrias de células hipofisarias. El estrógeno aumentó la intensidad de la inmunomarcación en estos compartimientos, mientras que BC indujo una mayor translocación a nivel nuclear. Estas nuevas evidencias bioquímicas y ultraestructurales permitirían clasificar el patrón de "célula negra" inducido por BC como otro tipo de muerte celular, denominado paraptosis, en el que PKC $\delta$  y p38 MAPK están involucradas.

**0315. (0016) MANGANESO: EFECTOS CENTRALES Y ALTERACIONES HORMONALES.** JP Prestifilippo, J Fernandez-Solari, C Mohn, C da la Cal, A De Laurentis, V Rettori

*Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET-UBA*

El Manganeseo (Mn) es un nutriente esencial para el organismo, sin embargo, recientemente se ha visto que altas dosis de Mn afectan al eje reproductor, induciendo la pubertad precoz en ratas. Previamente, demostramos que el Mn incrementa la liberación hipotalámica de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) de ratas macho adultas, a través de una vía dependiente de NO-GMPc-PKG. Considerando que LHRH es el principal factor hipotalámico que controla la secreción de hormona luteinizante (LH), nuestro objetivo fue estudiar el efecto in vivo del Mn, administrado intracerebroventricular (icv), sobre los niveles plasmáticos de LH y de mediadores implicados en la liberación LHRH en hipotálamos medio basales (HMB). Utilizamos ratas Sprague Dawley macho adultas (n:6-8/grupo) a las que se les implantaron cánulas icv una semana antes del experimento y un catéter en la vena yugular 24hs antes del mismo. Se inyectó solución fisiológica (SF) estéril (5ul) o Mn (50  $\mu$ g/5ul) icv y se recolectaron muestras de sangre, cada 30 min durante 120 min para la determinación de LH (RIA). Al final del experimento, se extrajeron inmediatamente los HMB para la determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) por el método de 14C-Arginina y de prostaglandina E (PGE) por RIA. Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM, analizados por test-t de Student. Mn, incrementó los niveles plasmáticos de LH a los 60 (SF:  $0.03 \pm 0.01$ ; Mn:  $0.07 \pm 0.01$  ng/ml \* $p < 0.05$ ), 90 (SF:  $0.03 \pm 0.01$ ; Mn:  $0.09 \pm 0.02$  ng/ml \* $p < 0.05$ ) y 120 min (SF:  $0.04 \pm 0.02$ ; Mn:  $0.10 \pm 0.02$  ng/ml \* $p < 0.05$ ). Además Mn incremento significativamente la actividad total de la NOS (SF:  $8.67 \pm 0.15$ ; Mn:  $9.43 \pm 0.27$  pmol NO/min/HMB \* $p < 0.05$ ) sin alterar el contenido de PGE. Estos resultados indican que el Mn incrementa los niveles hipotalámicos de NO y que este podría mediar el aumento de la secreción de LH produciendo por un aumento de la liberación de LHRH hipotalámica (PICT 14264, PIP 6149).

**0316. (0479) EL ESTRADIOL MODIFICA EL BALANCE DE PROTEINAS PRO Y ANTIAPOPTICAS DE LA FAMILIA BCL-2 EN LA ADENOHIPOFISIS.** V Zaldivar, L Magri, G Eijo, S Zárate, G Jaita, D Radl, D Pisera, A Seilicovich

*Instituto de Investigaciones en Reproducción (IdIR), Facultad de Medicina, UBA.*

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que el efecto apoptótico inducido por TNF- $\alpha$  y FasL en células adenohipofisarias de ratas hembras es estrógeno-dependiente y mayor en células de ratas en proestro (coincidiendo con el pico

de estradiol circulante) que en diestro. El balance entre proteínas pro y antiapoptóticas es uno de los mecanismos que determina si una célula prolifera o muere por apoptosis. Considerando que los miembros de la familia Bcl-2 han sido implicados como reguladores de la muerte celular, determinamos por Western Blot la expresión de Bax, una proteína proapoptótica, y la de Bcl-2 y Bcl-XL, dos miembros antiapoptóticos de esta familia en adenohipófisis de ratas Wistar sacrificadas en estadios seleccionados del ciclo estral y en células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas (OVX) cultivadas en presencia de 17 $\beta$ -estradiol (E2, 10-9 M). La expresión adenohipofisaria de Bax fue un 100% mayor en proestro que en diestro; la expresión de Bcl-XL fue menor (D: 1.0  $\pm$  0.2; P: 0.8  $\pm$  0.1; p<0.05) mientras que no observamos diferencias en la expresión de Bcl-2. En células adenohipofisarias de ratas OVX, la presencia de E2 aumentó un 35% la expresión de Bax (p<0.05), disminuyó la expresión de Bcl-XL (C: 1.0  $\pm$  0.0; E2: 0.8  $\pm$  0.1; p<0.05) sin modificar la expresión de Bcl-2. En estas condiciones, el E2 indujo apoptosis de células adenohipofisarias de ratas OVX (determinado por Anexina-V y citometría de flujo) (C: 34.4  $\pm$  1.3; E2: 39.1  $\pm$  1.3; p<0.05). Estos resultados sugieren que los estrógenos, modificando el balance de proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, facilitarían el desencadenamiento de fenómenos apoptóticos en la adenohipófisis durante el ciclo estral.

**0317. (0712) SEÑALES INTRACELULARES QUE MEDIAN EL EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA CAPTACIÓN RENAL DE DOPAMINA Y SOBRE LA NA<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPASA RENAL.** MR Choi<sup>1</sup>, M Gironacci<sup>2</sup>, B Lee<sup>1</sup>, F Lucano<sup>1</sup>, C Medici<sup>1</sup>, AH Correa<sup>1</sup>, BE Fernández<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. INFIBIOC CONICET, 2 Cátedra de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIFIB CONICET*

Describimos que la Angiotensina II (ANG II) inhibe la captación in vitro de <sup>3</sup>H-Dopamina (DA) en cortes de corteza renal de ratas Sprague Dawley. Caracterizamos la captación como extraneuronal (hidrocortisona (HC) sensible) y temperatura dependiente. Los efectos fueron mediados por el receptor AT<sub>1</sub>, sin participación del AT<sub>2</sub> (Nephron Physiol 104:136-143,2006), con activación de PLC y PKC pero sin modificar la vía AC/AMPC/PKA (Medicina 66:166,2006). Continuamos estudiando los mecanismos implicados en la interacción ANG II-DA y determinamos los efectos de la ANG II sobre la actividad de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa. Se incubó con ANG II 100 nM y nomifensina 17  $\mu$ M para bloquear la captación neuronal. El TMB-8 10  $\mu$ M (inhibidor del receptor IP<sub>3</sub>) y el 2-APB 100  $\mu$ M (inhibidor de la liberación de calcio IP<sub>3</sub>-dependiente) revertieron la inhibición de ANG II sobre la captación renal de DA (dpm/mg.1<sup>2</sup> $\pm$ ES): C: 10.32 $\pm$ 0.32, ANG II: 7.41 $\pm$ 0.21\*, TMB-8: 9.86 $\pm$ 0.31, ANG II + TMB-8: 10.65 $\pm$ 0.39 (n=7-9); C: 10.35 $\pm$ 0.31, ANG II: 7.41 $\pm$ 0.21\*, 2-APB: 10.84 $\pm$ 0.62, ANG II + 2-APB: 10.81 $\pm$ 0.56 (n=6-7). El KN-93 25  $\mu$ M (inhibidor de CaM kinasa II) también bloqueó los efectos de ANG II (n=5-7): C: 10.34 $\pm$ 0.37, ANG II: 7.36 $\pm$ 0.31\*, KN-93: 9.65 $\pm$ 0.62, ANG II + KN-93: 10.06 $\pm$ 0.56; \*p<0.01 vs C. Para determinar los efectos de la inhibición de la captación de DA ANG II-dependiente sobre la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa (% variación $\pm$ ES) se incubó con carbidopa (CD) 100 $\mu$ M (para inhibir la síntesis de DA endógena), ANG II, DA 1  $\mu$ M y HC 100  $\mu$ M (n=6-11): C: 100; CD: 156 $\pm$ 11\*, DA 1  $\mu$ M: 92 $\pm$ 18, HC: 155 $\pm$ 13\*, ANGI+DA: 200 $\pm$ 15\*, HC+DA:164 $\pm$ 11\*, \*p<0.05 vs C y DA, \*p<0.001 vs DA. (Student t-test, ANOVA, test de Tukey). Los resultados muestran que la ANG II inhibe la captación renal de DA activando al receptor IP<sub>3</sub> con liberación de calcio intracelular y posterior activación de CaM kinasa II. Por otra parte, con síntesis endógena de DA inhibida, la ANG II anula la inhibición de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa renal dependiente de la DA captada.

**0318. (0146) EL CROMO VI INDUCE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL HIPOTÁLAMO.** SI Nudler, EA Miler, FA Quinteros, JP Cabilla, BH Duvilanski

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

Ciertos compuestos que contienen cromo hexavalente (CrVI) son reconocidos carcinógenos y representan un riesgo ambiental para la salud humana. Cuando la producción de radicales libres y otras moléculas clasificadas como especies reactivas del oxígeno (ROS) excede su eliminación por el sistema antioxidante de las células se produce un estrés oxidativo (EO). Metales pesados tales como el CrVI producen daños en el ADN y éstos involucrarían a las ROS. Previamente demostramos que el Cr se acumula en el hipotálamo de la rata macho (cepa Wistar) luego de la administración crónica de CrVI a través del agua de la bebida (100 ppm). El objetivo de este trabajo es estudiar si en estas mismas condiciones se produce EO en el hipotálamo. El tratamiento con Cr VI indujo un aumento significativo del nivel de expresión del mRNA (RT-PCR) de la enzima hemo oxigenasa 1 (HO-1), marcador de EO (densidad óptica relativa: Control: 0,40 $\pm$ 0,04; Cr VI: 0,70 $\pm$ 0,06, n=5, p<0.001). Otro índice importante del EO, el nivel de peroxidación lipídica (TBARS), mostró un ligero incremento por el tratamiento con Cr VI. Entre las enzimas antioxidantes, la glutatión reductasa (GR) aumentó significativamente su actividad (nmoles sustrato/seg/mg proteína; Control: 0,45 $\pm$ 0,03; Cr VI: 1,0 $\pm$ 0,10; n=5, p<0.01. La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) disminuyó significativamente (porcentaje del control; Control: 100 $\pm$ 15%; Cr VI: 66 $\pm$ 3%; n=4, p=0.05). En el hígado, tomado como tejido de referencia, no se observaron modificaciones significativas en los niveles de mRNA de HO-1, ni en la peroxidación lipídica, así como tampoco en las actividades de GR y GPx. Estos resultados indican que el tratamiento crónico con Cr VI in vivo induce estrés oxidativo en el hipotálamo mientras que no afecta al hígado. Este hecho sugiere que el hipotálamo es más sensible al Cr VI que el hígado, a pesar de que este último lo acumula en mayores concentraciones.

**0319. (0427) INMUNOLocalización DEL RECEPTOR DE TIPO 1 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINO-SIMIL 1 (IGF-1R) EN FEOCROMOCITOMAS/PARAGANGLIOMAS.** PA Pennisi, M Venara, EG Sanso, HE Chemes, MB Barontini

*Centro de Investigaciones Endocrinológicas CEDIE*

La mayoría de los feocromocitomas/paragangliomas (feo/pgl) son tumores benignos, pero existe un porcentaje variable (5 a 26%) de feo/pgl malignos. El diagnóstico de malignidad requiere la aparición de metástasis en sitios distantes del tumor primario. Los IGFs están involucrados en el crecimiento y tumorigénesis de la glándula adrenal. El tejido adrenal normal, las hiperplasias y adenomas corticoadrenales expresan de modo semejante el IGF-1R, mientras que en los carcinomas corticoadrenales se sobreexpresa. **Objetivo:** caracterizar la distribución e intensidad de la expresión del IGF-1R en feo/pgl de diferente origen y grado de malignidad, a fin de establecer un posible rol para el sistema de los IGFs en la fisiopatología de la enfermedad. **Métodos:** Se realizó detección inmunohistoquímica de IGF-1R utilizando un anticuerpo específico, en tumores benignos (feo 6/pgl 1) y malignos (feo 2/pgl 3). Cada tumor se procesó junto a una glándula adrenal normal para evaluar la distribución e intensidad de la expresión en forma comparativa. En las adrenales normales la expresión fue difusa fuerte en corteza y difusa débil en médula. En los tumores los patrones fueron PDF: positivo difuso fuerte; PDD: positivo difuso débil y PC: combinación de áreas débiles y fuertes. **Resultados:**

	PDD	PC	PDF
Médula normal (n=12)	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Feo/pgl benigno (n=7)	4 (57%)	1 (14%)	2 (29%)
Feo/pgl maligno (n=5)	0 (0%)	1 (20%)	4 (80%)

**Conclusiones:** Nuestros resultados indican que la expresión y distribución del IGF-1R es diferente entre feo/pgl malignos y benignos, y sugerirían la influencia del sistema de los IGFs en la biología de estos tumores. Serán necesarios estudios posteriores para confirmar estos resultados preliminares.

**0320. (0039) GENERACIÓN DE UN RATÓN TRANSGÉNICO PROMOTOR DE PROLACTINA-CRE.** MI Pérez Millán<sup>1</sup>, G Luque<sup>1</sup>, GS Diaz-Torga<sup>1</sup>, D Becú-Villalobos<sup>1</sup>, M Rubinstein<sup>2</sup>

1 *IBYME CONICET*, 2 *INGEBI CONICET*

Con el objetivo de introducir mutaciones somáticas en lactotrofos hipofisarios mediante la tecnología Cre/loxP, hemos desarrollado ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de prolactina (Prl+Cre). La comparación bioinformática de regiones ortólogas conservadas entre mamíferos nos guió hacia la obtención de un fragmento de 3 kb correspondiente a la región 5'flanqueante del gen de prolactina de ratón (Prl). Este fragmento fue ligado río arriba del gen de la recombinasa Cre seguido de una señal de poliadenilación. Este transgén llamado mPrl-Cre fue utilizado para la generación de ratones transgénicos mediante la microinyección pronuclear de cigotas B6CBF2, y la posterior transferencia a hembras pseudopreñadas. Las sesenta crías obtenidas se analizaron por PCR, determinándose que ocho crías contenían el transgén. Tres F0s no transfirieron el transgén a la descendencia y fueron descartadas. Las cinco F0s restantes se cruzaron con ratones transgénicos reporteros que expresan el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) sólo en células que expresan la recombinasa Cre. Cerebros e hipófisis de ratones doble transgénicos (Prl-Cre y EGFP) de las cinco líneas fueron analizados mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-cre y anti-EGFP. Se observó marca de EGFP y Cre en hipófisis de animales doble transgénicos pero no así en los cerebros, ni en hipófisis de animales control. La presencia de Cre fue inmunodetectada en el núcleo mientras que la de EGFP resultó predominantemente citoplasmática. Una de las líneas de ratones Prl-Cre analizadas resultó seleccionada por expresar EGFP y Cre exclusivamente en lactotrofos hipofisarios. Nuestros resultados indican que este nuevo ratón transgénico generado será una herramienta valiosa para inducir mutaciones de genes floxeados exclusivamente en lactotrofos.

**0321. (0273) ORGANIFICACIÓN DEL IODO EN TIROCITOS CULTIVADOS EN SUSPENSIÓN. EFECTOS DE LA CONCENTRACIÓN DE IODURO Y SU RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DEL INHIBIDOR DE PEROXIDASA.** R Oglio<sup>1</sup>, L Thomasz<sup>1</sup>, MA Pisarev<sup>1,2,3</sup>, GJ Juvenal<sup>1,2</sup>, L Krawiec<sup>1,2</sup>

1 *Bioquímica Nuclear, CNEA*, 2 *CONICET*, 3 *Facultad de Medicina, UBA*

La peroxidasa tiroidea (TPO) organifica yoduro en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Esto permite la iodación de las tirosinas de la tiroglobulina para la síntesis hormonal. El inositol fosfoglicano (IPG), formado en la membrana celular, es liberado al citosol y actúa como inhibidor fisiológico de la TPO, generando un aumento de la concentración del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tirocitos bovinos fueron cultivados en suspensión durante 72 hs en medio 199, en presencia o ausencia de concentraciones crecientes de yoduro de potasio (KI). La organificación se realizó en medio fresco, utilizando K125I como trazador. La actividad de TPO se determinó por incorporación de 125I a la tirosina en presencia de un generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El IPG se purificó por partición líquido/líquido y su actividad inhibitoria se ensayó sobre TPO o lactoperoxidasa (LPO). La organificación de yoduro en tirocitos cultivados en presencia de concentraciones crecientes de KI mostró un incremento significativo (p<0.01) desde 1x10<sup>-5</sup>M hasta 1x10<sup>-2</sup>M KI, comparada con el control, cultivado sin KI. El agregado de IPG al sistema de iodación anuló el efecto. Previo a la organificación, el KI del cultivo fue eliminado por lavado con medio fresco. En tirocitos cultivados durante 72 hs en un medio libre de KI, se observó un incremento significativo (p<0.001) en la iodación al ensayar la organificación con concentraciones crecientes de KI (1x10<sup>-6</sup>M hasta 1x10<sup>-2</sup>M) en el medio. La actividad fue muy superior a la alcanzada por aquellos cultivos que se desarrollaron en presencia de yoduro, observándose un máximo con KI 1x10<sup>-2</sup>M y su anulación por IPG. La producción de IPG en tirocitos cultivados en presencia de cantidades crecientes de KI es inversamente pro-

porcional a la concentración del mismo, desde 1x 10<sup>-5</sup> M hasta 1x 10<sup>-2</sup> M. **Conclusión:** La iodación es estimulada directamente por KI e indirectamente por la disminución en la producción de IPG.

**0322. (0702) EFECTOS DE LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO (LPS) SOBRE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y SECRETORIA DE CÉLULAS LACTOTROPAS: ROL MODULADOR DEL ESTRÓGENO.** G Alvin<sup>1</sup>, S Gutiérrez<sup>1</sup>, JP Petiti<sup>1</sup>, LV Sosa<sup>1</sup>, CM Palmeri<sup>1</sup>, M Soaje<sup>2</sup>, CA Maldonado<sup>1</sup>, AI Torres<sup>1</sup>, AL De Paul<sup>1</sup>

1 *Centro de Microscopía Electrónica, Fac. de Cs de Médicas, UNC, Córdoba, Argentina*, 2 *Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza, Argentina*

La endotoxina de bacterias gram-negativas, LPS, se aplica para estudiar interacciones inmuno-endocrinas. Nos propusimos investigar el efecto de LPS sobre la proliferación y secreción de células lactotropas de hipófisis hiperplásicas y evaluar el rol modulador del estrógeno (E2) en estos procesos. Ratas machos fueron tratadas con cápsulas subcutáneas de benzoato de E2 (30mg) por 60d. Estas glándulas se cultivaron aplicándose los siguientes protocolos: LPS (100ng y 2ug/ml) por 6 y 24h; E2 (100nM) por 4 y 24h; interacción LPS-E2 por 24h (Inter) y sensibilización por pre-incubación con E2 4h y posterior tratamiento con LPS por 24h (Sens). Controles (C) fueron incubados en paralelo. Se evaluó la proliferación celular por doble ICQ para BrdU/PRL y la secreción de PRL por RIA. La expresión de TLR4 y NF-κB fue determinada por western blot y su presencia, a nivel ultraestructural, se evaluó por ICQ. Análisis estadístico: ANOVA-Fisher. Ambas dosis de LPS aplicadas por 6 y 24h duplicaron el número de lactotropas (p< 0.001), en tanto que E2 aumentó un 60% (vs. C). En Inter, el incremento de la proliferación fue del 130% y en Sens se revirtió parcialmente la respuesta proliferativa de LPS (60% vs C; p< 0.001). Los niveles de PRL no se modificaron en presencia de E2 por 24h y LPS disminuyó significativamente la liberación de PRL independientemente de la presencia de E2. La expresión de TLR4 y NF-κB sólo aumentó con LPS e Inter (p< 0.05 vs C) y se mantuvo invariable frente a E2. Los niveles de NF-κB disminuyeron en Sens. Se detectó la localización de TLR4 principalmente en el citosol y NF-κB en núcleos de lactotropas. Se demuestra que las células lactotropas derivadas de hipófisis hiperplásicas poseen la capacidad de interactuar y responder de manera directa a LPS, a través de TLR4-NF-κB, desencadenando procesos celulares que promueven la proliferación e inhiben de la secreción de PRL. El estrógeno actuaría modulando la proliferación de células lactotropas inducida por LPS.

**0323. (0237) LA INCUBACIÓN CON SOD, TIRÓN, APOCININA O MELATONINA RESTAURA LA RELAJACIÓN ENDOTELIO-DEPENDIENTE DISMINUIDA QUE PRESENTAN LAS RATAS CON PANCREATECTOMÍA SUBTOTAL.** CF Reyes Toso<sup>1</sup>, LM Linares<sup>1</sup>, ML Wallinger<sup>1</sup>, A Witriw<sup>2</sup>, CR Ricci<sup>1</sup>, JEB Pinto<sup>1</sup>, DP Cardinali<sup>1</sup>

1 *Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, UBA*, 2 *Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición, UBA*.

Estudios previos indican que anillos aislados de aorta torácica extraídos de ratas Wistar machos con pancreatectomía subtotal (PPx) presentan una relajación acetilcolina-dependiente (Ach-d) disminuida. Este efecto se incrementa incubando en un medio con glucosa 44 mmol/l. En estas condiciones se produce acumulación del anión superóxido. En el presente trabajo se analiza la posible participación del estrés oxidativo en la alteración de la respuesta vascular. Se evaluó "in vitro" la reactividad vascular en anillos de aorta torácica incubados con glucosa o manitol 44 mmol/l, en presencia de superóxido dismutasa (SOD), Tiron, apocinina o melatonina. El registro se efectuó con transductores de tensión isométrica conectados a un sistema de amplificación y digitalización por computadora. A la hora de incubación se determinó la respuesta a una solución de ClK; seguidamente se realizaron varios lavados y luego se indujo una contracción submáxima por

fenilefrina. Finalmente se efectuó una curva dosis-respuesta a la Ach. Este protocolo se repitió incubando los anillos con los antioxidantes mencionados. El estrés oxidativo se evaluó colorimétricamente, midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma y homogenatos de hígado y corazón. Las ratas con Ppx presentaron un aumento de los TBARS en plasma  $1.792 \pm 0.04362$  vs  $1.575 \pm 0.03570$   $\mu$ moles/ml ( $p < 0.001$ ) y tejidos ( $p < 0.01$ ) respecto de los controles. La relajación Ach-d en anillos con endotelio intacto disminuyó (ANOVA factorial:  $F_{1,336} = 15.8$ ,  $p < 0.00001$ ), siendo este efecto revertido cuando se incubaron con SOD, Tirón, apocinina o melatonina ( $p < 0.001$ ). **Conclusión:** Estos resultados demuestran que la presencia de antioxidantes en el medio de incubación de los anillos de ratas con Ppx restaura la relajación Ach-d, probablemente evitando la acumulación del anión superóxido y la formación de peroxinitritos.

**0324. (0689) RELACIÓN ENTRE EL HETEROCOMPLEJO HSP90/70•GR Y LA MAQUINARIA DE IMPORTACIÓN NUCLEAR. ENFOQUE BIOINFORMÁTICO Y EXPERIMENTAL PARA SU ESTUDIO.** MD Galigniana, PC Echeverría

*Fundación Instituto Leloir / IIBBA-CONICET*

Luego de unir hormona, el receptor de glucocorticoides (GR) transloca al núcleo para regular la expresión de genes específicos. El transporte ocurre a través del poro nuclear por un mecanismo en el que intervienen importinas. Sabemos que el complejo hsp90/hsp70 media la maduración GR y facilita su movimiento hacia el núcleo vía inmunofilinas que conectan al GR•hsp90 con dineína. Un punto de partida para conocer la relación entre este complejo y la maquinaria de importación nuclear fue realizar un análisis bioinformático de las bases de datos de interacciones proteína-proteína (IPP). Construimos una red virtual de IPP centrada en el heterocomplejo que incluye a hsp90/70, GR, P23, la inmunofilina FKBP52 y dineína de manera de establecer dentro de su interactoma proteínas pertenecientes a la maquinaria de importación nuclear. El estudio de los datos nos permitió evaluar nuevas hipótesis y fijar prioridades experimentales en la búsqueda de candidatos prometedores que sean sujetos a análisis empírico. Determinamos experimentalmente la red de interacciones entre el heterocomplejo y las nucleoporinas que portan repeticiones FG e importina  $\beta 1$ , y pudimos establecer que en un modelo de traslocación hormona dependiente de GR al núcleo, la dinámica que relaciona a GR con las nucleoporinas del poro se ve alterada por la inhibición de hsp90 con radicicol. Esta alteración también fue observada en condiciones donde el GR•hsp90 es incapaz de unir inmunofilinas por la sobreexpresión del dominio TPR. Todo esto indicaría la importancia de hsp90 y el heterocomplejo acompañante, no sólo facilitando el tránsito citoplasmático-nuclear de GR, sino también en la capacidad de GR para asociarse con la maquinaria de importación. Los análisis realizados en este trabajo se extenderán a otras proteínas también reguladas por el heterocomplejo Hsp90/Hsp70 en su tráfico núcleo-citoplasmático.

### NEUROCIENCIAS III

**0325. (0049) LA EXPRESION DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) DISMINUYE SELECTIVAMENTE EN EL GIRO DENTADO DEL HIPOCAMPO EN DOS MODELOS DE HIPERTENSION ARTERIAL.** L Pietranera<sup>1,2</sup>, FE Saravia<sup>1,2</sup>, MC Gonzalez Deniselle<sup>1,2</sup>, M Meyer<sup>1</sup>, P Roig<sup>1</sup>, AF De Nicola<sup>1,2</sup>

*1 Lab. de Bioquímica Neuroendócrina. IBYME, 2 Depto. de Bioquímica Humana. Fac. de Medicina. UBA*

En trabajos anteriores describimos en modelos de hipertensión arterial de origen genético (SHR) o inducido (DOCA-SAL), numerosos cambios en el hipocampo, tales como disminución de la proliferación celular en el giro dentado (GD), astrogliosis y reduc-

ción de células en el hilio. En este trabajo investigamos la expresión de la neurotrofina BDNF, íntimamente ligada al desarrollo, mantenimiento, supervivencia y plasticidad neuronales, en el hipocampo de ratas hipertensas y sus correspondientes controles. Se utilizaron (a) ratas macho SHR (PA: 180 mmHg) y sus controles WKY de 16 semanas de vida y (b) ratas Sprague-Dawley tratadas con vehículo (CTL) o DOCA durante 4 semanas (10mg/rata, sc, en días alternos) con oferta única de NaCl 1% como bebida (PA: 160 mm Hg). Se obtuvieron cortes de crióstato de 16  $\mu$ m conteniendo el hipocampo que fueron procesados para hibridización *in situ* isotópica para el análisis semicuantitativo del ARNm de BDNF. Se cuantificó la densidad óptica de la señal en placas autoradiográficas en el GD y en las zonas CA1 y CA3 del hipocampo dorsal. En ambos modelos los animales hipertensos mostraron una selectiva disminución de la expresión del ARNm para BDNF en el GD (expresado como % del background, WKY  $441.72 \pm 43.1$ , SHR  $303.36 \pm 39.0$   $p < 0.05$ ; CTL  $379.65 \pm 60.57$ , DOCA  $211.32 \pm 12.34$   $p < 0.05$ ) sin cambios significativos en CA1 y CA3. Paralelamente, se estudió por inmunocitoquímica la presencia del receptor tirosina quinasa TrkB en ratas SHR y WKY, no hallándose cambios de la intensidad de inmunomarcación en GD. En coincidencia con resultados previos concluimos que el desarrollo de la hipertensión arterial cursa con baja expresión de BDNF, lo cual explicaría el déficit neurogénico de los animales hipertensos. Se postula que factores neuroendócrinos comunes a ambos modelos intervendrían en el desarrollo de la neuropatología hipocámpica.

**0326. (0845) BLOQUEANTES D2-5HTA: DÉFICIT NEUROCOGNITIVO Y SU RELACIÓN CON LA MEJORA DE LA CALIDAD DE VIDA EN LA ESQUIZOFRENIA CRÓNICA.** ME Palacios-Vallejos<sup>1</sup>, F Archuby<sup>1</sup>, S Gaitan<sup>1</sup>, G Queipo<sup>1</sup>, J Rodríguez<sup>1</sup>, N Zelaschi<sup>1</sup>, LM Zieher<sup>2</sup>

*1 Hospital Alejandro Korn (Melchor Romero), 2 CONICET*

**Objetivos:** Demostrar si los antipsicóticos de segunda generación (APSG), en contraste con los convencionales (neurolepticos-NP-) mejoran el funcionamiento neurocognitivo, el déficit atencional y las funciones ejecutivas contribuyendo con esto a mejorar la calidad de vida (CV). a) Mediciones = Baterías neuropsicológicas: 1. WCST; 2. RAVLT; 3. TMT A y B. b) Escalas empleadas = Calidad de Vida (QLS); escala PANSS; escala de Simpson y Angus. c) Criterio Diagnóstico = DSM IV d) Pacientes = NP (n = 27); APSG (n = 23). d) Drogas empleadas = 1. NP: Fenotiazinas y butirofenonas (en equivalentes de haloperidol: rango de 5-15 mg/d); 2. APSG: clozapina, rango de dosis, entre 200-600 mg/d) y olanzapina, rango de dosis, entre 20-40 mg / e) Estadística = 1. Test de la U de Mann-Whitney; 2. Correlación por rangos de Spearman. **Resultados:** Todos los sujetos evaluados se hallan comprendidos en el rango etáreo entre los 20 y los 65 años. Media de edad:  $46.7 \pm 8.3$  para la muestra general y  $46.2 \pm 9.3$  en mujeres y  $47.0 \pm 9.5$  en el caso de los hombres. Se encontraron diferencias significativas entre los NP y APSG con los siguientes Tests 1) WCST:  $z = 2.43$ ,  $p = 0.015$ . 2) RAVLT:  $z = 2.35$ ,  $p = 0.019$ . 3) TMT A:  $z = 2.72$ ,  $p = 0.007$  y TMT B:  $z = 2.24$ ,  $p = 0.025$ . 4) QLS =  $z = 2.28$ ,  $p = 0.003$ . No se encontraron sin embargo diferencias en la Psicopatología (PANSS) y en los síntomas extrapiramidales (Simpson y Angus). Solamente en el grupo tratado con APSG, la CV se correlacionó favorablemente con la mejoría del déficit cognitivo, la disminución del déficit atencional y la mejoría de las funciones ejecutivas (QLS con: WCST = 0.56,  $p = 0.00$ , con RAVLT = 0.44,  $p = 0.01$ , con TMT A = - 0.49,  $p = 0.00$  y con TMT B = - 0.67.  $p = 0.00$ . **Conclusiones:** estos resultados sugieren que la mejoría en el funcionamiento neuropsicológico inducido por los APSG en la esquizofrenia crónica contribuye a mejorar la CV y con ello, a la rehabilitación y reinserción psicosocial.

**0327. (0391) ANALISIS DE LA MEMORIA CON RESONANCIA MAGNETICA FUNCIONAL EN EPILEPSIA DEL LOBULO TEMPORAL.** S Oddo<sup>1</sup>, P Solis<sup>2</sup>, D Consalvo<sup>3</sup>, C Lomlondjian<sup>4</sup>, M Eleta<sup>5</sup>, S Kochen<sup>6</sup>

1 Centro de Derivación de Epilepsia. División Neurología. Hospital J.M. Ramos Mejía., 2 Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. Dr. Eduardo De Robertis, Facultad de Medicina. UBA., 3 CEFYBO., 4 CONICET, 5 Fundación Jaime Roca (TCBA), 6 UBA

En la Epilepsia Temporal Mesial (ETM), la memoria es la función cognitiva más frecuentemente afectada. En los pacientes candidatos a cirugía, la Resonancia Magnética Funcional (fMRI) contribuye a establecer el hemisferio dominante para el lenguaje y resulta una promisorio herramienta en la evaluación de la memoria. El objetivo de este trabajo fue establecer la metodología adecuada para analizar la función memoria en estos pacientes. Metodología aplicada. Se analizaron 21 pacientes (p) con ETM, candidatos a cirugía. Todos los pacientes fueron evaluados neuropsicológicamente antes de la cirugía. En un caso se efectuó, además, la evaluación post-quirúrgica. Se realizó fMRI en todos los casos, donde se evaluó el lenguaje y la memoria. Se utilizaron los siguientes paradigmas de evaluación: Lenguaje: denominación de figuras y fluencia verbal. Memoria: aprendizaje de figuras, reconocimiento de estímulos nuevos y tarea de decisión semántica. Los pacientes fueron entrenados 24/48 hs. antes de la toma de las imágenes. **Resultados:** En 5 p. (23.8%) no se observó respuesta al paradigma utilizado. En 5 p. (23.8%) se observó activación unilateral de la región temporal mesial, en 1 p. de este grupo, coincidió con el déficit de memoria constatado por la evaluación neuropsicológica previa y en 4 p. fue contralateral al déficit. En 10 p. (47.6%) se observó activación de ambas regiones temporales para el paradigma planteado. En el caso con evaluación post-quirúrgica, la activación de la región temporal, fue bilateral antes y después de la cirugía. **Conclusión:** Con los paradigmas utilizados logramos localizar áreas de procesamiento de la memoria episódica en el 76% de los casos. Este método no cruento resulta promisorio para la investigación de las funciones cognitivas en el ser humano. Es imprescindible contar con mayor número de pacientes para obtener resultados más determinantes.

**0328. (0547) EFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA COORDINACIÓN NEUROMUSCULAR Y EL ESTADO OXIDATIVO CEREBRAL DE LA DESCENDENCIA. LA MELATONINA... ¿LOS CONTRARRESTA? ME Pallarés<sup>1</sup>, MN Gobetto<sup>1</sup>, G Chauhan<sup>2</sup>, MC Ríos de Molina<sup>2</sup>, RA Cutrera<sup>1</sup>**

1 Laboratorio de Neurobiología y Ritmos, Dpto de Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires, 2 Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo. Dpto de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar los efectos del estrés prenatal sobre la coordinación neuromuscular y el estado oxidativo del cerebro de la descendencia. Además, conocido el rol neuroprotector y antioxidante de la melatonina, testear su posible acción. Ratonas Swiss preñadas se dividieron en Control (C), Estrés (E), Melatonina (M) ó E+M. El estrés consistió en tres sesiones diarias de 45' de inmovilización, durante la última semana de gestación; la melatonina se suministró en el agua de bebida (25 mg/l) desde el día 7 de preñez hasta el parto. La coordinación neuromuscular se evaluó con el test de la cuerda floja (Tight rope) al 1er y 2do mes de vida. Los estudios bioquímicos se realizaron sobre cerebros extraídos de animales de 45 días de edad. Se evaluaron los niveles de Malondialdehído (MDA) (daño lipídico), y la actividad de Superóxido dismutasa (SOD) y niveles de glutatión reducido (GSH), como defensas antioxidantes. Se usó la prueba de Mann Whitney para analizar los datos comportamentales y ANOVA de dos vías para los bioquímicos. El grupo E presentó el mejor desempeño en la cuerda floja (P=0,015 machos 1er mes; p<0,001 hembras 2do mes) respecto a C. Pero en el grupo E+M el desempeño fue significativamente menor respecto de E (p<0,001 machos; P=0,029 hembras) aunque similar a los controles. En los cerebros de los machos, GSH estaba aumentado en los grupos E y E+M respecto a sus controles (P=0,008) mientras que los niveles de MDA estaban disminuidos sólo en

E+M (P=0,02). En hembras E y E+M, la actividad de SOD era mayor (P=0,04) y los niveles de MDA menores que los controles (P=0,02). Además, los niveles de GSH también aumentaron en E+M (P=0,008). Estos resultados permiten sugerir a la melatonina como posible agente supresor de los efectos inducidos por el estrés prenatal: por un lado revierten las alteraciones comportamentales observadas en los animales estresados al mismo tiempo que incrementan las defensas antioxidantes en el cerebro.

**0329. (0502) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DE LAS NEURONAS SEROTONINÉRGICAS (5HT) POR UNA SOBRECARGA DE SODIO CORPORAL.** A Godino, HF Carrer, L Vivas

Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC), Córdoba, Argentina.

Nuestros resultados previos indican que la actividad de las neuronas 5HT del núcleo dorsal del rafe (NDR) es modulada por el estatus de agua y sodio corporal. La expresión de Fos (marcador de actividad neuronal) incrementó luego de la ingesta inducida de sodio y después de la expansión del volumen corporal, mientras que disminuyó cuando los animales fueron depletados de sodio por diálisis peritoneal. El objetivo del trabajo fue analizar los cambios en la frecuencia de disparo de las neuronas 5HT del NDR después de una sobrecarga de sodio corporal. Ratas Wistar macho adultas fueron anestesiadas, canuladas en la yugular y colocadas en un aparato estereotáxico para registrar la actividad unitaria espontánea (potenciales de acción) de neuronas 5HT del NDR. Luego de 3min de registro basal, un grupo de animales recibió una infusión sc (1,7ml en 1min) de NaCl 2M; un segundo grupo recibió el mismo volumen de NaCl 0,15M. Se registró la actividad durante los 15min posteriores a la infusión y luego se determinó el fenotipo neuronal según la respuesta a la infusión iv de fluoxetina (1mg/kg). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de 1 vía con medidas repetidas, considerando significativas las diferencias con p<0,05. En los animales que recibieron NaCl 2M se observó un incremento significativo en la frecuencia de descarga (1,99±0,39Hz) de las neuronas 5HT en relación al grupo con NaCl 0,15M (1,1±0,21Hz). Este aumento fue estadísticamente significativo en relación a los niveles basales (1,32±0,21Hz) 4min después de la infusión y se mantuvo hasta los 15min de realizada la misma. Por el contrario, la infusión con NaCl 0,15M no indujo cambios significativos en la frecuencia de disparo. En suma, nuestros resultados sugieren que las neuronas 5HT del NDR incrementan su frecuencia de disparo en condiciones de hipernatremia sistémica, posiblemente para modular la ingesta y excreción de agua y sodio, evitando así una expansión del volumen corporal. Subsidiado: ANPCyT y CONICET.

**0330. (0354) DIFERENCIAS EN EL DEPÓSITO CORTICAL DE LA ENZIMA DEGRADADORA DE INSULINA EN CEREBROS CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER FAMILIAR Y ESPO-RÁDICA.** VB Dorfman<sup>1</sup>, L Pasquini<sup>2</sup>, M Riudavets<sup>3</sup>, EM Cas-taño<sup>1</sup>, L Morelli<sup>1</sup>

1 Fundación Instituto Leloir - Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), 2 Departamento de Química Biológica, Instituto de Química y Físicoquímica Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET, 3 Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI)

Una característica de la enfermedad de Alzheimer (AD) es la acumulación progresiva de Aβ en el cerebro. AD se clasifica en familiar (FAD): precoz, causada por mutaciones en el precursor de Aβ o en presenilina (PS), y esporádica (SAD): tardía, con factores de riesgo genéticos y ambientales. La enzima degradadora de insulina (EDI) degrada Aβ en el cerebro. Su déficit facilita el aumento de los depósitos de Aβ40/42. **Objetivo:** Localizar EDI en cerebros SAD, FAD y controles (CTL). Muestras: Cortes coronales parafinados de CTL (n=10, edad de muerte -edm-: 84±10 años),

SAD-BSIV (BS=Braak Stage, n=4, edm: 84±5 años), SAD-BSVI (n=12, edm: 84±5 años), tiempo de evolución de la patología -te: 10±4 años, cedidos por el Dr. Troncoso, Inst. J. Hopkins, USA) y FAD (n=8, edm: 58±9 años, te: 4±3 años, con la mutación PS1-E280A, cedidos por el Dr. Lopera, Univ. Antioquia, Colombia). **Resultados:** Detectamos EDI por inmunohistoquímica en un subgrupo de depósitos parenquimales y vasculares reactivos para A $\beta$ 40. Encontramos diferencias significativas en el número de depósitos parenquimales EDI (+) entre SAD-BSVI vs. SAD-BSIV y FAD vs. SAD-BSVI (SADIV=10,5±3,4, SADVI=20,4±3,5, FAD=4,6±3,8; p<0,01). Mediante microscopía confocal observamos sobre-expresión de EDI en astrocitos GFAP (+) de sustancia gris (SG) en todos los casos SAD y FAD, mientras que en sustancia blanca (SB), sólo en 3 casos FAD. Evaluamos la patología de la SB mediante histología e inmunohistoquímica (Eriocromo-Cyanina R y MBP). Conclusiones: La agregación de EDI, sólo asociada a A $\beta$ 40 fibrilar, refleja su origen vascular. Los depósitos de EDI dependen del estadio neuropatológico y de la evolución temporal de la enfermedad. La agregación de EDI en los depósitos podría causar su disminución en cerebros AD previamente descripta. En SG, EDI se sobre-expresaría en astrocitos como respuesta al depósito fibrilar y en SB, estaría asociada a un rol de la glía en la neuroprotección temprana. IIRG 03-5312. PICT 38009.

**0331. (0401) ESQUIZOFRENIA FAMILIAR Y AGNOSIA OLFACTORIA EN RELACIÓN CON EL FENOTIPO NEUROBIOLÓGICO.** M Otero Losada

CONICET

**Introducción.** La dificultad para identificar olores (en ausencia de cambios en la sensibilidad) suele observarse en la esquizofrenia (agnosia olfatoria). Áreas como la corteza orbitofrontal y entorrinal o el núcleo dorsomedial del tálamo, fundamentales para la olfacción normal, se hallan comprometidas en la esquizofrenia. **Objetivo.** Determinar si la agnosia olfatoria se relaciona con el fenotipo neurobiológico (síntomas psicóticos) en familias multigeneracionales con esquizofrenia familiar. **Método.** Se administró birrinalmente la prueba de identificación olfatoria de la Universidad de Pennsylvania (UPSIT) a 3 grupos de sujetos: 11 psicóticos (EP) y 21 no psicóticos (EN) ambos con historia de esquizofrenia familiar y a 32 sujetos sanos (S). El método (UPSIT) cuantifica la respuesta olfatoria (i.e. correlación percepción-estimulación) y consiste en detectar, reconocer e identificar 40 odorivectores microencapsulados en fase sólida. **Resultados.** La frecuencia de hiposmia observada fue (% de casos): 67% en EP (esquizofrenia familiar, psicóticos), 48% en EN (esquizofrenia familiar, no psicóticos) y 10% de S (Chi<sup>2</sup>=6.8, df=2, p<0.03). El desempeño olfatorio varió con el grupo [F<sub>grupo</sub> (5.641;2;58), p<0.006] siendo EP el grupo que peor respondió y S el que mejor lo hizo. La edad, género y tabaquismo no afectaron la respuesta olfatoria [F<sub>edad</sub> (2.354;1;58), n.s.; F<sub>género</sub> (1.846;1;58), n.s.; F<sub>tabaquismo</sub> (0.997;1;58), n.s.]. El desempeño olfatorio se relacionó con el diagnóstico psiquiátrico (psicosis vs no psicosis) [F<sub>psicosis</sub> (4.038;1;60), p<0.049] independientemente de la historia psiquiátrica familiar [F<sub>familia</sub> (0.399;1;60), n.s.]. No se observó interacción entre la historia psiquiátrica familiar y el diagnóstico psiquiátrico en relación con la respuesta olfatoria [F<sub>psicosis x familia</sub> (0.611;1;60), n.s.]. **Conclusión.** La agnosia olfatoria podría indicar cierta predisposición a desarrollar psicosis en individuos con historia familiar de esquizofrenia.

**0332. (0567) EFECTO DE LA EXPRESIÓN CRÓNICA DE TNF EN LA VIABILIDAD DE LAS NEURONAS DE LA SUBSTANTIA NIGRA DE RATAS ADULTAS.** AL De Lella Ezcurra, M Chertoff, F Pitossi

Fundación Instituto Leloir- CONICET

La Enfermedad de Parkinson se caracteriza por la muerte de neuronas en la substantia nigra (SN). La expresión de citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF) se ha relacionado tanto a la muerte como a la sobrevida neuronal. Datos previos indican que la concentración de TNF determina

posee un efecto neurodegenerativo o protector. El objetivo general del proyecto es determinar los mecanismos por los cuales el TNF ejerce su efecto dual sobre la viabilidad neuronal. En primer lugar, se estudió el efecto de la sobre-expresión crónica de TNF en la SN de ratas adultas. Para ello, se sobre-expresó TNF en la SN por medio de un adenovector recombinante, usándose como control la misma dosis de un adenovirus que expresa  $\beta$ -galactosidasa. En los animales tratados con TNF se observa una pérdida progresiva de neuronas Tiroxina Hidroxilasa (TH) positivas en la SN. A los 7 y 14 días no se detecta un efecto degenerativo. Sin embargo, a los 21 días disminuye el porcentaje de neuronas TH+ en el lado ipsilateral con respecto al contralateral a la inyección (55%), tornándose significativamente menor que en los controles (83%). El test del cilindro muestra una disminución significativa en el uso de la pata contralateral a la inyección en los animales que sobre-expresan TNF a los 20 días (pero no en los otros tiempos estudiados ni en los controles). En todos los casos existe un infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos, que disminuye a lo largo del tiempo. Se observa activación de microglía (células GSA+), que disminuye con el tiempo, y de astroglia (células GFAP+), que aumenta con el tiempo. La respuesta inflamatoria se encuentra más extendida en los animales que sobre-expresan TNF que en los controles. Por lo tanto, el TNF ejerce un efecto neurodegenerativo sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN, que tiene repercusiones motoras. Este modelo animal nos permitirá identificar el mecanismo de neurodegeneración mediado por TNF en la SN.

**0333. (0827) MECANISMOS DE MODULACIÓN PURINÉRGICA DE LA RESPUESTA HIPERTÓNICA EN TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS.** M Veggetti, S Muchnik, A Losavio

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari - Laboratorio de Neurofisiología - Universidad de Buenos Aires

En trabajos anteriores hemos demostrado que las purinas (ATP/ADP y adenosina) inducen inhibición presináptica de la liberación de ACh a través de un mecanismo multimodal: disminuyendo la entrada de Ca<sup>2+</sup> a la terminal nerviosa y modulando algún paso del proceso exocitótico independiente a la entrada de Ca<sup>2+</sup>. Nuestro objetivo fue investigar los mecanismos de transducción intracelular involucrados en la acción de las purinas sobre la maquinaria de liberación. En diafragmas de ratones CF1 se estudió el efecto de CCPA y 2-MeSADP (agonistas de los receptores de adenosina A<sub>1</sub> y de ATP P2Y<sub>12/13</sub> respectivamente) sobre la respuesta hipertónica (RH, incrementa la frecuencia de potenciales de placa miniatura por un mecanismo independiente al Ca<sup>2+</sup>) en presencia de antagonistas de diferentes vías de señalización. Se demostró que el inhibidor de PKA H-89 no previene el efecto modulador de CCPA y 2-MeSADP sobre la RH (CCPA: pico RH 60.9 ± 6.0% del control p<0.05, área bajo la curva 58.7 ± 2.8% del control p<0.05, n=4; H-89 + CCPA: pico 64.0 ± 1.2% p<0.05, área 81.7 ± 3.7% p<0.05, n=4; 2-MeSADP: pico 54.7 ± 4.8% p<0.05, área 61.8 ± 3.0% p<0.05, n=4; H-89 + 2-MeSADP: pico 59.4 ± 4.2% p<0.05, área 68.8 ± 4.2% p<0.05, n=4), mientras que el inhibidor de PKC chelitrina no modificó el efecto de CCPA pero sí el de 2-MeSADP (chelitrina + CCPA: pico 63.1 ± 7.3% p<0.05, área 73.5 ± 2.2% p<0.05, n=3; chelitrina + 2-MeSADP: pico 110.2 ± 6.9% p<0.05, área 113.4 ± 5.0% p<0.05, n=5). El inhibidor de calmodulina W-7 ocluyó el efecto de CCPA y 2-MeSADP (W-7 + CCPA, pico 113.6 ± 8.6% p<0.05, área 117.4 ± 14.2% p<0.05, n=4; W-7 + 2-MeSADP: pico 93.3 ± 5.6% p<0.05, área 111.7 ± 14.0% p<0.05, n=4). Los resultados sugieren que en sinapsis neuromuscular de mamífero, el efecto modulador de CCPA sobre el proceso exocitótico independiente a la entrada de Ca<sup>2+</sup> está vinculado a la calmodulina, mientras que la acción de 2-MeSADP involucra a calmodulina y PKC. La cascada AMPc/PKA no está relacionada a la acción de ambas purinas.

**0334. (0704) PREGNENOLONA MODULA LA ACTIVIDAD DE LA 3-b-HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA EN AMÍGDALA DE RATAS MACHO.** F Nanfaró<sup>1</sup>, VS Bazzocchini<sup>2</sup>, AS Vega Orozco<sup>1</sup>, JO González<sup>1</sup>, RJ Cabrera<sup>1,2</sup>, R Yunes<sup>1</sup>

1 LINCE-IMBECU-CONICET, Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, 2 Centro de Investigaciones Superiores, Universidad de Mendoza

La pregnenolona (Preg) es un neuroesteroide (NE) astrocitario con propiedades moduladoras sobre la actividad neuronal. Nuestro objetivo fue estudiar si dicho NE modula la actividad de la 3- $\beta$ -hidroxisteroide deshidrogenasa (3- $\beta$ -HSD) en amígdala total, conocida por su relación con la regulación de estados emocionales. La administración de reactivos se realizó intracerebroventricularmente (i.c.v) en ventrículo lateral. Previamente (48 hs) los animales fueron impregnados con estrógeno a razón de 25  $\mu$ g/rata. Las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron ambas amígdalas. Las enzimas fueron medidas por espectrofotometría expresándose la actividad enzimática como la  $X \pm SEM$  en mU/ $\mu$ g de proteínas, y analizados estadísticamente por métodos paramétricos. Se utilizaron ratas macho adultos divididas en seis grupos: 1) Control (C): macho intacto al que se le administró líquido cefalorraquídeo artificial (LCR; n=5); 2) Experimental: a) animal intacto al que se le administró Preg 6 $\mu$ M.; b) animal orquidectomizado impregnado con estrógeno (ORXE) al que se le administró LCR; c) ORXE + Preg 6  $\mu$ M.; d) ORXE + LCR a los que se le efectuó adrenalectomía (ADX); e) ORXE + Preg 6  $\mu$ M + ADX. Nuestros resultados muestran que Preg modula inhibitoriamente la expresión de la 3- $\beta$ -HSD en sujetos intactos ( $X \pm SEM$  0.01 $\pm$ 0.003;  $p < 0.001$ ), y lo hace alcanzando niveles similares a los obtenidos por la castración (0.01 $\pm$ 0.002;  $p < 0.001$ ) como único tratamiento con respecto al grupo control (0.07 $\pm$ 0.01). La ADX no modificó los valores con respecto a los grupos no adrenalectomizados, sugiriendo que dicha glándula y su aporte esteroideo endógeno no juega ningún rol en relación a los niveles de 3- $\beta$ -HSD en amígdala. Podemos afirmar que la Preg, como los esteroides gonadales, participan activamente modulando la neurosteroidogénesis de la amígdala, pudiendo participar en la modulación de respuestas emocionales.

**0335. (0627) PREVALENCIA DEL SÍNDROME DE PIERNAS INQUIETAS (SPI) EN ARGENTINA.** GG Persi<sup>1</sup>, AC Ayarza<sup>1</sup>, JL Etcheverry<sup>2</sup>, C Vecchi<sup>2</sup>, VL Parisi<sup>1</sup>, EM Gatto<sup>1,2</sup>

1 Sanatorio de la Trinidad Mitre, 2 Instituto Neurociencias de Buenos Aires (INEBA)

La prevalencia de SPI en el mundo varía notablemente en diferentes poblaciones, existiendo solo 2 reportes referidos a Latinoamérica. El propósito de este estudio es estimar la prevalencia y frecuencia de síntomas de SPI en nuestro medio. Se realizó un estudio transversal en Capital Federal (CF) y 3 ciudades de la provincia de Buenos Aires con <30.000 habitantes (AR); utilizando un cuestionario anónimo, autoadministrado, conteniendo los criterios diagnósticos para SPI y 2 ítems para estimar frecuencia y conocimiento general del síndrome. Se consideraron positivos (SPI+) aquellos con respuesta afirmativa para 4/4 de los criterios establecidos internacionalmente. De un total de 479 sujetos (60% mujeres); 401 de CF y 78 de AR; la prevalencia total de SPI+ fue 20.04% (96/479), 20,95% para CF y 15,38% para AR ( $p > NS$ ); Considerando solo aquellos con síntomas = 2 veces/mes la prevalencia fue de 14.19% en el total, 15,99% para CF y 5,13% para AR ( $p < 0,0196$ ), en tanto que en aquellos con síntomas = 2 veces/semana fue de 10.81% en el total, 12,44% en CF y 2,56% en AR ( $p < 0,0179$ ). La prevalencia mostró correlación con la edad (17% en < 61 años vs. 31.58% en > 60 años;  $p < 0.0001$ ) y fue significativamente mayor en mujeres (3:1). Este estudio muestra que el SPI es frecuente en nuestro medio con una prevalencia similar a poblaciones de origen Norteamericano o Europeo, que podría deberse a la composición étnica de nuestra sociedad. Cuando se ajustó por frecuencia de síntomas, se observó prevalencia inferior de SPI en habitantes de localidades de menor densidad poblacional con respecto a Capital Federal, lo cual podría sugerir influencia de factores ambientales y/o culturales sobre su expresión y/o severidad.

**0336. (0178) COMPARACIÓN DE CÉLULAS ENVOLVENTES OLFATORIAS DERIVADAS DE MUCOSA OLFATORIA, BULBO OLFATORIO HUMANO Y BULBO OLFATORIO DE RATA.** V Heyd, D Fernandez Espinosa, G Sevlever, R Marengo

Laboratorio de biología del desarrollo celular. FLENI

**Introducción y objetivos:** Las células envolventes olfatorias (CEO) tienen propiedades similares a las células de Schwann promoviendo el crecimiento y regeneración de los axones. Estas células son únicas entre la glia, ubicándose por fuera como por dentro del SNC, en el bulbo olfatorio. La identificación de las CEO adultas, el desarrollo de técnicas para su cultivo y los efectos beneficiosos a través de su trasplante en animales experimentales han dado pie para explorar los efectos terapéuticos del trasplante de CEO en lesiones de la medula espinal en humanos. La caracterización y supervivencia de estas células son un paso primordial para su posterior utilización. En este trabajo nos hemos avocado a la obtención y caracterización y comparación en individuos adultos de dichas células con inmunomarcadores específicos. **Metodología:** Las biopsias son procesadas y resuspendidas en medio completo. Las células derivadas son cultivadas a 37°. Posteriormente son fijadas e incubadas con anticuerpos contra GFAP, S-100 y Nestina. **Resultados:** Al cabo de dos semanas las células de bulbo desarrollaron un claro fenotipo glial, siendo positivas para GFAP, un marcador astrocitario como S-100 y Nestina. Las células derivadas de bulbo olfatorio de ratas presentaron una morfología elipsoidal con largos procesos y se diferencian a progenitores neurales. En cuanto a las células derivadas de mucosa olfatoria el fenotipo se modifica adquiriendo una morfología más plana y ahusada. La expresión elevada de GFAP y niveles constantes de nestina, sugieren que las células gliales obtenidas pueden ser precursores de neuronas y de otros tipos de macroglía. **Conclusiones:** Los resultados indican que el cultivo y crecimiento de las CEO es un método simple y sencillo de obtención de un pool de células fenotípicamente adecuadas para implementar como futura terapia celular.

**0337. (0540) EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE TGF-BETA EN LA VÍA NIGRO-ESTRIATAL.** P Mathieu, F Pitossi

Fundación Instituto Leloir-CONICET. Buenos Aires

En la enfermedad de Parkinson se produce la degeneración de las neuronas de la sustancia nigra (SN) que proyectan hacia el cuerpo estriado. La presencia de precursores neuronales en la SN que puedan dar origen a nuevas neuronas dopaminérgicas es tema de controversia hasta el momento. Puesto que hemos demostrado que el factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) es pro-neurogénico in vitro, evaluamos este efecto en la SN mediante la inyección de vectores adenovirales que expresan esta citoquina (Ad-TGF) o el gen de la b-galactosidasa (Ad-bGal) como control. Si bien la respuesta inflamatoria producida por la inyección se reducía con el tiempo, se observó una disminución en la población de neuronas dopaminérgicas del 25% a los 14 días luego de la inyección, mientras que la expresión de TGF- $\beta$  y b-Gal se mantuvo hasta los 21 días post-inyección. Al analizar la proliferación de precursores neuronales se concluyó que, si bien se detectaban células en proliferación estas no colocalizaban con marcadores neuronales, por lo tanto la expresión de TGF- $\beta$  no sería suficiente para promover la neurogénesis en la SN, o bien la inflamación generada por la inyección del adenovector estaría interfiriendo con el efecto neurogénico de esta citoquina. Debido a estos resultados se ha comenzado a evaluar el efecto de la expresión de TGF- $\beta$  inyectando el vector en el fascículo medial anterior el cual conecta la SN y el cuerpo estriado. Por otro lado, se está analizando el efecto de la expresión crónica de esta citoquina en el cuerpo estriado, donde podría tener un efecto protector contra la neurodegeneración. Además, con el fin de transplantar progenitores adultos neuronales como medio de liberación de factores anti-inflamatorios, se determinó que con 5x10<sup>8</sup> partículas infectivas/ml de Ad-bGal se obtiene un 80% de transducción, y

que luego de la transducción tanto con el Ad-bGal como con el Ad-TGF el fenotipo de las células no difieren significativamente del control (células sin transducir).

**0338. (0018) CONDUCTAS EXPLORATORIAS ESPONTÁNEAS DE DECISIÓN PREFERENCIAL EN LA RATA: PAPEL DEL HIPOCAMPO.** EO Alvarez, VA Abrego

*Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo*

La exploración de ambientes desconocidos en los animales involucran pautas comportamentales donde muchas veces se adoptan estrategias de acción que implican decisiones espacialmente lateralizadas. El objetivo del presente trabajo es tratar de caracterizar estas conductas espontáneas y evaluar si el hipocampo (HPC) podría estar involucrado. Se trabajó con ratas macho, las que fueron implantadas bilateralmente en el HPC con cánulas de microinyección. Se dispusieron de los siguientes grupos: (1) Salina en ambos HPC (n=12); (2) Lidocaina 2?g en HPC izquierdo (n=15) y Lidocaina 2?g en HPC derecho (n=13). 48 h después del implante, los animales fueron microinyectados en el HPC con salina o lidocaina y a los 5 min siguientes, testados en el Laberinto en "T" (LT), Laberinto de Elección Múltiple (LEM) y en el Laberinto Doble Hole-board Lateral (LDHBL), dispositivos que evalúan tendencias dicotómicas lateralizadas. Los resultados mostraron que tanto en el LT, como en el LEM, el grupo Salino no evidenció decisión preferencial (7 elecciones izquierdas Vs 5 elecciones derecha en el LT, n.s.; 6.5±1 elecciones izquierdas Vs 6.5±1.2 elecciones derecha en el LEM, n.s.). En cambio en el LDHBL la exploración horizontal y aérea de la pared izquierda fue significativamente mayor que la de la pared derecha (32±6.1 Cuentas Vs 16±4.8 Cuentas; p<<0.01). La inactivación selectiva neuronal del HPC derecho, no modificó el patrón exploratorio comparado con el grupo control. Sin embargo, la inactivación del HPC izquierdo provocó un aumento significativo de la exploración de la pared izquierda y derecha (46±3.85 seg Vs 32±6.1 seg; pared izquierda, HPCizq Vs Control, p<0.05; 33±4.59 seg Vs 16±4.8 seg; pared derecha, HPCdizq Vs Control, p<0.01). Los resultados sugieren que parte de las conductas espontáneas de decisión preferencial están mediadas por el HPC.

**0339. (0020) ACTIVACIÓN DE LOS CIRCUITOS NEURONALES HISTAMINÉRGICOS DE LA AMÍGDALA BASO-LATERAL EN LA EXPRESIÓN LATERALIZADA DE LA CONDUCTA EXPLORATORIA EN LA RATA.** EO Alvarez, AM Banzan

*Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza*

**Resultados** previos de este laboratorio han mostrado que la amígdala baso-lateral (ABL) de la rata está comprometida en la modulación lateralizada de conductas exploratorias. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si los circuitos histaminérgicos presentes en la ABL podrían estar participando en este tipo de control conductual. Para ello, se trabajó con ratas macho adultas las que se implantaron bilateralmente con cánulas de microinyección en la ABL. Se dispuso de los siguientes grupos: Animales tratados con lidocaina (Lid) 2 µg en la ABL izquierda y: [1] salina en la ABL derecha (n=15); [2] histamina (HA) 9 nmol en ABL derecha (n=10); [3] HA 45 nmol en ABL derecha (n=13); [4] HA 90 nmol en ABL derecha (n=14). Animales tratados con Lid 2 µg en la ABL derecha y: [5] salina en la izquierda (n=16); [6] HA 9 nmol en la izquierda (n=13); [7] HA 45 nmol en la izquierda (n=10); [8] HA 90 nmol en la izquierda (n=13). Salina en las dos ABL se consideró control (n=10). 48 h después del implante, los distintos grupos fueron microinyectados con sal, y/o lidocaina y/o HA, según fuese el caso. 5 minutos más tarde, todos los animales se testaron en una caja de hole-board con medición automática del comportamiento, durante la exploración del ambiente novedoso no conflictivo. Los resultados mostraron que la inactivación selectiva de la ABL izquierda o derecha no modifica los parámetros motores generales de los animales. No obstante, HA inhibió significativamente las actividades horizontales, ambulatorias y no ambu-

latorias en ambas amígdalas (1879±303 Cuentas/5min Vs 4032±232 Cuentas/5min; Lid/HA90 Vs Lid/Sal; Lid en ABL izquierda/HA en ABL derecha p<0.01). En las conductas exploratorias la actividad vertical fue inhibida diferencialmente por HA en la ABL izquierda (2.5 ±1.2 veces Vs 10.7 ±3.1 veces; ABL izquierda Vs AVL derecha, p<0.05). Los resultados sugieren la participación de HA y confirman la lateralidad de algunas conductas exploratorias.

**0340. (0254) MARCADORES CELULARES EN LA MEDULA ESPINAL SENIL.** F Lozza<sup>1</sup>, PA Fontana<sup>1</sup>, CG Barbeito<sup>1</sup>, EJ Gimeno<sup>1</sup>, RG Goya<sup>2</sup>, EL Portiansky<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Análisis de Imágenes. Instituto de Patología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata, 2 INIBIOLP. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata*

Los cambios morfológicos de la médula espinal asociados al envejecimiento han sido poco estudiados. Aquí se presentan las variaciones observadas en algunos marcadores celulares durante el envejecimiento, a nivel de los segmentos cervicales (C1-C8) de la médula espinal. Ratas Sprague Dawley de 5 (jóvenes) y 32 (seniles) meses, clínicamente sanas, fueron perfundidas a blanco. Los segmentos cervicales fueron seccionados en cortes coronales de 40 µm mediante vibrátomo. La tinción con violeta de cresilo permitió el reconocimiento de estructuras. Se realizó inmunohistoquímica (IHQ) e inmunofluorescencia (IF) para los siguientes marcadores celulares: neurofilamentos (NF), GFAP, S100 y vimentina. Como sistema de detección IHQ se utilizó el método EnVision y la diaminobencidina como cromógeno. Para la IF se utilizaron anticuerpos marcados con Alexa 488. La densidad óptica (DO) de la reacción IHQ positiva o la intensidad de tinción IF fue cuantificada mediante un analizador digital de imágenes. El porcentaje de estructuras teñidas positivamente fue determinada mediante la siguiente fórmula: %ArealIHQ = área positiva / área total \* 100. En todos los segmentos analizados de las ratas seniles se observó un incremento del %ArealIHQ ocupado por NF, de aproximadamente 50%, pero no varió su DO. El %ArealIHQ de la GFAP astrocítica fue significativamente mayor en las ratas jóvenes así como su DO (0.58±0.01 vs. 0.48±0.01). No se observaron diferencias en la DO para las células gliales marcadas con S100, pero si en su número, que fue mayor en los animales seniles. La DO de vimentina en las células endoteliales decayó significativamente con la edad. Por su parte, el %ArealIHQ decayó con la edad y de C1 a C8. El aumento de la expresión de NF podría justificar el aumento de tamaño de los segmentos cervicales en las ratas seniles. Estos resultados, sumados a nuestros estudios previos, revelan que el envejecimiento ejerce un significativo impacto sobre la estructura de la médula espinal.

## INMUNOLOGÍA IV

**0341. (0017) BRUCELLA INVADE E INDUCE LA PRODUCCIÓN DE QUEMOQUINAS EN CÉLULAS EPITELIALES RESPIRATORIAS HUMANAS.** MC Ferrero, CA Fossati, PC Baldi

*IDEHU, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA*

En humanos *Brucella* puede ingresar por mucosa respiratoria y causar infección sistémica. Investigamos la capacidad de *B. abortus* 2308 (cepa virulenta lisa) y *B. abortus* RB51 (vacunal rugosa) para infectar e inducir la secreción de quemoquinas en líneas de epitelio bronquial (Calu-6) o alveolar (H460) humano. Para ello las células fueron infectadas 16 hs. a razón de 200 bacterias/célula. A las 2, 24 y 48 hs. posinfección (p.i.) se cuantificaron las bacterias intracelulares por ensayos de protección con gentamicina y recuento de UFC. Las cepas ensayadas se adhieren e invaden las células Calu-6 y H460. En Calu-6 la adherencia de *B. abortus* RB51 es significativamente mayor que la de la cepa lisa (7.1 ±1.2 x10(6) vs. 7.5±1.7 x10(5) UFC/ml), y lo mismo ocurre con la invasión (6±2.3 x10(5) vs. 3.9±0.8 x10(4) UFC/ml). Sin embargo, sólo la cepa lisa logra replicarse intracelularmente (1.0 ±0.1 x10(4) y 9.2 ±1.0

x10(6) UFC/ml a 48 hs. p.i. para *B. abortus* rugosa y lisa, respectivamente). **Resultados** similares se encontraron para H460. La infección aumentó la producción de IL-8 en Calu-6, detectándose a las 48 hs. p.i 1756±31 pg/ml y 3027±10 pg/ml en sobrenadantes de cultivo de células infectadas con cepa lisa o rugosa versus 138±23 pg/ml en las no infectadas. La infección de H460 no induce la secreción de citoquinas, lo que concuerda con nuestros resultados previos para la infección de una línea de neumocitos tipo II humanos (A549). Sin embargo, las A549 estimuladas con medio condicionado de monocitos (THP-1) infectados con *B. abortus* 2308 secretan MCP-1 e IL-8 en forma dependiente de la cantidad de medio agregado (MCP-1 a las 24 hs: 5803±8.9 pg/ml dil. 1/2, 4843±77 pg/ml, dil. 1/5, 4370±28.3 pg/ml, dil. 1/10 vs 2200±5.5 pg/ml basal). Las células epiteliales bronquiales responden a la infección por *Brucella* secretando quemoquinas, mientras que las alveolares lo hacen indirectamente, a través del estímulo por factores secretados por macrófagos infectados.

**0342. (0245) ROL DE LA INTERLEUQUINA 12 (IL-12) EN LA POLARIZACIÓN DE TIMOCITOS.** MC Rodríguez Galán<sup>1</sup>, SG Correa<sup>1</sup>, HA Young<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Inmunología. Dpto. de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Fac. de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina, 2 Laboratory of Experimental Immunology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute-Frederick, National Institutes of Health. Maryland, USA.*

La IL-12 es una citoquina pro-inflamatoria producida por células dendríticas (CDs) y fagocitos. En órganos linfáticos secundarios, la IL-12 es un potente inductor de interferón-gama (IFN $\gamma$ ) y es un factor crítico en la diferenciación Th1 de células T. Varios laboratorios han demostrado que la IL-12 puede ser expresada en el timo por CDs residentes como así también por células epiteliales tímicas y estromales. El rol de la IL-12 en el timo no está bien definido aunque se la postula como un importante mediador en procesos como maduración de timocitos, selección negativa e involución tímica. Previamente hemos demostrado mediante ensayos in vitro que la IL-12 es capaz de polarizar células T en desarrollo hacia un perfil Th1. Para evaluar los efectos de esta citoquina in vivo, administramos por inyección hidrodinámica el cDNA de IL-12 (o IL-12 junto con IL-18 en algunos casos) y determinamos los niveles circulantes de estas citoquinas. Observamos que el marcado aumento de IL-12 ( $p < 0.001$ ) se correlacionó con una pérdida sustancial de células en el timo debido principalmente a la apoptosis de timocitos CD4+CD8+ ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, timocitos en su estado final de maduración (CD4+ o CD8+) experimentaron cambios fenotípicos acordes a un perfil de activación, (expresión de CD69,  $p < 0.05$ ) junto a marcadores asociados a un perfil de tipo Th1 (expresión de CCR5 e IFN $\gamma$ ,  $p < 0.05$ ). Más aún, timocitos aislados de ratones tratados con IL-12 +IL-18 y transferidos adoptivamente a receptores normales mostraron una disminuida proliferación homeostática y una distribución celular alterada en órganos linfoides secundarios ( $p < 0.05$ ). Estos resultados demuestran que la expresión sistémica de IL-12 podría actuar como un factor de diferenciación de timocitos durante su etapa de maduración intratímica condicionando su comportamiento posterior como célula T madura en órganos linfáticos periféricos.

**0343. (0307) ANTÍGENOS DE FASCIOLA HEPATICA MODULAN NEGATIVAMENTE LA RESPUESTA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A SEÑALES PRO-INFLAMATORIAS POR UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE IL-10.** C Falcón, L Cervi

*Dpto. Bioq. Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC, CIBICI-CONICET.*

Las infecciones con helmintos producen patologías de tipo crónico, donde el parásito subsiste en el huésped por varios años. Para lograr esto, interactúan con células del sistema inmune como las células dendríticas (CDs) regulando negativamente su estado de activación. Nuestro objetivo fue estudiar como antígenos

de *F. hepatica*, modulan la respuesta de CDs a ligandos pro-inflamatorios como ligandos para receptores tipo Toll (TLR). Para ello se utilizaron CDs derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6. Estas células, se cultivaron con diferentes ligandos Toll (LPS, Zymosan, Poly I:C), durante 18 hs en presencia o ausencia de un homogenato total del parásito (HT). CDs tratadas con HT y ligandos para TLR mostraron una reducida expresión de moléculas de activación (MHCII, CD40) y una disminuida producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), en comparación con los niveles encontrados en CDs tratadas solo con ligandos TLR. Además este tratamiento incrementó significativamente la producción de IL-10 ( $p < 0.05$ ), aunque la inhibición de esta citoquina, no restituyó la producción de IL-12 ni TNF- $\alpha$ . Dentro de las proteínas que componen el HT, una fracción de bajo PM presentó idéntico efecto inhibitorio en la producción de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) de CDs tratadas con LPS. Ensayos de endocitosis, utilizando HT-FITC, demostraron que receptores como FcR, Dectin-1, receptor de manosa, y otras lectinas tipo C, están involucrados en el reconocimiento e internalización de HT. Este trabajo muestra como CDs pueden ser moduladas por antígenos de bajo PM de *F. hepatica*, para disminuir la respuesta a señales proinflamatorias. La obtención de una proteína moduladora del parásito podría resultar una herramienta útil en el tratamiento de estados altamente inflamatorios.

**0344. (0641) PAPEL DE LA PI3K EN LA MODULACIÓN DEL RECEPTOR PARA FRACTALQUINA, (CX3CR1), EN MONOCITOS HUMANOS.** MV Ramos, GC Fernández, RJ Fernandez-Brando, LV Bentancor, V Landoni, MA Isturiz, MS Palermo

*División Inmunología, IIHEMA Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.*

La fractalquina (CX3CL1), quimioquina expresada en endotelio inflamado, actúa como molécula de adhesión interactuando con su receptor, CX3CR1, presente en monocitos (Mo). La interacción entre CX3CL1-CX3CR1 podría contribuir al daño renal en el Síndrome Urémico Hemolítico. Analizamos la modulación de CX3CR1 en Mo con factores inflamatorios o anti-inflamatorios. Se purificaron Mo de sangre periférica y se incubaron durante 20 hs en Medio, IL-10 (10ng/ml) o IFN- $\gamma$  (240U/ml) para analizar la expresión de CX3CR1 mediante citometría de flujo. Se observó un descenso significativo en el porcentaje de Mo CX3CR1+ durante el cultivo, el cual se inhibe en presencia de IL-10 o IFN- $\gamma$  (0h: Medio =80±2%; 20h: Medio=49±4%\*, IL-10=73±4%#, IFN- $\gamma$  =67±9#); \* $p < 0.05$  vs 0h, # $p < 0.05$  vs 20h Medio; n=8). El efecto de IL-10 se bloquea en presencia de los inhibidores de PI3K: LY294002 (30  $\mu$ M) y wortmanina (Wo, 100nM), (IL-10+Wo=29±9%; IL-10+Ly= 49±8%, n=3). Efectos similares se observaron con IFN- $\gamma$ . Los inhibidores de síntesis proteica, cicloheximida (CHX;1 $\mu$ g/ml) y actinomicinaD (ActD;0.5  $\mu$ g/ml), también evitan este descenso. (Medio=23.9±7.25; CHX= 48.5± 9.7#; ActD= 76.8± 2.7; # $p < 0.05$  vs. Medio, n=4). Se validó el modelo en células THP1, previamente diferenciadas con PMA (5ng/ml) durante 48hs. (Medio= 67±3%, IL-10: 81±3%\*, IFN- $\gamma$ :72±6%\*, (\* $p < 0.05$  vs Medio, n=7); IL-10+Wo=55±8%; IL-10+Ly=56±7%, n=3,  $p < 0.05$  vs IL-10). Luego, con la técnica de Western Blot, se analizó la activación de los factores de transcripción, Stat3 y Stat1, implicados en el mecanismo de transducción de IL-10 e IFN- $\gamma$ . Se encontró que IL-10 fosforila a ambos factores mientras que el IFN- $\gamma$  sólo al Stat1. Concluimos que la expresión de CX3CR1 es modulada por factores inflamatorios/anti-inflamatorios, y que la actividad de PI3K está implicada en los mecanismos de transducción de IFN- $\gamma$  e IL-10. Además, la CHX y ActD impiden el descenso de CX3CR1, probablemente evitando la expresión de novo de alguna proteína implicada en dicha modulación.

**0345. (0735) EFECTOS PRO-INFLAMATORIOS DE MEMBRANA EXTERNA DE YERSINIA ENTEROCOLITICA O:3 EN MACRÓFAGOS PERITONEALES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR P55 DE TNF ALFA.** RJ Eliçabe<sup>1</sup>, C García Samartino<sup>2</sup>, GH Giambartolomei<sup>2</sup>, MS Di Genaro<sup>1</sup>

*1 Inmunología. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis., 2 Laboratorio de*

*Inmunogenética Hospital de Clínicas "José de San Martín".  
Universidad de Buenos Aires.*

Los macrófagos son células que infiltran en forma predominante las sinovias de pacientes con artritis reactiva (ARe), una sinovitis aséptica que desarrolla luego de infecciones en el tracto gastrointestinal o genitourinario. Uno de los agentes infecciosos frecuentemente asociados a esta patología es *Yersinia enterocolitica*, una bacteria Gram negativa que causa enteritis y linfadenitis mesentérica. En estudios previos demostramos que la membrana externa (ME) de *Yersinia* contiene los principales componentes artritogénicos en ratones deficientes en TNFRp55. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la respuesta inflamatoria de macrófagos TNFRp55<sup>-/-</sup> estimulados con ME de *Y. enterocolitica* O:3. Purificaciones de ME fueron realizadas y su perfil proteico analizado por SDS-PAGE. Macrófagos peritoneales provenientes de ratones C57BL/6 normales y TNFRp55<sup>-/-</sup> fueron estimulados con ME y LPS de *Yersinia*. Oxido nítrico (NO) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) fueron determinadas en sobrenadante de cultivo después de 72 hs de estimulación. Se analizaron cambios morfológicos y expresión de RNAm de TLR2, TLR4 y TNF- $\alpha$ . Macrófago TNFRp55<sup>-/-</sup> produjeron mayores niveles de NO luego de ser estimulados con LPS ( $p < 0,001$ ) o ME ( $p < 0,003$ ), y de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) e IL-6 ( $p < 0,05$ ) con ambas estimulaciones. Además, macrófagos TNFRp55<sup>-/-</sup> mostraron una mayor expresión de RNAm de TLR2, TLR4 y TNF- $\alpha$  luego de 4 hs de estimulación con ME. Interesantemente, macrófagos provenientes de ratones C57BL/6 normales mostraron cambios que sugirieron apoptosis a las 72 hs de estimulación, y que correlacionaron con su menor grado de activación. En base a estos resultados concluimos que la deficiencia de TNFRp55 conduciría a una hiperestimulación de los macrófagos con una mayor capacidad de respuesta a componentes bacterianos involucrados en el desarrollo de ARe.

**0346. (0003) INDOLEAMINA 2,3-DIOXIGENASA (IDO) PARTICIPA EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON TRYPANOSOMA CRUZI.** CP Knubel<sup>1</sup>, FF Martínez<sup>1</sup>, C Diaz Lujan<sup>2</sup>, R Fretes<sup>2</sup>, CC Motran<sup>1</sup>

*1 Fac. Cs. Químicas. Dpto. Bioq. Clínica. CIBICI-CONICET. UNC, 2 Fac. Cs. Medicas. UNC*

IDO es una enzima intracelular expresada en macrófagos y células dendríticas que cataliza el metabolismo del triptofano. Es inducida por citoquinas pro-inflamatorias participando activamente en la defensa contra microorganismos intracelulares. Recientemente se ha correlacionado la expresión de IDO con la supresión de la respuesta celular y la inducción de tolerancia. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la participación de la IDO en el control de la infección experimental con *T. cruzi* en dos cepas de ratones con diferente capacidad para montar respuestas inmunes dependientes de citoquinas inflamatorias. Para ello la expresión de IDO así como también los efectos del tratamiento con 1-MT (inhibidor de IDO) sobre el curso de la infección fueron evaluados en ratones BALB/C y B6 infectados con 500 o 3000 tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuén) respectivamente. La infección con *T. cruzi* incrementó la expresión de IDO en células de bazo, tejido cardíaco y músculo esquelético de ambas cepas de ratones. El bloqueo de IDO disminuyó la resistencia a la infección ya que incrementó significativamente los niveles de parasitemia ( $p < 0,05$ ) y disminuyó la sobrevivencia con respecto al grupo control. Además, el bloqueo de IDO modificó el perfil de citoquinas en suero. El tratamiento con 1-MT disminuyó significativamente los niveles de TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  en ambas cepas de ratones mientras que solo los ratones B6 mostraron un incremento en IL-6 e IL-4. El examen histopatológico de músculo esquelético y cardíaco demostró que el bloqueo de IDO está asociado con un mayor número de parásitos, de infiltrados inflamatorios y de áreas de necrosis tisular. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los niveles de células T regulatorias (CD4+CD25+Foxp3+) luego del tratamiento con 1-MT. Nuestros resultados demuestran que ambas cepas de ratones utilizan la vía

de IDO para controlar tanto la replicación del parásito como así también la inmunopatología.

**0347. (0834) MODULACIÓN DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE CÉLULAS NK A TRAVÉS DE PD-1/PD-1 LIGANDOS EN LA TUBERCULOSIS HUMANA.** IB Alvarez<sup>1</sup>, JO Jurado<sup>1, 2</sup>, V Pasquelli<sup>1, 2</sup>, MF Quiroga<sup>1</sup>, J Castagnino<sup>3</sup>, N Roldán<sup>3</sup>, RM Mussella<sup>3</sup>, E Abbate<sup>3</sup>, SS de la Barrera<sup>4</sup>, VE García<sup>1</sup>

*1 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), 2 Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina (UBA), 3 Departamento de Tisiopneumología, Hospital F.J. Muñoz, 4 Academia Nacional de Medicina (UBA)*

Las células NK son un componente central de la respuesta inmune innata, constituyendo una primera línea de defensa contra muchos microorganismos. En la tuberculosis, enfermedad causada por la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), las NK lisan células infectadas por el patógeno y producen INF $\gamma$ , con el fin de activar los linfocitos T y los macrófagos. La función de las NK es regulada por señales activadoras e inhibitorias a través de receptores de superficie: moléculas coestimuladoras y receptores de citoquinas. PD-1, molécula coestimuladora que modula negativamente la activación de células T, posee los ligandos PD-L1 (expresado en células T, B, macrófagos y CD8) y PD-L2 (expresado en células B, CD8 y macrófagos). La vía de PD-1 se definió como vía negativa para la activación linfocitaria, pero su función en las células NK se desconoce. Aquí estudiamos el efecto del bloqueo de la vía de PD-1 sobre la citotoxicidad y la producción de IFN $\gamma$  por NKs de sangre periférica y de derrame pleural (DP) de pacientes con tuberculosis activa. Así, células mononucleares de sangre periférica o de DP se incubaron con anticuerpos bloqueantes anti PD-1, PD-L1 o PD-L2 (separados o combinados) y se estimularon con Mtb. La citotoxicidad se cuantificó por citometría de flujo (expresión de CD107a) y la producción de IFN $\gamma$  por ELISA y citometría de flujo. El bloqueo individual o combinado de PD-1 y PD-L2 aumentó la citotoxicidad inducida por Mtb ( $p > 0,05$ ). El bloqueo de las moléculas de la vía, individual o conjuntamente, indujo una disminución de células NK IFN $\gamma$ + ( $p > 0,05$ ). Más aún, se observó una marcada reducción de la producción de IFN $\gamma$  por ELISA ( $p < 0,05$ ), luego de bloquear PD-1, PD-L2 o ambos. En células NK de DP se observó el mismo efecto modulador al bloquear la vía. Estos datos sugieren que la vía de PD-1, particularmente PD-1/PD-L2, podría tener implicancia en la regulación de las funciones efectoras de las células NK durante la respuesta inmune contra Mtb.

**0348. (0135) GLUCURONOXILOMANANO DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS INDUCE APOPTOSIS DE MACRÓFAGOS MEDIADA POR ÓXIDO NÍTRICO VÍA SEÑALIZACIÓN DE CD18 - PROTEÍNA KINASA C.** LS Chiapello, JL Baronetti, AP Garro, F Spesso, DT Masih

*CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.*

Glucuronoxilomanano (GXM) es el polisacárido mayoritario de la cápsula del hongo levaduriforme *Cryptococcus neoformans*. Previamente demostramos que GXM induce apoptosis de macrófagos mediada por óxido nítrico (NO). El objetivo de este trabajo fue identificar los receptores y vías de señalización de los macrófagos (Mac) involucrados en la producción de NO y apoptosis inducida por GXM, e investigar si este fenómeno ocurre in vivo. Glucuronoxilomanano se obtuvo por precipitación con etanol y CTAB a partir de un cultivo de levaduras. Se utilizaron ratas Wistar y los Mac se purificaron de lavados peritoneales, por gradiente de percoll y adherencia. Los Mac se cultivaron con 250  $\mu$ g de GXM o GXM marcado con FITC (GXM-FITC), en ausencia o presencia de anticuerpos bloqueantes de CD11b/c, FC $\alpha$ RII o CD18; e inhibidores de receptores de manosa, betagluconanos, proteína quinasa C (PKC), tirosina kinasas y MAP kinasas. Luego de 24 o 48 h de cultivo se determinó la endocitosis de GXM-FITC por citometría de flujo (CF), la concentración de nitritos por la re-

acción de Griess y la apoptosis por tinción con yoduro de propidio y CF. Los resultados demuestran que el bloqueo de CD18, FC $\alpha$ RII, CD11b/c y PKC inhibe la captación de GXM por los Mac ( $p < 0,05$ ; IFM de GXM-FITC de Mac + inhibidores versus IFM de GXM-FITC de Mac solos), sin embargo sólo el bloqueo de CD18 y PKC suprime la producción de NO y la apoptosis inducidas por GXM. ( $p < 0,05$ ; Mac + GXM + inhibidores vs Mac + GXM). Por otra parte, se determinó la producción de NO in vivo en macrófagos de ratas inoculadas vía i.p. con solución fisiológica (SF), GXM (5 mg) o LPS (500  $\mu$ g) por 14 horas. Los resultados muestran que Mac de ratas inoculadas con GXM producen mayores niveles de NO que los Mac de ratas inyectadas con SF ( $p < 0,03$ ) y este fenómeno depende de la activación de PKC. Este estudio demuestra una nueva vía de señalización mediante la cual el polisacárido capsular de *C. neoformans* induce NO y muerte de macrófagos.

## INMUNOLOGÍA V

### 0349. (0644) CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE 5 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE HIPERIGM. AC Gómez Raccio, D Di Giovanni, L Regairaz, R Paz, D Carelli, MI Gaillard, J Sardaños, L Bezrodnik

*Inmunología. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Buenos Aires. Argentina*

El síndrome (sme) de hiperIgM incluye un grupo heterogéneo de inmunodeficiencias caracterizadas por infecciones recurrentes asociadas a niveles bajos de IgG, IgA y normales o altos de IgM. **Objetivo:** presentar las características clínicas de 5 pacientes (ptes) con diagnóstico (dg) de sme de hiperIgM. **Material y métodos:** análisis retrospectivo de historias clínicas. Población: 1 mujer, 4 varones (todos con diagnóstico molecular de sme ligado al X). **Resultados:** la edad de comienzo de los síntomas fue en 3/5 ptes antes del 1er año, en los 2 restantes (varones) el dg fue realizado por antecedentes familiares. La mediana de edad al dg fue de 11m (r: 5m-12a). De los pacientes sintomáticos: la pte mujer presentaba antecedentes personales de infecciones recurrentes; otro pte infecciones y episodios de anemia hemolítica, y el tercero distress respiratorio con aspirado traqueal positivo para *Pseudomona*. Sólo 1 pte presenta en su evolución compromiso hepático y autoinmunidad. El dosaje de inmunoglobulinas de 1 pte varón al dg no fue compatible con el sme. Los niveles de IgM al dg variaron entre 36-4460 mg%. La expresión de CD40L fue nula en linfocitos T activados en los pacientes varones. La paciente fallecida nunca alcanzó niveles protectores de IgG séricos. **Conclusiones:** -los pacientes con diagnóstico antes del año son los que tienen mejor evolución; -los antecedentes familiares fueron importantes para la sospecha de este dg en el paciente con dosaje de inmunoglobulinas no característico del sme; -la imposibilidad de alcanzar niveles protectores de IgG sérica consideramos determinó la gravedad de la evolución en la paciente fallecida.

### 0350. (0653) DEFICIENCIA COMPLETA DE IL-12RB1: EFECTO FUNDADOR PARA UNA MUTACIÓN FRECUENTE EN POBLACIÓN ARGENTINA. J Yancoski<sup>1</sup>, A Bernasconi<sup>1</sup>, L Bezrodnik<sup>2</sup>, SD Rosenzweig<sup>1</sup>

*1 Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan, 2 Hospital de Niños R. Gutierrez*

La vía de señalización de la interleuquina-12 (IL-12) juega un rol crítico en el control de infecciones micobacterianas. La deficiencia completa del receptor  $\beta$ 1 de IL-12 (IL-12R $\beta$ 1, compartido por la IL-23) es una de las causas genética mas frecuente del síndrome de susceptibilidad mendeliana a enfermedad por micobacterias. En nuestro laboratorio hemos caracterizados 6 pacientes con ausencia de expresión de este receptor en la superficie de células T y NK y mutaciones en IL-12R $\beta$ 1. Una misma alteración, 1623-1624 del-ins TT, fue hallada en estado homocigota en 2 pacientes y en estado heterocigota en otros 3. Esta mutación representa el 58% de los alelos mutados en nuestra población y un 16% de los alelos reportados en el registro in-

ternacional de mutaciones de IL-12R $\beta$ 1. El tipo de alteración poco habitual (delección-inserción o disustitución), la alta frecuencia de la mutación, padres no cosanguíneos y familias no relacionadas, nos llevó a estudiar si estábamos en presencia de un hotspot (punto caliente) mutacional o un efecto fundador, hechos no descriptos hasta el momento para el gen de IL-12R $\beta$ 1. Con este fin se estudiaron, por secuenciación directa y RFLP, un total de 19 SNPs (polimorfismos de nucleotido simple) intragénicos (4 intrónicos y 15 exónicos) y el microsateélite D19S1037 localizado a menos de 1cM upstream del gen de IL-12R $\beta$ 1. Todos los pacientes con la mutación 1623-1624 del-ins TT presentaron un mismo haplotipo en la región comprendida por los 19 SNPs y éste no fue encontrado en ninguno de los 100 alelos normales estudiados. Diferencias en D19S1037 entre los pacientes permiten definir el primer límite de este haplotipo heredado en bloque. La definición de los límites es necesaria para luego poder calcular, mediante un modelo matemático, la edad de esta rara mutación. Nuestros resultados sugieren fuertemente que 1623-1624 del-ins TT es una mutación frecuente asociada a un efecto fundador, el primero en ser reportado en los receptores de IL-12.

### 0351. (0804) INMUNOCEFICIENCIAS PRIMARIAS(IDP) DEL COMPLEMENTO. D Comas, R Paz, A Ginaca, L Bezrodnik

*Inmunología. Hospital de Niños R. Gutiérrez. Buenos Aires*

Las deficiencias genéticas del complemento representan el 2-5% de IDP en Argentina. Se manifiestan clínicamente como susceptibilidad a infecciones por gérmenes capsulados; enfermedades autoinmunes, angioedema o asintomáticas. **Objetivo:** Describir las formas de presentación de las IDP del complemento en nuestra población de IDP y sistemática de diagnóstico. **Material y Métodos:** análisis retrospectivo de historias clínicas de 12 pacientes (p), 7 mujeres y 5 varones, con diagnóstico de IDP del complemento entre 1987 y 2007. Cuantificación de C3 y C4 por nefelometría. Funcionalidad de vía clásica (CH50): técnica de Kent y Fife. Funcionalidad de vía alterna (AH50): Turbidimetría. Cuantificación de C1, C2, C5, C6, C7, C8, C9. Factores H, B, I y C1 inhibidor (IDR). Estudio funcional de C1 inhibidor: técnica de activación y cuantificación de C1r (IDR). **Resultados:** 2p Angioedema Hereditario, 3p déficit Factor I, 1p Déficit de C7, 2p deficit de C2 y 4p deficit de C3. Mediana edad 10 años(3-61). Mediana edad inicio síntomas: 6 meses (3-53). Mediana edad 1° consulta en Inmunología: 59 meses (21-696). Mediana edad diagnóstico: 63 meses (26-696). 9p presentaron infecciones bacterianas piógenas (3 neumonías, 5 otitis media recurrentes, 2 sepsis, 2 meningitis) a neumococo o meningococo; 2p enfermedades autoinmunes (uno Enfermedad indiferenciada de tejido conectivo como única manifestación y otro PTI); 2p Angioedema con dolor abdominal recurrente. **Conclusión:** Se observó aparición de síntomas a edad temprana, llegando más tardíamente al diagnóstico. Debe sospecharse IDP del complemento a cualquier edad con manifestaciones de infecciones graves y/o recurrentes por gérmenes capsulados (previo descartar alteración cualicuantitativa de Ac), autoinmunidad no clásica y angioedema recurrente no alérgico. Una adecuada sistemática de estudio del sistema complemento permite definir con certeza cuál es el componente deficitario y definir conductas terapéuticas.

### 0352. (0838) PRIMER REPORTE DE MUTACIÓN EN EL GEN SYNTAXIN 11 (STX11) EN FAMILIA DE ASCENDENCIA SUDAMERICANA Y EUROPEA OCCIDENTAL. N Basile, E Prieto, D Barsotti, M Oleastro, J Braier, M Zelazko, S Danielian

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

**Introducción y Objetivos:** La linfocitosis hemofagocítica (LHH) es un grave desorden inmunológico que representa un desafío diagnóstico y terapéutico. Comprende 2 condiciones clínicamente difíciles de distinguir: formas primarias o familiares (F) —de las que el trasplante de precursores hematopoyéticos es el único tratamiento curativo— y formas secundarias. El aporte de la biología molecular ha resultado fundamental en la caracteriza-

ción de los genes responsables de las LHHF, permitiendo el diagnóstico diferencial certero y brindando las herramientas para un adecuado asesoramiento genético. Mutaciones en el gen STX11 determinan el tipo 4 de las LHHF, reportadas en familias de origen turco. Presentamos una paciente con diagnóstico de LHHF con mutación en este gen. **Métodos y Resultados:** La paciente, con ancestros de origen amerindio y europeo occidental, sin antecedentes familiares –no consanguinidad conocida–, comienza con manifestaciones clínicas a los 20 meses de vida, cumpliendo criterios para diagnóstico de LHH (Sociedad del Histiocito). Inicia tratamiento bajo protocolo HLH-2004, recibiendo la terapia inicial, logrando la remisión. El cuadro clínico recurre luego de un período de 6 meses sin tratamiento y libre de manifestaciones. Se excluyeron mutaciones en el gen perforina por secuenciación directa de ADN genómico, pero se identifica una delección de 4pb -TGCC en la posición 581\_584 en el exón 2- en estado homocigota en STX11. Esta mutación provoca un cambio en el marco de lectura y un codón de terminación prematuro. Ambos padres resultaron heterocigotas para la misma, confirmando el diagnóstico de LHHF tipo 4. **Conclusiones:** Este es el primer caso de LHHF tipo 4 en nuestro país y fuera de la población turca. La mutación hallada no ha sido reportada previamente.

**0353. (0798) CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE (IDCV) BASADA EN LA ALTERACIÓN DE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS LB MEMORIA: IMPORTANCIA DE OBTENER VALORES DE REFERENCIA EN PEDIATRÍA.** L Zanella, S Bertone, M Gallinger, J Rossi, A Bernasconi, S Ronsenzweig, N Basile, M Oleastro, M Zelazko

Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan

La IDCV es un síndrome heterogéneo de etiología casi siempre desconocida, caracterizado por hipogamaglobulinemia, disfunción de anticuerpos e infecciones sinopulmonares recurrentes así como autoinmunidad y linfoproliferación con granulomas. La gran diversidad de las manifestaciones clínicas hacen difícil su caracterización. En adultos con IDCV se propuso una clasificación basada en el % de LB naïve (CD27-), memoria (CD27+) y dentro de éstos, con cambio de isotipo de inmunoglobulinas (CIlg), (CD27+, IgD-) y sin CIlg (CD27+, IgD+) categorizando 3 grupos de pacientes; MB2: con LB memoria tanto con y sin CIlg normales; MB1: LB memoria con CIlg disminuidos pero LB memoria sin CIlg normales; MB0: LB memoria con y sin CIlg disminuidos, siendo el grupo MB0 el de mayores manifestaciones clínicas y el más frecuente en pacientes con IDCV. Dada la menor exposición antigénica en niños y careciendo de datos bibliográficos para subpoblaciones B en este grupo etario, establecimos valores de referencia en niños sanos, para comparar pacientes con IDCV. Se analizó por citometría de flujo el perfil B de 20 controles sanos (11 meses-14 años) y 15 pacientes con diagnóstico de IDCV (7-20 años). En nuestro grupo control se observaron valores de LB memoria significativamente menores respecto a los reportados en la literatura para adultos. De no haber contado con valores de referencia pediátricos el 30% de nuestros pacientes (5 /15) hubieran sido erróneamente clasificados (2/5 como MB1 y en 3/5 como MB0) siendo según nuestros valores ambos MB2, resultando en una mejor correlación clínica. Estos datos muestran que la correcta clasificación de los pacientes con IDCV debe hacerse con valores de referencia de poblaciones de LB memoria acordes a la edad de los pacientes.

Sub-poblaciones B(CD19+)	Adultos (n:20, X±DS)	Pediátricos (n:20, X±DS)	p
CD27+	36±12	25±9	0,002
IgD+CD27+	17±6	11±4	0,002
IgD-CD27+	22±8	14±7	0,0006

**0354. (0408) LA ADMINISTRACIÓN DEL POLISACÁRIDO QUITOSANO PROMUEVE UN INCREMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE IGA EN LA MUCOSA INTESTINAL.** MM Canali<sup>1</sup>, C Porporatto<sup>1</sup>, H Cejas<sup>2</sup>, SG Correa<sup>1</sup>

1 Departamento de Bioquímica Clínica. CIBICI (CONICET) Facultad de Ciencias Químicas- UNC, 2 Patología. Facultad de Ciencias Médicas-UNC

La administración de antígenos proteicos asociados al polisacárido quitosano (Q) por vía oral o nasal potencia la respuesta humoral local y sistémica. Hemos demostrado que una única dosis oral de 1, 3 o 5 mg de Q estimula la producción de factores quimiotácticos por el epitelio, aumenta el número de células dendríticas inmaduras e incrementa las células con fenotipo regulatorio en placas de Peyer (PP) y nódulos mesentéricos (NLM). Para evaluar la influencia del Q en la producción de IgA, ratas Wistar se trataron una vez con 1, 3 o 5 mg de Q por vía oral y 16 horas después se obtuvieron muestras de intestino y tejido linfoide asociado. Secciones del intestino se colorearon (HE) o se trataron con anti-IgA+ (Inmunohistoquímica). Se determinó el número de células IgA+ (CELLISA) y el porcentaje de células CD45RA+ IgA+ (citometría de flujo) en suspensiones de PP y NLM. En el fluido luminal se determinó la concentración de IgA+ (ELISA). Estudios similares se realizaron administrando 1, 3 o 5 mg de Q durante 5 días consecutivos. La ingesta de Q produjo un aumento significativo en el número de células IgA+, aún con una única administración de 1 o 3 mg (p<0,05). El tratamiento prolongado incrementó significativamente el porcentaje de células CD45RA+IgA+ cuando se comparó con controles (p<0,05). El tratamiento no modificó sustancialmente la concentración de IgA+ en el fluido luminal. Las secciones de intestino de los grupos tratados mostraron intensa coloración a nivel del epitelio de las vellosidades. Un hallazgo interesante fue la ligera hipertrofia de las PP en animales tratados una única vez con Q. Nuestros datos sugieren distintas alternativas (i) el reclutamiento selectivo de células IgA+ inducido por Q; (ii) el efecto directo del Q en la diferenciación de células IgA+ o bien (iii) la acción del Q sobre células dendríticas de la mucosa que tienen la habilidad única de inducir el "switch" a IgA en PP y NLM aún en ausencia de linfocitos T.

**0355. (0545) EFECTO DE LA AMINOGUANIDINA EN EL BALANCE TH1/TH2 DE ANIMALES TOLERIZADOS POR VIA ORAL.** LG Franco, CA Feledi, EJ Massouh

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Se buscó determinar si la Aminoguanidina (AG), un inhibidor selectivo de la iNOS (óxido nítrico sintetasa inducible) altera el perfil TH1/TH2 en la respuesta al desafío subcutáneo con el antígeno tolerizante oral OVA a bajas dosis, adyuvado con Freund completo. La tolerancia se indujo en ratas Wistar administrando OVA por vía oral en 5 dosis alternadas. Simultáneamente se las trató con 5 dosis intraperitoneales consecutivas de AG. Siete días a partir de la última dosis oral se desafió subcutáneamente, tomándose muestras de sangre a distintos tiempos (DPI). Para estudiar la relación TH1/TH2 se obtuvieron por ELISA los títulos (como Log10) de ambas subclases de Ig específicas IgG1 (TH2), vs IgG2a (TH1). La diferencia de título entre animales tolerizados y no tolerizados, ( grupos T y C), y la alteración de los mismos en presencia de AG ( grupos TAG y CAG) se evaluó por la prueba t. En los Tolerizados a 47 DPI, sólo la respuesta TH1 (IgG2a) está significativamente inhibida: T= 4.84±0.474 vs C= 5.49±0.530 (p=0.00083). Sin embargo, el título de IgG2a aumenta en los tolerizados tratados con AG: T= 4.84±0.474 vs TAG= 5.21±0.452 (p=0.041). En los Controles C (no tolerizados ni tratados con AG), no varió significativamente el título de IgG1 a 20, 30 y 47 DPI: (4.76±0.15 en promedio), pero sí hubo incremento sostenido de IgG2a: (4.38±0.62; 4.87±0.61; 5.77±0.44). Por lo tanto, la relación TH1/TH2 aumentó significativamente de 0.94±0.056 a 1.17±0.083 entre 20 y 47 DPI (p=0.00097). Este mismo perfil se observó usando como adyuvante Hidróxido de Aluminio. En cambio, el tratamiento de C con AG eleva los títulos de IgG1 de 4.38±0.34 a 5.28±0.26 entre 20 y 47 DPI ( p= 0.0016). Concluimos que el Oxido Nítrico colaboraría en la tolerización de tipo TH1 inducida por bajas dosis de antígeno oral, pero en los no tolerizados sería el responsable de la polarización de la respuesta sistémica hacia TH1, debido a que IgG1 no aumenta.

**0356. (0732) TOLERANCIA CRUZADA CONTRA LA PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA INDUCIDA POR UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN ENTRE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA LÁBIL AL CALOR DE E. COLI Y EL DOMINIO C DE SINAPSINA.**  
MJ Scerbo, MJ Bibolini, GA Roth, CG Monferran

*Depto. de Química Biológica - CIQUIBIC (UNC-CONICET).  
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. X5000HUA Córdoba*

La toxina lábil al calor de *E. coli* es una enterotoxina formada por una subunidad A responsable de su actividad tóxica y por una subunidad B atóxica formada por 5 péptidos idénticos. La subunidad B (LTB) ha sido empleada para vehicular antígenos peptídicos acoplados a la misma con el propósito de modular la respuesta contra antígenos infecciosos o autoantígenos. En este trabajo LTB se acopló genéticamente al dominio C de sinapsina y esta proteína recombinante (LTBSC) fue administrada oralmente a ratas a fin de analizar la respuesta inmune contra sí misma y contra la proteína básica de mielina (PBM) encefalitogénica. Ratas Wistar fueron alimentadas con 10 o 100 µg de LTBSC, LTB o solo con vehículo (PBS, grupo control) a los 10, 8, 6 y 4 días previos al desafío con antígeno. Los animales tratados fueron separados en dos grupos y desafiados con 50 µg del mismo antígeno o de PBM en AFC en la pata izquierda y con PBS en AFC en la pata derecha. Los animales controles recibieron emulsiones conteniendo LTB, LTBSC, PBM o PBS. Luego de 6 días se realizó la reacción de DTH en las orejas y se midió el espesor a las 24 h. Los grupos de animales tratados con LTBSC mostraron menor reacción de DTH contra sí misma y contra PBM que el correspondiente grupo control ( $p < 0,05$ ). Un efecto similar fue observado con LTB pero solamente con la mayor dosis ensayada. A los 7 días se extrajeron los ganglios inguinales de ambos lados y se separaron las células mononucleares. La celularidad y la proliferación de las células provenientes de los ganglios correspondientes a la pata inyectada con antígeno disminuyó en los animales que recibieron el tratamiento oral con ambas dosis de LTBSC y solo con 100 µg de LTB ( $p < 0,05$ ). Los resultados sugieren que LTBSC y en menor grado LTB son capaces de inducir tolerancia oral contra la PBM, apoyando su empleo en esquemas de tolerancia para la prevención de enfermedades experimentales como la encefalomielitis autoinmune experimental.

**0357. (0444) EFECTO PREBIOTICO DE YACÓN (SMALLANTHUS SONCHIFOLIUS) SOBRE INMUNIDAD DE MUCOSA INTESTINAL.** O Mesón<sup>1</sup>, M Bibas Bonet<sup>1</sup>, S Chaves<sup>1,2</sup>, A Grau<sup>3</sup>, G Perdígón<sup>1,2</sup>

*1 Cátedra de Inmunología; Fac. Bioqca, Qca y Fcia. UNT, Tucumán., 2 CERELA, Tucumán, 3 Fac. Cs. Naturales, UNT*

Las raíces del arbusto Yacón almacena fructoligosacáridos lo que permite explicar el efecto prebiótico. En trabajos previos demostramos que la administración oral de Yacón no indujo efectos adversos en ratones y estimuló el desarrollo de lactobacilos y bifidobacterias. **Objetivo:** Estudiar el efecto de la administración prolongada de yacón sobre inmunidad de mucosa intestinal. Se analizó el N° de cél. Ig A+ y cél. citoquina+ (IL12, IL10, IL4, IFN $\alpha$ ) en Intestino delgado (ID) y grueso (IG) y los niveles de Ig A secretoria total en fluido intestinal de ratones BALB/c que recibieron harina de raíces de Yacón, como suplemento de la dieta standard, durante 75 días en dosis de 340 mg/kg/día. Las determinaciones fueron cada 15 días y metodología empleada: inmunofluorescencia directa e indirecta. El N° de cél. IgA+ de ID fueron significativos respecto al control a partir de los 45 días (C:80 $\pm$ 5; 45d:160 $\pm$ 5; 60d:146 $\pm$ 3; 60d:138 $\pm$ 6). En IG estuvo incrementado durante todo el ensayo. (C:50 $\pm$ 2; 15d:100 $\pm$ 2; 30d:130 $\pm$ 1; 45d:165 $\pm$ 2; 60d:187 $\pm$ 3; 75d:164 $\pm$ 1). Ig A secretoria total incrementó a los días 15, 30 y 45 (C:81 $\pm$ 1; 15d:176 $\pm$ 8; 30d:117 $\pm$ 7; 45d:106 $\pm$ 8 ug/ml). IL12 e IL10 en ID aumentaron hasta 45 días (IL12: C:20 $\pm$ 2; 15d:30 $\pm$ 2; 30d:37 $\pm$ 2; 45d:55 $\pm$ 3. IL10: C:18 $\pm$ 5; 15d:24 $\pm$ 2; 30d:57 $\pm$ 2; 45d:39 $\pm$ 3) manteniéndose la relación IL12/IL10. En IG observamos diferencias con el control para IL10 en

días 15 y 30 (C:29 $\pm$ 2; 15d:43 $\pm$ 2; 30d:40 $\pm$ 39). IL4 solo incrementó en ID el día 30 (50 $\pm$ 4; C:35 $\pm$ 2). IFN $\gamma$  incrementó el día 45 en ID (38 $\pm$ 8; C:28 $\pm$ 3). IG sólo incrementó el día 15 (31 $\pm$ 4; C: 18 $\pm$ 6). El prebiótico indujo un aumento de la respuesta inmune de mucosa. Los parámetros estudiados aumentaron hasta día 45 en ID, mientras que en IG el N° de cél. IgA+ aumentó durante todo el ensayo. Las citoquinas disminuyeron desde el día 30 con valores similares al control. El consumo continuo de Yacón mejoraría la defensa inmunológica intestinal posibilitando su uso como componente de la dieta.

**0358. (0530). LECHE FERMENTADA PROBIÓTICA. MECANISMO DE ACCIÓN SOBRE EL SISTEMA INMUNE MUCOSO.** C Maldonado Galdeano<sup>1,2</sup>, A de Moreno de LeBlanc<sup>1</sup>, C Dogi<sup>1</sup>, S Chaves<sup>1</sup>, G Perdígón<sup>1,2</sup>

*1 CERELA, Tucumán. Arg, 2 Cát. Inmunol. Fac. Bqca, Qca, y Fcia, UNT.*

Previamente demostramos en ratón que la bacteria probiótica *L. casei* DN114001 interacciona con las células epiteliales intestinales induciendo liberación de IL-6 y activa a las células de la respuesta inmune innata asociadas a intestino. Se determinó que una leche fermentada conteniendo dicha bacteria probiótica (LFP) incrementa el n° de células IgA+ en intestino, mamas y bronquios y que su consumo prolongado indujo inmunomodulación a nivel intestinal. **Objetivo:** determinar el efecto del consumo de la LFP sobre la respuesta inmune no específica e innata intestinal. Ratones BALB/c recibieron la LFP 5 días consecutivos y el grupo control leche al 10% como suplemento de la dieta convencional. Al final del periodo de administración, se extrajo intestino delgado para determinación de: células positivas para receptores (CD-206 y TLR4) y antígenos (F4/80 y 33D1) presentes en macrófagos y células dendríticas, mediante inmunofluorescencia. Se estudió el efecto de esta LFP sobre las células calcificiformes productoras de mucus y en la expresión de calcineurina, un activador de NFAT. Se observó que no hubo aumentos en el número de células CD-206+ (42 $\pm$ 12) y de células TLR4+ (80 $\pm$ 16) con respecto a los controles (39 $\pm$ 11 y 70 $\pm$ 22) respectivamente. Hubo aumentos significativos para F4/80 (82 $\pm$ 18) control (48 $\pm$ 13). El antígeno 33D1 no mostró variación con el control (25 $\pm$ 7 y 26 $\pm$ 7). Observamos un aumento de células calcificiformes (95 $\pm$ 15) control (65 $\pm$ 12). Las células calcineurina+ estuvieron ligeramente aumentadas (15 $\pm$ 3 control de 10 $\pm$ 2). Conclusiones: la LFP actúa reforzando la barrera mucosa inespecífica y la respuesta inmune innata, manteniendo la homeostasis, con incremento de células F4/80 importante para la respuesta T supresora, sin aumento de células dendríticas 33D1+ y no favoreció la expresión de TLR4 y CD206 para la señalización e internalización de Ags.

**0359. (0622) LA ADMINISTRACION DE YOGUR REGULA LA RESPUESTA INFLAMATORIA INTESTINAL EN UN MODELO DE RATÓN.** S Chaves<sup>1,2</sup>, G Perdígón<sup>1,2</sup>, A de Moreno de LeBlanc<sup>1</sup>

*1 CERELA-CONICET. Chacabuco 145. 4000-Tucumán, 2 Facultad de Bioqca, Qca y Fcia- UNT.*

La inflamación intestinal (II), es considerada una enfermedad de etiología múltiple entre las cuales, el factor inmune es uno de los más estudiados. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron que la administración de yogur en un modelo murino de II podrían contribuir a la prevención y/o recuperación de la inflamación inducida con ácido 2,4,6 trinitrobenzoico (TNBS). **Objetivo:** Estudiar los posibles mecanismos inmunes por los cuales yogur podría modular la respuesta inflamatoria inducida con TNBS. Ratones BALB/c fueron alimentados con yogur 10 días previos a la inducción de II, al final de este periodo fueron divididos en 3 grupos: yogur-TNBS-yogur (YTY), yogur (Y), yogur-TNBS (YT); el resto de los animales fueron control de inflamación (TNBS) y Control (C). Se evaluó en intestino grueso por inmunofluorescencia (IF) directa el N° de cel IgA+ y por IF indirecta células positivas para citoquinas pro- y anti-inflamatorias (IL12, IFN $\alpha$ , IL-17, IL-10) en el día previo a la inducción y a los 3, 7 y 14 días (d)

post TNBS. Y y YT incrementó significativamente el N° de cel IgA+ en todos los periodos ensayados, los valores oscilaron entre 87±9 y 109±3 comparados con el grupo C (66±12 y 88±6) y el grupo TNBS (57±6 y 66±13). En el grupo YT IL-17 disminuyó para 7 y 14 d (15±7 y 13±9) y para YTY (19±5 y 21±6) post TNBS con respecto a TNBS (31±10 y 31±6). Una disminución similar fue observada para IL-12 en ambos grupos a los 3 y 7 d YT (11±3 y 16±5) y YTY (13±5 y 17±2), TNBS (22±3 y 25±3) mientras que IFN $\alpha$  no mostró diferencias para los distintos grupos. IL-10 estuvo incrementada para YT y YTY y los valores oscilaron entre 20±4 y 24±3; TNBS 15±4 y 19±5. Los resultados obtenidos demuestran que la administración con yogur regularía la respuesta inflamatoria provocada por TNBS en el intestino, observado por la disminución de citoquinas inflamatorias (IL12, IL17, IFN $\alpha$ ) y por incremento de IL-10.

**0360. (0541). RESPUESTA INMUNE DE BACTERIAS NO PATÓGENAS GRAM(+) Y GRAM(-) EN SITIO INDUCTOR Y EFECTOR DE LA MUCOSA INTESTINAL EN CONDICIÓN FISIOLÓGICA Y FRENTE A ESTÍMULO INFLAMATORIO.** C Dogi<sup>1</sup>, F Weill<sup>2</sup>, J Leoni<sup>2</sup>, G Perdígón<sup>1, 3</sup>

1 CERELA, Tucumán, 2 Fac Fcia y Bioqca, UBA Bs As, 3 Fac Bioqca, Qca y Fcia- UNT Tucumán.

El tejido linfóide asociado a intestino comprende el sitio inductor (Placa de Peyer (PP), nódulos linfoides) y sitio efector de la respuesta inmune (lámina propia (LP)). Estudiamos el efecto de bacterias no patógenas en ambos sitios de la respuesta inmune en situación fisiológica y frente a estímulo inflamatorio. Ratonés BALB/c recibieron oralmente por 7 días: *Lactobacillus casei* (Lc) CRL 431; *Lactobacillus acidophilus* (La) CRL 1462; *Lactobacillus acidophilus* (La) A9; *Escherichia coli* (Ec) 13-7 y *Escherichia coli* (Ec) 129. Se determinó células+ para IL-10, IFN $\beta$  y TNF $\alpha$  en LP y en población total de PP y por ELISA en población adherente y no adherente de PP. Se estimuló con LPS las poblaciones celulares de PP. Se estudió la estimulación de una línea de macrófagos con LTA de las bacterias Gram+. En LP todas las cepas aumentaron las citoquinas con respecto al control ( $p > 0.05$ ). En población total de PP no se incrementó IL-10 pero sí IFN $\beta$  y TNF $\alpha$  ( $p > 0.05$ ). Los datos de población adherente y no adherente se muestran en tabla. La estimulación con LPS fue: IFN Ad C 202±10 Lc 257±18\* LaA9 289±17\* LaCRL 259±17\* Ec13-7 176±20 Ec129 198±11 IFN noAd C107±15 Lc 180±10\* LaA9 156±20\* LaCRL 151±25\* Ec13-7 193±53\* Ec 352±47\* TNF Ad C50±6 Lc187±12\* LaA9 111±25\* LaCRL 133±5\* Ec13-7 517±7\* Ec129 264±4\* TNF noAd C- Lc- LaA9 22±2 LaCRL 19±4 Ec13-7 - Ec129- IL10 Ad C- Lc 23±7 LaA9 94±5 LaCRL- Ec13-7 167±23 Ec129 25±9 NoAd C43±10 Lc46±18 LaA9 39±9 LaCRL 58±10 Ec13-7 49±15 Ec129 35±8 (= < 15.6). La estimulación de macrófagos con LTA fue cepa dependiente para TNF $\alpha$  e IL-10. La respuesta a IL-10 para Gram+ y Gram- fue distinta en sitio efector pero no en inductor. IFN $\gamma$  fue producido por LT, y por macrófagos en respuesta al LPS al igual que IL-10. El LTA está relacionado con la producción de TNF $\alpha$  e IL-10 pero no sería el único epítipo implicado.

	IFN Ad	IFN No Ad	TNF Ad	TNF No Ad	IL10 Ad	IL10 No Ad
Control	110±21	60±11	10±4	-	-	-
Lc	94±6	148±19*	69±3*	-	-	-
LaA9	194±37	143±23*	110±6*	-	70±11	-
LaCRL1462	177±51	191±17*	36±16*	-	-	-
Ec13-7	143±32	104±22*	54±6*	-	-	-
Ec129	86±14	89±9*	123±11*	-	-	-

**0361. (0773) ESTUDIO DE POSIBLES MECANISMOS INMUNES INVOLUCRADOS EN LA PROTECCIÓN FRENTE A UNA INFECCIÓN CON *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM EN RATONES ALIMENTADOS CON *LACTOBACILLUS CASEI* CRL 431.** NA Castillo<sup>1</sup>, A de Moreno de LeBlanc<sup>1</sup>, G Perdígón<sup>1, 2</sup>

1 CERELA-CONICET, 2 Cát. Inmunol. Fac. Bqca, Qca. Y Fcia, UNT

Previamente demostramos que la administración de *Lactobacillus casei* CRL 431 (Lc) a ratones BALB/c tuvo efecto protector frente a una infección con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ST) en animales que continuaron o no recibiendo Lc 7 y 10 días post desafío (dPD), comparado a controles (C) desafiados con el patógeno y no alimentados con Lc. **Objetivo:** determinar los mecanismos inmunes responsables de tales efectos: actividad microbicida y fagocítica e IgA-S Total (IgA-St) y específica (IgA-Se). Ratonés fueron alimentados 2, 5 y 7d con Lc, se les extrajo macrófagos (Mo) peritoneales (P) y de placas de Peyer (PP) para actividad microbicida para ST y fagocítica comparando con Controles sin Lc (ensayo ex vivo). Otros grupos (test y control) fueron desafiados con ST y los tratados se dividieron en 2 subgrupos: uno continuó recibiendo Lc (Lc-ST-Lc) y el otro no (Lc-ST). A los 7 y 10dPD se les dosó en fluido intestinal IgA-St e IgA-Se y en suero IgG específica por ELISA comparando con el grupo C. Se obtuvo:

	Act. Microb. Mo P	Act. Microb. Mo PP	Act. Fag. Mo P	Act. Fag. Mo PP
Grupo	Media log UFC/ml	Media log UFC/ml	Media %fag.	Media %fag.
Control	5,20±0,05	4,18±0,04	19±4,16	14±2,00
2d	5,11±0,06	4,00±0,06	15±2,12	28±2,83
5d	5,00±0,00	4,59±0,33	26±4,00	23±2,00
7d	5,15±0,08	4,13±0,07	33*±1,41	28,5*±4,36

La IgA-St sólo incrementó significativamente para 7d de alimentación previa, a los 10dPD (55,90±5,48µg/ml) con respecto al C (41,75±4,86µg/ml). Mientras que la IgA-Se aumentó para 7d de tratamiento significativamente en ambos subgrupos (Lc-ST y Lc-ST-Lc) a los 7dPD (Lc-ST 0,23±0,10; Lc-ST-Lc 0,22±0,11) y 10dPD (Lc-ST 0,54±0,12; Lc-ST-Lc 0,68±0,11) con respecto al control (7dPD 0,06±0,05; 10dPD 0,17±0,10). No se observó aumento significativo de IgG específica en ningún subgrupo. Los resultados obtenidos sugieren al menos 2 mecanismos, uno mediado por la Respuesta Inmune Innata (aumento de fagocitosis en P y PP) y otro específico (aumento IgA-Se) involucrados en la protección frente a la infección con ST.

**0362. (0495) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA QUEMOQUINA CCL25 Y DE LA INFLUENCIA DE IL-7 SOBRE LA MUERTE CELULAR DE LA VELLOSIDAD INTESTINAL EN UN MODELO DE MALNUTRICIÓN PROTEICA SEVERA.** GC Calabrese<sup>1</sup>, EN Luczak<sup>2</sup>, ME Roux<sup>2</sup>

1 Cátedra de Biología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Laboratorio de Inmunología de Mucosas, Cátedra de Fisiopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

La quemoquina CCL25 (TECK) y su receptor CCR9 tienen un rol significativo en el reclutamiento de linfocitos B y T en la vellosoidad intestinal. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado en el modelo experimental de inmunodeficiencia secundaria por malnutrición proteica severa en ratas Wistar (R21) que las poblaciones CD8 $\alpha$ /alpha+ y T gamma/delta+ están incrementadas tanto en lámina propia como en el intraepitelio intestinal comparadas con animales controles (C60), sin embargo sólo un 45% de la subpoblación T gamma/delta intraepitelial es TECK+. El objetivo del presente trabajo es estudiar en el epitelio intestinal: (1) la expresión de TECK e IL-7 y (2) la muerte celular programada. La expresión de TECK e IL-7 fue estudiada por Western Blot (WB) sobre las fracciones subcelulares (microsomas y citosol) obtenidas por centrifugación diferencial a partir de células epiteliales intestinales aisladas. La detección se realizó con el empleo de los anticuerpo IgG rabbit anti mL-7 recombinante (Peprotech.) e IgG goat anti un péptido cerca del amino terminal de TECK humano (Santa Cruz Biotechnology) y revelados con el sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa y su sustrato DAB. La apoptosis de las células epiteliales intestinales fue analizada (sobre 106 cel/ml) por Citometría de Flujo utilizando el kit de detección de apoptosis

Annexin V (Santa Druz Biotechnology). El análisis por WB reveló un aumento en la expresión de TECK (DO 93.86 vs 81.37, R21 vs C60) e IL-7 ( DO 127 vs 87, R21 vs C60) en la fracción microsomal. La citometría de flujo mostró una disminución del porcentaje de apoptosis (15% vs 29%, R21 vs C60). Estos resultados sugieren que: (1) la expresión de TECK se correlaciona con el aumento descrito en la población T gamma/delta de la vellosidad intestinal, y (2) el incremento de IL-7 se asocia a la disminución de la muerte celular observada en el epitelio, por lo que ejercería un rol de protección en el foco inflamatorio.

**0363. (0320) CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL POLISACÁRIDO QUITOSANO EN LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE LA MUCOSA. C**  
Porporatto<sup>1</sup>, MM Canali<sup>1</sup>, ID Bianco<sup>2</sup>, SG Correa<sup>1</sup>

*1 Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI (CONICET). Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 2 Centro de Excelencia en Productos y Procesos de la Provincia de Córdoba (CEPROCOR), Agencia Córdoba Ciencia S.E. y CONICET, Córdoba*

El polisacárido quitosano (Q) posee múltiples efectos a nivel del tracto gastrointestinal protegiendo la mucosa gástrica, aumentando la captación de antígenos, potenciando la respuesta humoral y reduciendo lesiones precancerosas en el colon. Hemos caracterizado la actividad tolerogénica y anti-inflamatoria del Q en la mucosa y hemos observado que, temprano luego de la ingesta de Q, linfocitos de nódulos mesentéricos (NLM) tienen menor respuesta proliferativa a mitógenos. En concordancia, se ha demostrado que Q induce la activación de esplenocitos aumentando el marcador CD69 sin que ello resulte en proliferación. Para caracterizar estos efectos estudiamos por citometría de flujo el ciclo celular (ioduro de propidio) y la respuesta proliferativa estimulada con ConA, Q y ConA+Q (CFSE) en células de NLM de ratas normales o tratadas por vía oral con 1, 3 o 5 mg de Q administrado 1X (agudo) o 5X (crónico). Luego de la administración aguda y crónica se observó la disminución dependiente del porcentaje de células en proliferación ( $p < 0,05$ ) aunque con mayor reducción luego de la administración única ( $p < 0,05$ ). En el análisis del ciclo celular, comparando con el grupo control (0,84%), distintas dosis de Q 1X aumentaron el porcentaje de células en G2 ex vivo (1,67%) o después de 5 días en cultivo (2,2%) y disminuyeron la proporción de células en G1. En células de NLM normales estimuladas con ConA+Q se reprodujo el efecto in vivo. El tratamiento previo con Q redujo significativamente la proliferación con disminución en el porcentaje de células en fases S y G2. Estos resultados sugieren que la modificación de la respuesta proliferativa de linfocitos por Q se asocia con cambios en la proporción de células en las fases del ciclo celular. Esta actividad alteraría la progresión en el ciclo luego del estímulo con mitógenos. Este efecto observado luego de la administración oral del Q podría tener relevancia en su actividad tolerogénica en el microambiente de la mucosa.

**0364. (0478) EXPRESIÓN DE TNF-ALPHA, INF-GAMMA, TGF-BETA E IL-7 EN CÉLULAS DE ASPIRADOS BRONQUEO ALVEOLARES OBTENIDAS A PARTIR DE UN MODELO DE INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA POR MALNUTRICIÓN PROTEICA SEVERA. EN** Luczak<sup>1</sup>, GC Calabrese<sup>2</sup>, ME Roux<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Inmunología de Mucosas, Cátedra de Fisiopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Cátedra de Biología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Nuestro grupo de trabajo ha descrito la aparición temprana (4 días post parto) de células T gamma/delta y de células TNF-alpha+, que colocalizaban, en tejidos linfoides asociados a bronquios (BALT) en ratas Wistar. Además, en el modelo experimental de inmunodeficiencia secundaria por desnutrición proteica se-

vera al destete (pérdida hasta el 25% del peso inicial) y posterior renutrición con caseína al 20% durante 21 días en ratas Wistar (R21), se observó un aumento significativo sólo de la subpoblación T gamma/delta, tanto en lámina propia como en el intraepitelio de los bronquios de los animales R21 con respecto a los controles de igual edad (C60). El objetivo del presente trabajo es comparar la expresión de TNF-alpha e INF-gamma como indicadores de procesos inflamatorios y de TGF-beta e IL-7 como reguladores de estos procesos en aspirados bronqueo alveolares (BAL) obtenidos a partir de animales R21 y C60. La expresión de las citoquinas en las células de los BAL, fue estudiada por Western Blot (WB) con empleo de los anticuerpos: IgG goat anti rat-INF-gamma (Peprotech), IgG goat anti rat-TGF-beta1 (Santa Cruz), IgG rabbit anti-mIL-7 recombinante (Peprotech) e IgG rabbit anti rat-TNF-alpha (Peprotech), y revelados con el sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa y su sustrato DAB. Este análisis reveló un aumento de las bandas de expresión de TNF-alpha (DO 80 vs 91, C60 vs R21), INF-gamma (DO 10 vs 71, C60 vs R21), TGF-beta (DO 14 vs 84, C60 vs R21) e IL-7 (DO 93 vs 156, C60 vs R21). Estos resultados sugieren que: 1) el aumento en expresión de las citoquinas TNF-alpha e INF-gamma en los animales R21, indican la presencia de un proceso inflamatorio modulado por el incremento de TGF-beta, y 2) el aumento en la expresión de IL-7, se correlaciona con la proliferación y diferenciación del fenotipo celular T gamma/delta, no descartando una posible generación "in situ" de esta subpoblación.

**0365. (0179) EFECTOS ANTIINFLAMATORIOS IN VITRO DE ENTEROCOCCUS FAECALIS CECT7121 COMPARADOS CON DECOCCIÓN DE FLORES DE ACHYROCLINE SATUREIOIDES Y BROMURO DE IPRATROPIOSALBUTAMOL, SOBRE BASOFILOS DE PACIENTES ALERGICOS. FS** Alaniz<sup>1</sup>, MA Mangui<sup>2</sup>, MS Castro<sup>2</sup>, LN Cariddi<sup>1</sup>, AM Maldonado<sup>1</sup>

*1 Universidad Nacional de Río Cuarto, 2 IDEHU, CONICET, UBA*

En estudios previos se comprobó que *Enterococcus faecalis* CECT7121 (Ef) tenía efectos de adyuvante e inmunomodulador pro-Th1. Los animales tratados con Ef mostraron mayor proliferación (por incorporación de <sup>3</sup>H-timidina) de células de bazo y síntesis de INF- $\gamma$  e IL-6. Se comprobó también que decocción de flores (DF) de *Achyrocline satureioides* (As) presentaba in vitro propiedades antialérgicas y linfoproliferativas. Los objetivos de este trabajo fueron demostrar los efectos inhibitorios de la desgranulación de basófilos inducida por el alérgeno específico, por Ef o DF y compararlos con Bromuro de Ipratropio-Salbutamol. Ef, DF y la droga comercial se probaron en distintas concentraciones. La obtención de DF se realizó según la técnica de Mongelli E et al 1995. Los basófilos de cada paciente fueron separados con Dextrán 70 al 6% y CINA al 0,9% y enfrentados: a) al alérgeno sólo (100 PNU/ml), b) al alérgeno adicionado de Ef ( $1.39 \times 10^8$ ), c) al alérgeno adicionado de DF (75  $\mu$ /ml) y d) al alérgeno adicionado de Bromuro de Ipratropio-Salbutamol (0,05 + 0,3 mg/ml). El dosaje de la enzima  $\beta$ -hexosaminidasa (B-H) liberada se realizó según la técnica de Shibata H et al 1996. Se adicionó el sustrato cromogénico para la enzima y se realizó la lectura en espectrofotómetro a 405 nm. Se aplicaron las fórmulas de Na HJ et al 2002: % de liberación de B-H= (DO de B-H y Alérgeno-DO de B-H sin Alérgeno).100/DO de B-H y Alérgeno % de inhibición de liberación de B-H= (DO de B-H y Alérgeno-DO de B-H+ Alérgeno+ Ef o DF o Ipratropio-Salbutamol).100/DO de B-H y Alérgeno. Los basófilos con alérgeno específico liberaron altos índices de B-H respecto a las células sin alérgeno específico  $p < 0.0001$ . La liberación de B-H fue inhibida por Ef:  $p < 0.05$ , DF:  $p < 0.02$  y Bromuro de Ipratropio-Salbutamol:  $p < 0.01$ . Ef demostró in vitro propiedades antialérgicas significativas, pero menores que DF o Ipratropio-Salbutamol.

**0366. (0098) EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA INMUNIDAD PROTECTIVA INDUCIDA POR LACTOCOCCUS LACTIS PPPA ADMINISTRADO A RATONES INFANTES POR VÍA**

**NASAL U ORAL.** J Villena, M Medina, S Racedo, E Vintiñi, S Alvarez

*Centro de Referencia para Lactobacilos CONICET*

Se realizó un estudio comparativo, en ratones infantiles, de la inmunogenicidad y la capacidad protectora de la administración nasal u oral de *Lactococcus lactis* PppA (bacteria recombinante que expresa la proteína PppA de neumococos en su superficie). Ratones albino-Suizos (3 semanas) fueron inmunizados con *L. lactis* PppA (10E8 cél./ratón) durante 5d consecutivos por vía nasal (LN) u oral (LO) y recibieron un refuerzo igual luego de dos semanas. Se determinó: a) producción de anticuerpos específicos (IgA, IgG, IgG1 e IgG2a) en suero y lavado broncoalveolar (BAL), b) n° de cél. IgA+ en pulmón y c) resistencia al desafío intranasal con diferentes serotipos de neumococos (3, 6B, 14 y 23F) (10E6 cél./ratón) mediante cultivos de pulmón (Cp) y hemocultivos. Ambas inmunizaciones indujeron producción de anticuerpos anti-PppA en BAL y suero, sin embargo el grupo LN presentó valores significativamente mayores ( $p < 0,01$ ) (IgA BAL LN=9,3±0,4 (mg/mL), LO=7,3±0,7; IgG suero LN=31,4±0,5, LO=2,7±0,3). El n° de células IgA+ en pulmón incrementó significativamente ( $p < 0,05$ ) en los animales que recibieron LN y LO con respecto al grupo control (C), pero en el grupo LN los valores fueron mayores ( $p < 0,05$ ) que en LO (IgA+ LN=37,3±2,2 (cél/10 campos), LO=29,4±2,1, C=10,5±1,5). Los grupos LN y LO presentaron recuentos de bacterias en sangre y pulmón significativamente menores a los C, aunque el efecto protector fue significativamente mayor en LN comparado con LO, ya que LN logró eliminar completamente de sangre y pulmón a los serotipos 6B, 14 y 23F (Cp(6B): C=7,7±0,2 (log UFC/g pulmón), LN=negativo, LO=3,3±0,2; Cp(3): C=8,5±0,1, LN=3,1±0,3, LO=4,3±0,3). Los resultados muestran que tanto la inmunización nasal como la oral de ratones infantiles con *L. lactis* PppA son eficaces para inducir inmunidad protectora contra la infección respiratoria por diferentes serotipos de *Streptococcus pneumoniae*. La inmunidad protectora inducida por la inmunización nasal fue superior a la lograda por la vía oral.

**0367. (0167) YOGUR: EFECTO SOBRE LA INFLAMACIÓN Y LA HEMOSTASIA EN UN MODELO DE INJURIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL.** C1 Haro, H1 Zelaya, S1 Lazarte, G Agüero

*1-Instituto de Bioquímica Aplicada-Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-UNT. Balcarce 747-CP4000. e-mail: gaguero@fbqf.unt.edu.ar*

Es conocido que inflamación y apoptosis son componentes patogénicos de una injuria hepática aguda (IHA), y que yogur posee conocida actividad inmunomoduladora. El objetivo fue evaluar, en un modelo experimental, si la administración oral de yogur ejerce efecto protector sobre una IHA. Ratones BALB/c adultos recibieron una inyección intraperitoneal de 20 mg de D-Galactosamina (DG), droga hepatotóxica. Diferentes grupos fueron alimentados con yogur de vaca (Yv) o cabra (Yc) durante 2 o 7 días previos a la inyección. Ratones controles se inocularon con SF. Las muestras se obtuvieron 12 horas post-DG. Se determinó: 1) recuento total y diferencial de leucocitos (GB) de sangre periférica (SP) 2)mieloperoxidasa (MPO) en polimorfo nucleares (PMNN) de SP por el método de Washburn 3) infiltrados neutrófilos en cortes histológicos de hígado coloreados con Hematoxilina-eosina 4) glucógeno hepático en cortes histológicos, mediante la reacción de PAS 5)Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado (APTT), % de Actividad Protrombínica (TP) y Concentración de fibrinógeno (F), usando técnicas convencionales 6) Apoptosis hepática mediante citometría de flujo. **Resultados:** La DG indujo disminución significativa de GB (CN=5,9±0,6; DG=3,8±0,7 G/L) y PMNN (CN=1,1±0,3; DG=0,6±0,1 G/L); aumento de MPO(CN=151,5±44; DG=287,5±56);disminución del glucógeno y presencia de infiltrados en hígado; alteración del APTT, TP y F; y aumento del N° de células muertas y apoptóticas. La suplementación 2dYc normalizó los GB (2dYcDG=5,3±0,9) y el APTT (CN=23,6±1,1; DG= 28,8±1,9; 2dYcDG=26,7±1,2 seg). Los grupos alimentados 7d mostraron normalización de GB, dis-

minución de la MPO (7dYcDG=169,5±3,5; 7dYvDG=134,5±19,2) e infiltrados, normalización del glucógeno hepático, disminución del N° de células muertas e incremento del TP (CN=98,5±1,5; DG=39±7; 7dYcDG=53±3,8; 7dYvDG=45±4). La mejoría observada estaría relacionada con el efecto inmunomodulador, dosis dependiente, ejercido por el yogur.

**0368. (0602) LACTOBACILLUS CASEI COMO SUPLEMENTO EN DIETAS DE RENUTRICIÓN FAVORECE LA RECUPERACIÓN DE LOS PROGENITORES DE LINFOCITOS B. S** Salva<sup>1</sup>, MC Merino<sup>2</sup>, G Agüero<sup>3</sup>, A Gruppi<sup>2</sup>, S Alvarez<sup>1,3</sup>

*1 Centro de Referencia para Lactobacilos - CONICET, 2 Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Nacional de Córdoba, 3 Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-Universidad Nacional de Tucumán*

Debido a que una dieta de renutrición suplementada con *Lactobacillus casei* acelera la recuperación de la respuesta inmune de ratones desnutridos frente a una infección neumocócica analizamos el efecto de la misma sobre las poblaciones celulares de médula ósea (MO) involucradas en defensa. Para ello ratones desnutridos por déficit proteico fueron renutridos 7 y 14d con dieta balanceada (DB), o suplementada con *L. casei* CRL1505 (Lc) solo y en un alimento fermentado (LF). Se usaron ratones desnutridos y normales (bien nutridos) como controles. Las poblaciones celulares de MO se evaluaron por citometría de flujo analizando la expresión de: B220, HSA, IgM e IgD para la población linfocito B; CD3 y CD4 para T y Gr-1 y Mac-1 para la población mieloides. Observamos que la desnutrición produjo disminución de linfocitos (Li) en MO (FSC vs SSC) y la renutrición con Lc o LF aceleró su recuperación. La desnutrición incrementó el porcentaje de LiB maduros (HSA<sup>low</sup>B220<sup>+</sup> y HSA<sup>low</sup>IgD<sup>+</sup>) y disminuyó el porcentaje de las células en estadios inmaduros (HSA<sup>high</sup>IgM<sup>+</sup>). Los tratamientos con Lc y LF mantuvieron elevado ( $p < 0,05$ ) el número de células HSA<sup>low</sup>B220<sup>+</sup> hasta los 7d de renutrición, y se normalizaron en los ratones que recibieron solamente DB. Todas las dietas de renutrición normalizaron el número de células HSA<sup>high</sup>IgM<sup>+</sup>. Si bien la desnutrición no indujo cambios en la población B220<sup>high</sup>IgM<sup>+</sup>, la renutrición con cualquiera de las dietas aumentó dichas células a los 14d. Por otra parte los LiT CD3+CD4<sup>+</sup> aumentaron con la desnutrición ( $p < 0,05$ ) y todas las dietas normalizaron su porcentaje. La desnutrición indujo también un aumento de células Gr-1+Mac-1+ ( $p < 0,05$ ) que se normalizó a los 7d con Lc o con LF y a los 14d con DB. Podemos concluir que la suplementación de una dieta de renutrición con Lc o con LF conduce a la recuperación de los valores normales de las células de MO.

**0369. (0345) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE DOMINIOS CONSERVADOS DE MUC1 Y MUC5AC EN TEJIDOS EPITELIALES DE MAMÍFEROS.** E Lacunza<sup>1</sup>, J Bara<sup>2</sup>, A Segal-Eiras<sup>1</sup>, MV Croce<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Calle 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina, 2 U-673 INSERM, CNRS, 184, rue du Fbg Saint Antoine, 75012, París, Francia.*

Los dominios ricos en cisteínas de MUC5AC y el dominio citoplasmático de MUC1 (MUC1CT) se encuentran conservados en los mamíferos. **Objetivo:** comparar el patrón de expresión de los dominios conservados de las mucinas MUC1 y MUC5AC en epitelios de diferentes especies de mamíferos. **Materiales:** Se emplearon muestras de esófago, estómago, intestino delgado, colon, glándula salival, páncreas, hígado, tráquea, pulmón, vejiga y glándula mamaria, obtenidas de humano, vaca, cerdo, gato, conejo y rata. Se utilizó el anticuerpo policlonal CT33, dirigido contra MUC1CT humana y el anticuerpo monoclonal (AcMo) 45M1, reactivo contra el dominio cys 9 de la MUC5AC humana. **Métodos:** Inmunoquímica (IHQ), Western blot (WB) y dot blot. MUC5AC se aisló de homogenados de estómago y pulmón de rata, gato, cerdo y vaca mediante inmunoprecipitación en cromatografía de afinidad. Los complejos inmunes obtenidos se analiza-

ron mediante WB. A fin de determinar si la reacción de 45M1 podía ser incrementada, se trató a las muestras con neuraminidasa de *Chlostridium perfringens*. **Resultados:** Mediante IHQ, CT33 reaccionó con la mayoría de los tejidos analizados; páncreas, estómago y glándula salival mostraron una reacción muy intensa en el 100% de las muestras. El AcMo 45M1 reaccionó en epitelio y secreciones gástricas y en células calciformes de tráquea y pulmón. Mediante WB, con CT33 se evidenció una banda de aproximadamente 35KDa; con 45M1 se obtuvo una banda de 200KDa en secreciones de pulmón y estómago de rata, gato, cerdo y vaca. Con 45M1 se observó reacción más intensa en las muestras tratadas con neuraminidasa. Conclusiones: 1) CT33 presentó reacción en la mayoría de las especies analizadas. 2) 45M1 reaccionó en estómago y células calciformes de pulmón y tráquea de las especies incluídas. 3) El peso molecular de MUC1CT fue de 35KDa 4) MUC5AC fue inmunoprecipitada y aislada de secreciones de estómago y pulmón 5) El tratamiento con neuraminidasa aumentó la expresión de MUC5AC con 45M1.

**0370. (0344) ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS EN EPITELIOS NORMALES DE VARIAS ESPECIES DE MAMÍFEROS. E**  
Lacunza, V Ferretti, A Segal-Eiras, MV Croce

*Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Calle 60 y 120, 1900, La Plata, Argentina*

La O-glicosilación en mamíferos comienza con la adición de GalNAc (Tn) a residuos de serina y/o treonina. La transformación maligna de los epitelios ha sido asociada a la glicosilación anómala de distintas glicoproteínas, con la expresión alterada de epítopes carbohidratos (Le x, Le y y Tn) y/o la aparición de nuevos determinantes (sTn, sLex, y TF). El análisis de la expresión de dichos epítopes en epitelios normales de mamíferos permitiría establecer modelos experimentales para el estudio de carbohidratos relevantes en Oncología. Con este objetivo, se analizó mediante inmunohistoquímica el patrón de expresión y la localización específica de los epítopes Le x, Le y, sLex, Tn, sTn y TF en epitelios normales de humano, vaca, cerdo, gato, conejo y rata. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales KM380 (Le x), C14 (Le y), KM93 (sLex), HB-Tn1 (Tn), HB-sTn1 (sTn) y HB-T1 (TF). Le y se expresó en un 85% de las muestras de estómago de humano, vaca, y rata, un 100% en gato y un 67% en cerdo; en intestino delgado de humano y rata, 85% de las muestras fueron reactivas, en gato y conejo, 100%, y en vaca 67%; en tráquea de humano y gato, 85% de las muestras mostraron expresión, mientras que en vaca y conejo reaccionó un 67% de las muestras. Gato y humano presentaron expresión en glándula salival, colon e hígado. Le x reaccionó en glándula salival, intestino delgado, colon, páncreas, pulmón, tráquea y vejiga, siendo gato, conejo y humano las especies más reactivas. Tn se expresó en estómago, delgado y grueso de todas las especies; el disacárido TF mostró expresión en glándulas gástricas de gato (100%) y de conejo (67%) El antígeno sLex fue positivo en mama humana (47%) mientras que sTn no mostró expresión en ninguna de las especies analizadas. Conclusiones: 1- Le x y Le y se expresaron ampliamente sin ser exclusivos de ningún tejido o especie. 2- Tn se restringió al tubo digestivo de todas las especies. 3- sTn y sLex no serían carbohidratos de expresión en epitelios normales.

**0371. (0760) RESPUESTA INMUNE DE LA MUCOSA INTESTINAL FRENTE A LA ADMINISTRACIÓN DE KEFIRAN. M** Medrano<sup>1,2</sup>, S Racedo<sup>1,2</sup>, I. Rolny<sup>1,2</sup>, A Abraham<sup>2</sup>, PF Pérez<sup>1,2</sup>

*1 CIDCA-CONICET. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP, 2 Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.47 y 115. La Plata (1900). Tel/fax: 54 221 4249287/ 54 221 4254853. e-mail: silracedo@cidca.org.ar*

El kefir está asociado a numerosos efectos benéficos pero los mecanismos inmunológicos involucrados son poco conocidos. Por ello, estudiamos el efecto de la administración oral de kefiran, aislado de gránulos de kefir AGK1, sobre el balance de células

inmunes de la mucosa intestinal. Ratones BALB/C de 6 semanas fueron tratados por vía oral durante 2 y 7 días con kefiran (300mg/ml) (2dK y 7dK, respectivamente). Al final de cada período de administración, en estos grupos y en ratones controles (C) sin tratar, se analizó el % de células: CD4+, CD8+, B220/MHClI+ en bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) por citometría de flujo; se evaluó el nº de células IgA+ y de macrófagos (F4/80+) en lámina propia (LP) del tejido linfoide asociado a intestino (MALT) en 10 campos (63X), por inmunofluorescencia indirecta; y se realizó histología de intestino delgado (H&E). El tratamiento con kefiran incrementa el nº de células IgA+ (C:141.7±7.4, 2dK:302±40.5, 7dK:309±39.7; p<0.05) y F4/80+ (C:63±8.8, 2dK:140±27.1; C:56.7±8.3, 7dK:149.7±28; p<0.05) en LP de MALT. El % de células B220+MHClIhigh en los NLM del grupo 2dK fue mayor respecto al control (C: 20.3 ±1.4, 2dK:27.3±6.1; p<0.05). No hubo diferencias en el % de linfocitos CD4+ o CD8+ (p>0.05). En cortes histológicos de intestino (2dK y 7dK) se observó una mayor celularidad en LP. La administración de kefiran induciría una expansión clonal de células B220-MHClI+ en NLM, lo cual se refleja en el incremento de células productoras de IgA en LP. El aumento de células F4/80+ estaría relacionado con el reclutamiento de células presentadoras de antígeno ante el estímulo inducido por el polisacárido. Estos resultados demuestran la capacidad del kefiran de modificar el balance celular de la mucosa intestinal modulando así la respuesta frente a los diferentes estímulos presentes en el tracto digestivo. Esta propiedad sería altamente relevante para la comprensión del efecto probiótico atribuido al kefir.

**0372. (0761) EXPRESIÓN DE MICA EN CÉLULAS CD7+ Y CD138+ DE MUCOSA INTESTINAL HUMANA. Y** Allegretti<sup>1</sup>, L Guzman<sup>2</sup>, S Barrera<sup>2</sup>, E Cueto Rúa<sup>2</sup>, R Drut<sup>3</sup>, NW Zwirner<sup>4</sup>, FG Chirido<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune - LISIN. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. La Plata. Argentina, 2 Scio. de Gastroenterología Htal. de Niños "Sor M. Ludovica" La Plata, Argentina, 3 Scio. de Patología Htal. de Niños "Sor M. Ludovica" La Plata, Argentina, 4 IBYME-CONICET Buenos Aires, Argentina*

MICA (MHC class I chain related A) es una proteína polimórfica que no tiene función de presentación de péptidos. MICA se expresa en bajos niveles en enterocitos, y se sobreexpresa por estrés celular, siendo esto parte del mecanismo propuesto de muerte celular mediado por células NKG2D+. Observaciones previas de nuestro grupo, mostraron expresión de MICA en otros tipos celulares, en mucosa intestinal. El objetivo de este trabajo fue identificar el linaje de células MICA+ de los compartimentos intraepitelial (IE) y lamina propia (LP) en mucosa intestinal humana. Se analizaron biopsias intestinales de una población pediátrica con histología normal, signos de inflamación o atrofia vellositaria. El análisis de inmunofluorescencia por microscopía confocal mostró que MICA se localiza en la región perinuclear de enterocitos con muy baja expresión en tejido con histología normal, con incremento en casos de enteropatía moderada y severa. MICA se encontró en células CD7+ y CD138+ (principalmente plasmocitos), con una expresión de mayor intensidad que en enterocitos. En tejido con histología normal se hallaron células MICA+ CD7+ en ambos compartimentos; estas representan menos del 10% del total de células CD7+. Asimismo se observó más de un 50% de células CD138+ MICA+. El patrón de marcación de MICA fue diferente en los distintos linajes observándose marca difusa en células CD138+ y granular en CD7+. En muestras con enteropatía severa, los % fueron similares al normal, pero el número absoluto de células en ambas poblaciones aumentó. En muestras con enteropatía moderada, el porcentaje de células MICA+ CD7+ fue mayor, con alta variabilidad intragrupo. En conclusión, en mucosa intestinal existen células CD7+ y CD138+ MICA+. El número de células MICA+ aumenta, tanto en el compartimento IE como en LP en enteropatía moderada y severa. Estudios en curso proponen dilucidar la implicancia de la expresión diferencial de MICA en las células de la mucosa intestinal.

**0373. (0775) ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE LAS MAPK EN ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES Y EFECTO DE DISTINTAS DROGAS EN SU MODULACIÓN.** GH

Docena, L Rovedatti, N Leaky, TT MacDonald

*Institute of Cell and Molecular Science, Queen Mary University, Londres, Inglaterra.*

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (IBD) son enfermedades crónicas del tracto gastrointestinal debidas a una inflamación persistente originada por una respuesta exacerbada de linfocitos T mucosales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la activación de la vía p38 y modular su fosforilación ex vivo mediante el empleo de distintas drogas (GSK). Se estudiaron biopsias colónicas (18 normales y 19 de pacientes con IBD, 12 colitis ulcerosa y 7 Crohn), piezas quirúrgicas de colon (4 normales y 3 Crohn) y PBMC. Se analizó por immunoblotting (p38, JUNK, ATF-2) y ELISA (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-12 e IL-10) el estado de activación de las MAPK y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Se emplearon como activadores de las MAPK: LPS, TNF- $\alpha$  y a-CD3/a-CD28 y como inhibidores, 4 drogas que inhiben selectivamente p38 $\alpha$ . Se encontró que p38 y JNK están activadas en muestras de IBD y que las distintas drogas inhiben la fosforilación de p38, JNK y ATF-2. Asimismo se observó un marcado incremento en la secreción de IL-1  $\gamma$  (50-300 pg/ml) y TNF- $\alpha$  (40-500 pg/ml) en muestras de pacientes con IBD. El efecto de las drogas inhibitorias sobre la activación de p38 y secreción de citoquinas se observó en cultivos de las biopsias y de las células mononucleares aisladas de las piezas quirúrgicas. De las 4 drogas una ejerce un marcado efecto inhibitorio (GW 856553) observándose un efecto dosis-respuesta (0.1  $\mu$ M-10  $\mu$ M). Se trataron las muestras y los blottings con fosfatasa alcalina y se empleó un péptido bloqueante para estudiar la especificidad de los Ac contra los componentes fosforilados. Por lo tanto en pacientes con IBD las vía de p38 y SAPK/JNK están activadas y las células mononucleares secretan cantidades anormalmente elevadas de IL-1  $\beta$  y TNF- $\alpha$ . El empleo de 4 drogas específicas de p38 $\alpha$  previene la activación de p38 y JNK, y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, en particular una de ellas, que podría ser empleada en el tratamiento de pacientes con IBD.

## ENDOCRINOLOGÍA IV

**0374. (0349) EFECTO DEL LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO (LPS) SOBRE LA ACTIVIDAD DE NOS Y EL TRANSPORTE DE ARGININA EN CÉLULAS ADRENALES Y1.** C

Martinez Calejman<sup>1</sup>, JM Di Gruccio<sup>1</sup>, EM Repetto<sup>1</sup>, M Besio Moreno<sup>2</sup>, OP Pignataro<sup>2</sup>, P Arias<sup>3</sup>, CB Cymeryng<sup>1</sup>

*1 Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UBA. CEFYBO-CONICET, 2 IBYME-CONICET, 3 Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA*

Experimentos previos de nuestro laboratorio han demostrado la inhibición de la esteroidogénesis adrenal (basal y bajo estímulo con ACTH) por el NO endógeno. En el presente trabajo estudiamos el efecto del LPS, reconocido estímulo in vivo del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, sobre la esteroidogénesis en células de la línea adrenocortical murina Y1, así como sobre los sistemas de transporte de arginina (ARG –uptake de ARG tritiada) y la actividad de NOS (niveles de nitritos), tanto en condiciones basales como bajo estímulo con dibutiril-AMPc (dbAMPc, 500  $\mu$ mol/l). Las incubaciones con los distintos estímulos se realizaron durante 24 h en medio F10. Para el análisis estadístico de los resultados (media  $\pm$  SEM) se utilizó la prueba t para datos no apareados o un ANOVA. **Resultados:** la incubación con LPS 1  $\mu$ g/ml incrementó la producción de progesterona (control (C) 211  $\pm$  31; LPS 315  $\pm$  20 ng/ml/mg prot; p<0.01), aumentó el influjo de ARG (C 336  $\pm$  43; LPS 687  $\pm$  56 pmol/min/mg prot; p<0.01), y disminuyó los niveles de nitritos (C 24.0  $\pm$  1.9; LPS 13.9  $\pm$  1.6  $\mu$ moles/mg prot; p<0.05). El tratamiento con dbAMPc aumentó la producción de progesterona, y los efectos del LPS sobre el trans-

porte de ARG y la generación de nitritos se verificaron también en las células Y1 estimuladas con dbAMPc. **Conclusiones:** en esta línea celular el LPS estimula en forma directa la esteroidogénesis. Si bien bajo LPS se verifica un incremento del transporte de ARG, la actividad de la NOS en estas células está inhibida, como lo demuestra la caída en la generación de nitritos. La disminución de la producción de NO podría estar relacionada con el aumento observado en la liberación de progesterona al medio.

**0375. (0332) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A BISFENOL A (BPA) ALTERA LA EXPRESIÓN Y MADURACIÓN DEL MENSAJERO DE LHRH EN EL HIPOTÁLAMO DE LA RATA ADULTA.** LD Monje, J Varayoud, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, JG Ramos

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

El BPA es un perturbador endocrino con actividad estrogénica de amplia distribución. Previamente observamos que la exposición neonatal a BPA altera la expresión del receptor de estrógeno alfa (REa) en el hipotálamo de hembras prepúberes. Ahora nos propusimos investigar si esta alteración persiste en la adultez y si afecta los mecanismos de control de la transcripción hipotalámica del gen de LHRH. Crías hembras se inyectaron cada 48hs por vía sc desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta DPN7 con aceite (control), 20mg/kg (BPA20) y 0.05 mg/kg (BPA05) de BPA. En DPN80 los animales fueron ovariectomizados y 12 días después entre las 0900-1000 hs (día 0, D0) se les colocó implantes conteniendo 17 $\beta$ -estradiol (E2: 1mg/ml). Los animales fueron sacrificados a las 16.00hs del D2 y D3 en el momento en que se verifica el pico de LH inducido por E2. En bloques de tejido hipotalámico se determinó por PCR la abundancia relativa del ARN citoplasmático codificante (ARNc) de LHRH y de la variante inactiva que conserva el intron A (LHRH-IA), mientras que por inmunohistoquímica se estudió la expresión del REa en el núcleo anteroventral periventricular (AvPv). En D2 y D3 la dosis alta de BPA (BPA20) disminuyó la expresión tanto del ARNc de LHRH (p<0.05) como de la variante inactiva LHRH-IA (p<0.05). Por otro lado, en D2 la dosis baja de BPA (BPA05) aumentó los niveles del ARNc de LHRH (p<0.05) a expensas de un incremento en la escisión del intron A (p<0.05). En D2 ambas dosis de BPA provocaron un aumento en los niveles de la proteína de REa en el AvPv (p<0.05), el cual se mantuvo hasta el D3 sólo en el grupo de BPA05 (p<0.05). Nuestros resultados indican que la exposición neonatal a BPA altera en forma permanente el control hormonal de la expresión de REa y de LHRH en el hipotálamo. La alteración en el procesamiento citoplasmático de los transcritos primarios de LHRH constituye un blanco de acción del BPA, con posibles implicancias en la homeostasis del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal.

**0376. (0137) EFECTO DEL PENTADECAPÉPTIDO ASOCIADO A INGAP (INGAP-PP) SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HACIA CÉLULAS PRODUCTORAS DE INSULINA.** F Francini<sup>1</sup>, H Del Zotto<sup>1</sup>, O Naujok<sup>2</sup>, ML Massa<sup>1</sup>, A Jörns<sup>2</sup>, S Lenzen<sup>2</sup>, JJ Gagliardino<sup>1</sup>

*1 CENEXA. Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET), Argentina, 2 Instituto de Bioquímica Clínica, Facultad de Medicina Hanover, Alemania*

La escasez de donantes de páncreas para la terapia de reemplazo en pacientes con diabetes tipo I ha promovido la búsqueda de fuentes alternativas tales como el uso de células madre embrionarias (CME). **Objetivo:** evaluar el efecto del penta-decapéptido del INGAP (INGAP-PP) sobre la diferenciación de CME murinas hacia células endocrinas insulares. **Métodos:** Células ES-D3 se diferenciaron (según protocolo de Lumelsky), en medio c/s agregado de INGAP-PP (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) (25 días). En las células resultantes se aisló ARN y cuantificó la expresión de genes marcadores de células endocrinas (qPCR) y se estudió su estructura y ultraestructura. Empleando anticuerpos específicos se

identificaron células positivas para insulina, somatostatina, glucagón, Pdx-1, Ngn-3 y Nkx-6.1. La replicación celular se estimó mediante detección de PCNA. Como indicador de apoptosis se midió la expresión génica y actividad de caspasa-3 (proapoptótica) y Bcl2 (anti-apoptótica). **Resultados:** INGAP-PP aumentó la expresión génica de IAPP (+115%\*\*)\*, Glut-2 (+87%)\*, Kir-6.2 (+62%)\*, Sur-1 (+202%\*\*) e insulina (+53%)\* y disminuyó la expresión génica y proteica de glucagón (-71%\*\*) y somatostatina (-62%\*\*)\*. Asimismo aumentó la expresión génica de PDX-1 (115%\*\*) y la inmuno-positividad para PDX-1\*, Ngn-3\* y Nkx-6.1\*. No verificamos cambios en la expresión y actividad de caspasa-3 y Bcl2. La expresión génica de cyc-1 y la inmunopositividad para PCNA disminuyeron significativamente (-35%\*\*) (p<0.05). El 30% de las células diferenciadas mostró signos de apoptosis similares en ambas condiciones. En todos los casos \*p<0.01 y \*\*p<0.001. Conclusiones: INGAP-PP induce la expresión de genes y proteínas características de células precursoras  $\gamma$  o células  $\gamma$  maduras, con un sensor de glucosa y expresión del gen de insulina. El efecto favorable del INGAP-PP sobre el desarrollo y diferenciación de células  $\beta$  abre nuevas perspectivas para terapia de reemplazo cuando ellas están anormalmente disminuidas.

**0377. (0526) LA PROGESTERONA MODULA LA ACCION PROAPOPTOTICA DEL SISTEMA FAS/FASL EN LA ADENOHIPOFISIS.** G Jaita, S Zárate, D Radl, V Zaldivar, G Eijo, J Ferraris, D Pisera, A Seilicovich

*Instituto de Investigaciones en Reproducción (IdIR), Facultad de Medicina, UBA.*

Nuestros resultados previos indican que el sistema Fas/FasL induce apoptosis de manera estrógeno-dependiente en lactotropos y somatotropos y que la progesterona bloquea la acción proapoptótica de este sistema en somatotropos. En este trabajo, evaluamos la acción del sistema Fas/FasL sobre lactotropos incubados con 17 $\gamma$ -estradiol (E2, 10-9 M) y/o progesterona (P4, 10-6 M). La activación del receptor Fas, con un ligando recombinante (FasL), disminuyó el porcentaje de lactotropos TUNEL positivos incubados con P4 (P4: 8.9%; P4FasL: 4.6%, p<0.01 Chi 2). Además, la P4 bloqueó la acción proapoptótica del sistema Fas/FasL sobre los lactotropos incubados con E2 (E2: 1.8%; EFasL: 7.5%; p<0.01; E2+P4: 2.0% E2+P4FasL: 2.0%, ns, Chi 2). Considerando que el sistema Fas/FasL induce apoptosis en células adenohipofisarias de ratas en proestro pero no en diestro, estudiamos la acción de este sistema sobre la población de lactotropos durante el ciclo estral. La activación de Fas aumentó el porcentaje de lactotropos TUNEL positivos en proestro (C: 0.4%; FasL: 3.5%, p<0.05, Chi 2) pero no en diestro (C: 2.4%; FasL: 1.7%, ns, Chi 2). Dado que la expresión del receptor Fas es modulada por los esteroides gonadales y variable a lo largo del ciclo estral, evaluamos la expresión del FasL (por la técnica de RT-PCR) en células adenohipofisarias incubadas con E2 y/o P4 y en adenohipofisis de ratas en proestro o diestro. La expresión de FasL no se modificó en presencia de E2, P4 ni E2+P4 (Vehículo: 0.07  $\pm$  0.04; E2: 0.90  $\pm$  0.06, P4: 0.90  $\pm$  0.03; E2+P4: 1.00  $\pm$  0.15, ns, ANOVA). Sin embargo, la expresión del FasL fue mayor en adenohipofisis de ratas sacrificadas en diestro que en proestro (Diestro: 1.30  $\pm$  0.03; Proestro: 0.97  $\pm$  0.09; p<0.05, test t). Nuestros resultados sugieren que la progesterona bloquearía el efecto permisivo del estradiol sobre la acción proapoptótica del sistema Fas/FasL sin estar involucrada en la modulación de la expresión del FasL a nivel transcripcional.

**0378. (0121) RANELATO DE ESTRONCIO Y FORMACIÓN ÓSEA. ESTUDIO EXPERIMENTAL.** MMS Gonzales Chaves<sup>2,4</sup>, C Marotte<sup>1</sup>, GG Pellegrini<sup>1,2</sup>, SM Friedman<sup>2</sup>, P Mandalunis<sup>3</sup>, SN Zeni<sup>1,2,4</sup>

*1 Sección Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas. Fac. Medicina. UBA, 2 Cat. Bioquímica Gral. y Bucal. Fac. Odont. UBA, 3 Cat. de Histología. Fac. Odontología UBA, 4 CONICET*

El estroncio (Sr) y calcio (Ca) son elementos alcalino-térreos que se relacionan químicamente, por ello el Sr puede reemplazar al Ca en el hueso. El ranelato de Sr (RaSr) se utiliza para tratar osteoporosis ya que reduce la resorción al mismo tiempo que estimularía la formación ósea. Este efecto se determinó experimentalmente en ratas normales o en forma preventiva en ratas OVX. Sin embargo, en animales osteopélicos, la reducción en el remodelamiento óseo y restitución del contenido mineral óseo (CMO) sólo fue presentado en forma de resumen (Bone 13:A1, 1992), sin publicación posterior. Asimismo el mecanismo por el cual el Sr se incorporaría al hueso es aún materia de debate. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto sobre la formación ósea del RaSr en ratas OVX con osteopenia establecida. Se estudiaron 10 animales SHAM y 40 OVX, sin tratamiento alguno durante 60 días para desarrollar osteopenia. Luego, a 20 ratas OVX se les suministró vehículo (Vh) y a 20 RaSr (900mg/kg/d) durante 45 días. A los 0, 60 y 105 días se realizó densitometría de esqueleto total por DXA evaluando CMO de esqueleto total expresado por peso corporal (CMO/P). Se calculó ganancia de CMO/P entre final de experiencia e inicio del tratamiento [CMOet/P (105-60)]. A los 60, 70, 85 y 105 días se determinó fosfatasa alcalina ósea (FAO) plasmática. A los 105 días se analizó el volumen óseo total (VO) de tibia distal por histomor-fometría. **Resultados** (X $\pm$ DS): SHAM, OVX+Vh y OVX+RASr, respectivamente: [CMOet/P (105-60)]: -1.72 $\pm$ 1.08a; -1.24 $\pm$ 3.7a, 1.06 $\pm$ 1.44b; VO (%): 24.0 $\pm$ 10.2a, 5.0 $\pm$ 3.2b, 2.6 $\pm$ 1.0c. Letras distintas p<0.001. El VO aumentó un 50% respecto del grupo no tratado, lo que corresponde a alcanzar un 10% del grupo SHAM. No se observó aumento en la FAO por el tratamiento con RASr a ninguno de los tiempos estudiados. Conclusiones: Los resultados sugieren que el Sr se incorporaría preferentemente al hueso ya formado, sin efectos sobre la formación de nuevo hueso. Subsidio PIP 6483.

**0379. (0057) EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINO-SÍMIL TIPO I (IGF-I) SOBRE LA HIPERPLASIA LACTOTROPA PITUITARIA INDUCIDA POR ESTRÓGENOS.** G Camihort<sup>1</sup>, G Luna<sup>2</sup>, C Hereñú<sup>3,4</sup>, M Bracamonte<sup>1,4</sup>, R Goya<sup>3,4</sup>, G Cónsole<sup>1,2</sup>

*1 Cátedra 'B' de Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP, 2 Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Bs As: CICPBA, 3 INIBIOLP, 4 CONICET*

**Introducción:** La diferenciación, crecimiento y función secretoria de las células pituitarias dependen en parte de la acción de factores locales, paracrinicos o autocrinos. La acción mitogénica de los estrógenos (E) ha sido ya demostrada. La exposición prolongada produce hiperprolactinemia y formación de prolactinomas. Si bien se sabe que el IGF-I induce el crecimiento y la diferenciación de las células lactotropas, los efectos de la acción conjunta de E+IGF-I son aun poco conocidos. **Objetivo:** Analizar los cambios morfológicos y funcionales que produce la terapia génica, implementada mediante inyección intrapituitaria de un vector adenoviral que expresa el gen para IGF-I de rata (RAD-IGF1), sobre la población lactotropa en ratas estrogenizadas. **Material y métodos:** Se utilizaron ratas hembras estrogenizadas durante 50 días. Se sacrificaron a los 7 días de la inyección intrapituitaria del vector control (RAD-GFP/TKfus) o RAD-IGF-I (día 0). Se inmunomarcó con anti-PRL y se realizó el estudio morfométrico de la población lactotropa mediante analizador de imágenes: densidad de volumen (DVx10-2), densidad celular (DCx10-4) y tamaño celular (TCmm2). Se realizó el estudio de los niveles séricos de PRL. **Resultados:** Las ratas estrogenizadas, con y sin estereotaxia, mostraron un aumento significativo del TC (58.7 $\pm$ 1.3/59.1 $\pm$ 1.5 vs 38.6 $\pm$ 0.5) y de la DC (31.8 $\pm$ 2/32.8 $\pm$ 3 vs 21.1 $\pm$ 3) respecto a controles. El tratamiento combinado E+RAD-IGF1 mostró un descenso significativo del TC (45.2 $\pm$ 0.4) respecto a los grupos E y E+RAD(GFP/TK)fus. Se halló disminución significativa de niveles séricos de PRL en E+RAD-IGF1 respecto E+RAD(GFP/TK)fus (141.9 $\pm$ 21.8 vs 261.3 $\pm$ 44.3). Las ratas con E sin estereotaxia presentaron hiperprolactinemia respecto controles sin E (301.1 $\pm$ 60.7 vs 60.4 $\pm$ 13). **Conclusión:** Nuestros resultados su-

gieren que la terapia génica con IGF-I podría constituir una abordaje útil para el tratamiento de prolactinomas humanos.

**0380. (0314) INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CASTRACIÓN SOBRE LA REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) EN EL HIPOCAMPO DEL RATÓN ADULTO.** JG Ramos, J Varayoud, G Moreno-Piovan, M Muñoz-de-Toro, EH Luque

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonode-pendientes. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.*

El BDNF es un factor de crecimiento neurotrófico cuya expresión se encuentra alterada en varias patologías neurodegenerativas. Se ha sugerido que el BDNF es un gen estrógeno-sensible y que su expresión en el hipocampo podría inducirse mediante un tratamiento con estrógenos exógenos. Sin embargo aún no se conoce el mecanismo de acción de los estrógenos sobre el control de la transcripción de BDNF. El objetivo del trabajo fue conocer si el tiempo que un animal permanece castrado antes de comenzar una terapia con estradiol (E2) exógeno, influye sobre la inducción estrógeno-dependiente de BDNF en el hipocampo. Ratonas hembras adultas ovariectomizadas (OVX) fueron tratadas diariamente por 1 semana con 1.75mcg de E2 luego de 2 semanas (STE) o de 7 meses de realizada la OVX (LTE). Los controles respectivos se inyectaron con aceite (STC y LTC), sacrificándose todos los animales a la misma edad cronológica. La expresión hipocámpica de BDNF fue evaluada por RT-PCR en tiempo real y por inmunohistoquímica en las regiones CA3, CA1 y el giro dentado. Al ser tratados con E2, los animales que pasaron poco tiempo castrados antes de comenzar su tratamiento (STE) mostraron un aumento en el ARNm de BDNF ( $p < 0.01$ ), junto con un aumento de la proteína en la región CA3 del hipocampo ( $p < 0.05$ ). Por el contrario los animales LTE no mostraron cambio alguno en respuesta al tratamiento con E2. Posteriormente se estudió cuáles promotores del gen de BDNF fueron activados por el tratamiento con E2. En los animales STE se observó un aumento en la actividad de los promotores 2, 4 y 5 ( $p < 0.001$ ) mientras que en los ratones LTE sólo el promotor 2 presentó un leve incremento ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que el tiempo que un animal transcurre castrado modifica la regulación transcripcional de BDNF inducido por E2 exógeno en el hipocampo. El mecanismo subyacente involucraría el silenciamiento de los promotores 4 y 5 del gen de BDNF.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES II

**0381. (0232) ASOCIACIÓN NUCLEAR DE ERBB2 Y STAT3 EN EL PROMOTOR DE CICLINA D1: ROL DE ERBB2 COMO COACTIVADOR EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.** W Beguelin, CJ Proietti, C Rosembli, MA Rivas, RP Carnevale, V Sundblad, MC Díaz Flaqué, M Tkach, EH Charreau, R Schillaci, PV Elizalde

*Instituto de Biología y Medicina Experimental*

Previamente demostramos que la heregulina (HRG) activa Stat3 en cultivos primarios de células C4HD, provenientes de un tumor mamario murino progestágeno dependiente. Por otro lado, encontramos que HRG induce la localización nuclear de ErbB2 y su asociación con Stat3 en extractos totales. En este trabajo estudiamos la localización celular de Stat3 y ErbB2 asociadas y una posible funcionalidad de esta interacción. Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal demostramos que HRG induce la colocalización nuclear de ErbB2 y Stat3 en células C4HD y en la línea de tumor mamario T47D. Ensayos de inmunoprecipitación con extractos nucleares y citosólicos de células C4HD confirmaron la capacidad de HRG de inducir colocalización nuclear de ErbB2 y Stat3 y evidenciaron que HRG estimula también la asociación física de estas proteínas

fosforiladas en el núcleo. Mediante un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) demostramos que HRG induce el reclutamiento de Stat3 y ErbB2 al sitio de unión de Stat3 en el promotor del gen de ciclina D1 (cicD1). Luego evaluamos la capacidad de HRG de regular la expresión de cicD1. Ensayos de Western Blot indicaron que HRG induce la expresión de cicD1 en células C4HD y T47D. La transfección de estas células con un dominante negativo (DN) de Stat3 inhibió la expresión de cicD1 inducida por HRG y, al transfectar con una mutante constitutivamente activa (CA) de Stat3, aumentó la expresión basal. Células C4HD y T47D transfectadas con una construcción del promotor de cicD1-luciferasa y tratadas con HRG mostraron un aumento de la actividad transcripcional de cicD1 y éste fue prevenido por la cotransfección con el DN de Stat3 o una mutante de ErbB2 que no transloca al núcleo. Por el contrario, la cotransfección con Stat3 CA o ErbB2 CA y la sobreexpresión de ErbB2 incrementó la actividad transcripcional basal. Con estos experimentos sugerimos un nuevo rol de ErbB2 como coactivador en el mecanismo de regulación de transcripción por Stat3.

**0382. (0196) LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 INDUCIDA POR HEREGULINA (HRG) REQUIERE LA ACTIVACIÓN LIGANDO-INDEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (PR) Y LA ACTIVACIÓN DE C-SRC EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.** CJ Proietti, C Rosembli, W Beguelin, V Sundblad, MC Díaz Flaqué, R Carnevale, M Rivas, M Tkach, E Charreau, R Schillaci, PV Elizalde

*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET*

Demostramos previamente que la HRG promueve la activación transcripcional de Stat3 (proteína transductora de señales y activadora de la transcripción 3) en células C4HD provenientes de un adenocarcinoma mamario murino progestágeno-dependiente y en la línea celular de cáncer de mama humano T47D. Probamos además que c-Src es una molécula clave en la activación de Stat3 inducida por progestágenos (Mol. Cel. Biol. 2005 Jun 25 (12): 4826-40) y por HRG (Medicina 2006, 225). En el presente trabajo demostramos mediante ensayos de western blot que la fosforilación de Stat3 inducida por HRG fue inhibida por el antagonista de progestágenos RU486. Estudiamos entonces el rol del PR en la activación de c-Src inducida por HRG. El bloqueo de la expresión del PR con RNA de interferencia o de su activación con RU486, inhibió parcialmente la capacidad de HRG de fosforilar c-Src en las células C4HD y T47D. En la línea celular T47D-Y, que no expresa PR, HRG es capaz de inducir la fosforilación de c-Src. Sin embargo, no se observa un aumento de la fosforilación de Stat3 por HRG, demostrando la participación del PR. **Resultados** previos de nuestro laboratorio indican que la HRG induce la fosforilación del PR en Ser294 a través de la activación de las MAPKs. Demostramos en este estudio que el pretratamiento de las células C4HD y T47D con el inhibidor de MEK1/2, U0126, bloquea la fosforilación de Stat3 por HRG. Experimentos de reconstitución de las células T47D-Y con un vector de expresión para una forma mutante de PR carente del residuo Ser294 demostraron que este residuo es necesario para la fosforilación de Stat3 por HRG pero no es requerido para la activación de c-Src. Estos resultados demuestran que el PR en ausencia de su ligando, fosforilado en Ser294 por MAPKs activadas por HRG, constituye un punto de convergencia entre la activación de ErbB-2 y de Stat3 por HRG.

**0383. (0748) REGULACIÓN POST-TRADUCCIONAL DEPENDIENTE DE AMPK DE LA MAP QUINASA FOSFATASA-1 (MKP-1) EN CÉLULAS DE LEYDIG.** L Brion, P Maloberti, G Suárez, A Gorostizaga, F Cornejo Maciel, EJ Podestá, C Paz

*Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas (IIMHNO), Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires*

En células adrenocorticales y de Leydig el control hormonal de la esteroidogénesis y de la proliferación celular ocurre mediante un mecanismo que incluye la actividad de PKA y de MAP quinasas, particularmente ERK1/2. Previamente demostramos que en este tipo de células la MAP quinasa fosfatasa 1 (MKP-1), una enzima que desfosforila específicamente a los miembros de la familia de las MAP quinasas, se induce a nivel transcripcional por un mecanismo dependiente de PKA. Con el fin de conocer si la regulación de MKP-1 en células de Leydig de la línea MA-10 incluye también mecanismos post-traduccionales, se emplearon células transfectadas transitoriamente con el ADNc correspondiente a MKP-1 para expresar constitutivamente esta proteína y células transfectadas con el vector vacío como control. Mediante Western blot observamos que en las células que sobre-expresan MKP-1, la incubación con 8Br-AMPC (0,75 mM, 0-180 min) incrementa los niveles de esta proteína en una magnitud muy superior (20-30 veces) a la registrada en las células transfectadas con el plásmido vacío (expresión endógena). El efecto del AMPC sobre MKP-1 se reduce por inhibición de la activación de ERK (PD98059). La incubación de las células que sobre-expresan MKP-1 con un inhibidor del proteosoma (MG132) aumenta la actividad de fosfatasas determinada usando [<sup>32</sup>P]-poli-Glutámico-Tirosina como sustrato (Control = 515 ± 50, MG = 933 ± 82 cpm/min/μg proteína, P<0,05) y también los niveles de MKP-1. Se concluye que en células de Leydig, el AMPC promueve la estabilidad de MKP-1 por un mecanismo dependiente de la actividad de ERK1/2 y del proteosoma. Esta regulación post-traducciona, junto con la ejercida a nivel transcripcional, ejercerían un control estricto sobre MKP-1 y por ende, sobre la magnitud y el tiempo de acción de las MAP quinasas.

**0384. (0450) ESTUDIO DE LA TRANSLOCACIÓN DE NNOS A LA MITOCONDRIA EN MODELOS DE TRANSCRIPCIÓN IN VITRO Y EN CULTIVOS CELULARES.** MF Molinas<sup>1</sup>, MC Franco<sup>1</sup>, AS González<sup>1,2</sup>, JJ Poderoso<sup>1</sup>, MC Carreras<sup>1,2</sup>

*1 Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires, 2 Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires*

El óxido nítrico sintetizado en la mitocondria por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS), regula el consumo de oxígeno por inhibición reversible de citocromo oxidasa. mtNOS ha sido descrita como la isoforma alfa de NOS neuronal (nNOS) y se encuentra asociada a la membrana interna mitocondrial. nNOS posee un dominio pdz en su extremo N-ter por el cual interacciona con otras proteínas, lo que determina su ubicación subcelular. Con el objeto de estudiar la translocación de nNOS a mitocondria realizamos ensayos con un sistema de transcripción-traducción in vitro (STT), utilizando un vector que codifica para nNOS con un tag V5 en el extremo C-ter, bajo un promotor T7 y transfectamos células HEK293, que no expresan ninguna de las isoformas de NOS, con un vector que codifica para nNOS con un tag HA en el extremo C-ter, bajo un promotor CMV. En los ensayos in vitro, las mitocondrias de células HEK fueron incubadas con nNOS sintetizada por el STT y luego una alícuota fue tratada con proteinasa K (PK), para eliminar las proteínas asociadas a la cara citosólica de la membrana externa. nNOS se encontró asociada a mitocondrias y la proteína de 160 kD fue parcialmente resistente al tratamiento con PK, perdiendo los extremos amino y carboxilo terminal, quedando protegido un fragmento de 130 kD luego del tratamiento (determinado por western blot utilizando anticuerpos anti-tag y anti-N-ter, C-ter y secuencia interna de nNOS). En células HEK 293 transfectadas por 24 hs. con el vector de expresión de nNOS, se obtuvieron resultados similares. La expresión en el STT de una construcción que codifica para nNOS sin el dominio pdz, mostró que esta proteína conserva la capacidad de asociarse a la membrana externa mitocondrial. Conclusiones: a) la entrada de nNOS a la mitocondria ocurre por reconocimiento de secuencias internas de la proteína por parte de la maquinaria de translocación; b) La asociación de nNOS a la membrana externa mitocondrial es independiente de su dominio pdz.

**0385. (0744) PARTICIPACIÓN DE LA ANGIOTENSINA II EN LA FASE TEMPRANA DE LA INVOLUCIÓN MAMARIA.** K Nahmod<sup>1</sup>, NB Fernandez<sup>2</sup>, J Geffner<sup>1</sup>, M Vermeulen<sup>1</sup>, EC Kordon<sup>2</sup>, C Schere Levy<sup>2</sup>

*1 Laboratorio de Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, 2 LEGMA, IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*

La angiotensina II (All), el principal péptido efector del sistema angiotensinérgico, ejerce sus acciones mediante la interacción con el R-AT1 y el R-AT2. El R-AT1 es el subtipo de receptor que predomina en el tejido adulto, responsable de mediar la mayoría de los efectos fisiológicos y patológicos ejercidos por la All. El R-AT2, se expresa abundantemente en el tejido fetal, pero existe baja expresión en el tejido adulto en condiciones normales, por lo que se le atribuye un importante rol en el desarrollo y diferenciación tisular. La expresión del R-AT2 aumenta en procesos inflamatorios y en tejidos lesionados sugiriendo su participación en remodelación tisular. Dicho receptor, se re-expresa en ciertas condiciones como la atresia ovárica y el infarto de miocardio. Se desconocía el rol de la All en la fisiología de la glándula mamaria. Por primera vez, demostramos por RT-PCR que, mientras la expresión del R-AT2 es indetectable durante la fase de la lactancia, aumenta su expresión significativamente (p<0.05) durante las primeras 20 horas de la involución mamaria. Sin embargo, la expresión del R-AT1 no varía considerablemente. Por otro lado, se trataron células epiteliales mamarias normales SCP2 con All y se evaluó la activación y expresión de factores que intervienen en el proceso de involución. Observamos por western blot que el agregado de All induce a los 15 minutos activación de STAT3, así como también la expresión de su gen target EBP δ. Además, el agregado de All induce activación ERK1/2 y de p65 de la vía de NF-κB, a los 5 y 30 minutos respectivamente. Por RT-PCR demostramos que el tratamiento de estas células con All, induce la expresión de TNFalfa, que como hemos reportado previamente, estimula la expresión de LIF. En conjunto, estos resultados sugieren por primera vez, que la All a través de R-AT2 participaría en un proceso fisiológico desencadenando los principales eventos asociados a la fase temprana de la involución mamaria.

**0386. (0465) RELEVANCIA DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA DE BCL-2 EN LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIADA POR EGF EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS.** L Romorini<sup>1,3</sup>, OA Coso<sup>2,3</sup>, A Pecci<sup>1,3</sup>

*1 Dpto. de Química Biológica, 2 Dpto. de Fisiología, Biología Molecular y Celular, 3 FCEN-UBA, IFIBYNE-CONICET*

EGF activa vías de señalización asociadas con la proliferación y la muerte celular. La línea epitelial mamaria murina HC11 es un modelo útil para estudiar la acción del factor de crecimiento in vitro. EGF (100ng/ml) revierte la apoptosis de células HC11 confluentes y activa a las quinasas JNK, PI3K/AKT y MEK/ERK1/2. Este efecto correlaciona con el aumento en los niveles de Bcl-XL (antiapoptótica). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación de las distintas vías de señalización sobre los niveles de expresión de los miembros de la familia Bcl-2. Mediante ensayos de western blot se observó que el aumento de Bcl-XL mediado por EGF (1.9±0.2 veces) es bloqueado por los inhibidores de la actividad de JNK (SP) y de PI3K (LY). A su vez, LY revierte el aumento en los niveles del ARNm bclXL medidos por ensayo de protección a RNAsas; mientras que SP no tiene efecto. Los niveles de Bcl-2 y BAX no cambian bajo ninguna de las condiciones ensayadas. Observamos también el aumento en la fosforilación de los residuos Ser-112 (30 veces) y Ser-136 (6.4 veces) de la proteína BAD (pro-apoptótica) luego de estimular células HC11 confluentes durante 5 minutos con EGF y una posterior disminución en los niveles de dicha proteína. LY inhibe la fosforilación en Ser-136 mientras que el inhibidor de ERK1/2 (PD) lo hace en Ser-112. Como consecuencia, ambos inhibidores bloquean la disminución en los niveles de BAD mediada por EGF. Sin embargo, este efecto no sería suficiente para revertir el efec-

to protector de apoptosis que ejerce el factor de crecimiento. Concluimos que JNK y PI3K son las principales quinasas involucradas en la protección celular de EGF. Ambas participarían en la inducción de Bcl-XL y la fosforilación y disminución en los niveles de BAD. Dado que al bloquear la disminución de los niveles de BAD no se revierte la inhibición de apoptosis mediada por EGF concluimos que el evento indispensable para la acción protectora de EGF sería el aumento de Bcl-XL.

**0387. (0173) ESTUDIO DE MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA ADAPTATIVA A HIPOXIA.** J Gerez<sup>1</sup>, A Carbia-Nagashima<sup>1</sup>, S Silberstein<sup>1</sup>, M Paez-Pereda<sup>2</sup>, GK Stalla<sup>2</sup>, F Holsboer<sup>2</sup>, E Arzt<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Depto FBMC, FCEN, IFIBYNE-CONICET, UBA., 2 Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania.*

RSUME, una proteína cuyo gen fue clonado en nuestro laboratorio, forma parte de la maquinaria enzimática de sumoilación promoviendo la sumoilación de proteínas, fenómeno que también ocurre en hipoxia, en la cual ciertas proteínas se sumoilan para que la célula pueda desencadenar su respuesta adaptativa. La proteína clave en esta respuesta es HIF- $\alpha$ , subunidad principal del factor de transcripción HIF-1. HIF- $\alpha$  es degradado en normoxia, mientras que en hipoxia su degradación se bloquea permitiendo que sea sustrato del sistema de sumoilación, lo que conduce a aumento de la actividad transcripcional de HIF-1. En el presente trabajo estudiamos el rol de RSUME durante el estrés hipóxico, focalizando el análisis en la subunidad  $\alpha$  de HIF-1. Demostramos por RT-PCR en células Cos7 que RSUME es inducido 2.5 veces luego de 16 hs de hipoxia y 2 veces cuando se sobre-expresa HIF-1 $\alpha$ . Estos resultados fueron confirmados empleando construcciones reporteras con la zona promotora del gen de RSUME ( $p < 0.05$ ), en los cuales la delección de los Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE) inhibe completamente dicha inducción, indicando que estos efectos podrían estar mediados por HIF-1. Recíprocamente, empleando un vector de expresión de RSUME y construcciones reporteras para HRE demostramos que RSUME aumenta la actividad transcripcional de HIF-1 (200%,  $p < 0.05$ ), como así también la estabilidad de la proteína HIF-1 $\alpha$  detectada por Western Blot. Silenciando la expresión de RSUME por RNAi específicos, tanto el aumento de la proteína HIF-1 $\alpha$  inducido por hipoxia como la actividad transcripcional de HIF-1 disminuyen considerablemente (53% y 59% respectivamente). Finalmente demostramos que RSUME aumenta el estado de sumoilación de HIF-1 $\alpha$  y que ambas proteínas interaccionan físicamente. Concluimos que RSUME es inducido en hipoxia aumentando la estabilidad y la conjugación de SUMO a HIF-1 $\alpha$ , ejerciendo de esta manera un rol importante en la actividad transcripcional de HIF-1.

## HEMATOLOGÍA II

**0388. (0411) DIAGNÓSTICO DE RECAÍDA DE LEUCEMIA LINFOLÁSTICA AGUDA (LLA) PEDIÁTRICA, MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS REARREGLOS DE INMUNOGLOBULINAS (IG) Y RECEPTORES DE LINFOCITOS T (TR).** PL Rubio Longo, MS Felice, J Rossi, M Gallego, A Medina, CN Alonso

*Hospital de Pediatría Dr. Prof. J.P. Garrahan*

Las recaídas de LLA (Rec) son consideradas como una reaparición de la misma enfermedad clonal. Los rearreglos de Ig y TR son utilizados como marcadores de clonalidad y para la detección de enfermedad mínima residual (EMR). El análisis comparativo de los rearreglos presentes al diagnóstico inicial (Dx) y en la Rec permite confirmar si se trata del mismo clon leucémico, de un fenómeno de evolución clonal o de una segunda enfermedad maligna (SEM). **Objetivos:** caracterizar los rearreglos de Ig/TR del

clon leucémico, diferenciar entre Rec y SEM, y evaluar la estabilidad de los rearreglos. **Métodos:** se evaluaron muestras de médula ósea de 13 ptes al momento del Dx de LLA (12 LLA-B y 1 LLA-T) y de su Rec (mediana de RC: 17 m). Se realizó el análisis de morfología, inmunofenotipo, estudio citogenético convencional y rearreglos de Ig (IGH-IGK) y de TR (TRG-TRD). La caracterización molecular de Ig/TR fue realizada en ADN de células mononucleares mediante PCR-Heterodúplex (Biomed) y secuenciación. **Resultados:** En 5 ptes se observaron cambios del inmunofenotipo; en 1 caso la morfología cambió de L1 a L3, adquiriendo t(8;14), observándose un cariotipo diferente en un total de 2 casos; en otros 2 se observó la adquisición de nuevas alteraciones y 4 casos se mantuvieron sin cambios. Mediante el estudio de Ig/TR se detectaron 37 rearreglos al Dx (mediana por pte: 3; rango: 1-6) de los cuales 27 (73%) se mantuvieron en la Rec y 10 se perdieron. Se adquirieron 8 nuevos rearreglos. La mediana de rearreglos estables por pte fue de 2 (rango: 1-4). La caracterización molecular del clon leucémico permitió demostrar que a pesar de los cambios observados en morfología, inmunofenotipo y cariotipo, en todos los casos la Rec se originó a partir del clon del Dx. Esto demuestra que la detección de Ig/TR es la única herramienta que permite diferenciar con certeza Rec y SEM. No todos los rearreglos fueron estables en el tiempo, lo cual debe tenerse en cuenta para su aplicación en el estudio de EMR.

**0389. (0818) LA ACIDOSIS EXTRACELULAR PROMUEVE LA APOPTOSIS DE CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.** LP D'Atri<sup>1</sup>, E Malaver<sup>1</sup>, N Pacienza<sup>1</sup>, RG Pozner<sup>1</sup>, S Negrotto<sup>1</sup>, RM Gómez<sup>2</sup>, M Schattner<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Trombosis I, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, 2 Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata*

Las células madre hematopoyéticas (HSC, CD34<sup>+</sup>) han sido tradicionalmente utilizadas para trasplante de médula ósea. Investigaciones recientes mostraron el potencial de estas células en la regeneración de tejidos. La acidosis extracelular es un regulador crítico de respuestas de activación y sobrevivencia de diferentes tipos celulares. El desarrollo de microambientes ácidos está asociado no solamente con procesos inflamatorios sino también con el desarrollo tumoral o tejidos isquémicos. Considerando que uno de los potenciales usos clínicos de las HSC es la revascularización y regeneración celular en pacientes con infarto de miocardio o accidente cerebrovascular, en este trabajo evaluamos el impacto del medio ácido en la sobrevivencia de HSC. Células CD34<sup>+</sup> fueron obtenidas de sangre de cordón umbilical por inmunoselección magnética positiva. El análisis de cambios nucleares evaluado por microscopía de fluorescencia utilizando naranja V de acridina y bromuro de etidio mostró que el cultivo de células CD34<sup>+</sup> en un medio ácido (pH6.5) durante 48 horas aumentó significativamente la apoptosis (pH7.4: 18 $\pm$ 4, pH6.5: 53 $\pm$ 6% n=9). La inducción de apoptosis fue confirmada por citometría de flujo que mostró un aumento de células positivas para anexina V (pH7.4: 28, pH6.5: 75%, n=2) y de células hipodiploides (pH7.4: 8, pH6.5: 45%, n=2). Factores de crecimiento con actividad antiapoptótica como TPO, SCF e IL-3 así como el análogo del AMPc (BIMPs) revirtieron significativamente la apoptosis de los cultivos en medio ácido (C: 53 $\pm$ 6, TPO: 30 $\pm$ 4, SCF: 30 $\pm$ 6, IL-3: 10 $\pm$ 4, BIMPs: 37 $\pm$ 6%,  $p < 0.05$  vs C, n=6). Sin embargo, en todos los casos, la sobrevivencia celular no alcanzó el nivel de los cultivos control (pH7.4, n=3). El VEGF (10 ng/ml) no modificó la apoptosis inducida por el medio ácido. La exposición de HSC a pH 6.5 disminuyó los niveles de Bcl-xl evaluados por citometría de flujo (pH7.4: 17; pH6.5: 5% n=2). Estos hallazgos demuestran que la acidosis extracelular promueve la apoptosis de HSC.

**0390. (0007) EFECTO INHIBITORIO DE LA HIPEROSMOLARIDAD SOBRE LA RESPUESTA DE NEUTRÓFILOS TRATADOS CON CITOCALASINA B.** MS Giambelluca, OA Gende

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

La exposición de los neutrófilos a medios hipertónicos previa a la estimulación con agentes quimiotácticos los hace incapaces para desarrollar respuestas funcionales. El objetivo de este estudio fue comparar la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS) inducida por fMLP en neutrófilos tratados con citocalasina B (CitB) en medios isotónicos (iso) e hipertónicos (hiper). Se utilizaron neutrófilos aislados de sangre humana mediante centrifugación en un gradiente discontinuo. La concentración de calcio citosólico en los neutrófilos aislados se determinó luego de la incubación con FURA 2-AM y la liberación de ROS al medio extracelular se cuantificó mediante un método que utiliza un marcador fluorescente unido a albúmina. Se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control (iso sin CitB=100%) en iso+CitB ( $688 \pm 127\%$ ), hiper ( $64 \pm 5\%$ ) e hiper+CitB ( $64 \pm 13\%$ ). El tratamiento con CitB se hizo antes o después de modificar la osmolaridad del medio (aumentando entre 25 y 100 mmoles/l la concentración de NaCl) la respuesta en ambos casos fue similar. Paradójicamente la liberación de ROS aumento cuando se aumentó la osmolaridad luego de estimular a los neutrófilos con fMLP ( $86.8 \pm 6.4\%$  iso vs  $115.5 \pm 9\%$  hiper). El efecto de la hiperosmolaridad fue reversible recuperándose el  $72.5 \pm 2.4\%$  de la respuesta 100 seg después de retornar al medio isotónico. Se obtuvo una reducción comparable en la respuesta cuando el aumento de osmolaridad se produjo por el agregado de CINA, cloruro de N-metilglucamina o sacarosa (hasta el  $13.3 \pm 2.4\%$ ,  $20.2 \pm 4.3\%$  y  $10 \pm 4\%$  respectivamente) pero la reducción fue menor cuando se agrego manitol ( $72.2 \pm 6\%$  del isotónico). El efecto inhibitorio sobre la liberación de ROS se correlacionó con los cambios en el calcio intracelular, mostrando que la hiperosmolaridad actúa sobre la cadena de señalización en un eslabón cercano a la activación del receptor de membrana.

**0391. (0722) SEÑALIZACIÓN NO GENÓMICA DEL NFKAPPAB EN PLAQUETAS.** LP D'Atri<sup>1</sup>, E Malaver<sup>1</sup>, RG Pozner<sup>1</sup>, S Negrotto<sup>1</sup>, N Pacienza<sup>1</sup>, R Benzadón<sup>2</sup>, M Lazzari<sup>1</sup>, M Schattner<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Trombosis I, Academia Nacional de Medicina, 2 Banco de Sangre, CEMIC

El complejo NFkappaB/IkappaB tiene un rol crítico en la regulación de la expresión de genes que controlan procesos de diferenciación, proliferación, inflamación, oncogénesis y apoptosis. Previamente se ha demostrado que las plaquetas expresan el factor de transcripción NFkappaB y que la estimulación con Trombina (TR) promueve la degradación del mismo; sin embargo, se desconoce la importancia de esta respuesta en la fisiología plaquetaria. En este trabajo evaluamos el rol del NFkappaB en la activación plaquetaria. La preincubación de plaquetas humanas con un inhibidor específico de NFkappaB, Bay 11-7082 (Bay, 100µM) inhibió la agregación (determinada por turbidimetría) inducida por ADP ( $79 \pm 8\%$  de inhibición,  $p < 0,0001$ ), colágeno ( $70 \pm 8\%$ ,  $p < 0,01$ ) y adrenalina ( $67 \pm 6\%$ ,  $p < 0,001$ ) ( $n=5$ ). En plaquetas lavadas, la agregación estimulada por TR disminuyó  $62 \pm 11\%$  ( $n=8$ ,  $p < 0,001$ ). La liberación de ATP (evaluada por luminiscencia) en plaquetas estimuladas con ADP fue significativamente disminuida en presencia de Bay ( $2.84 \pm 1$  vs  $0.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ,  $n=3$ ). La exposición de sitios de unión al fibrinógeno (medido por la unión al anticuerpo PAC-1 por citometría de flujo) mostró que el porcentaje de células positivas para PAC-1 inducido por TR fue inhibido por Bay (C:  $3 \pm 1$ , TR:  $47 \pm 10$ , TR+Bay:  $22 \pm 5^*$  %,  $n=3$ ,  $*p < 0,05$  vs TR). En ensayos de Western Blot se observó que la estimulación de plaquetas con TR y ADP induce la degradación de IkappaB y este fenómeno es revertido en presencia de Bay. Para analizar el rol de NFkappaB en la activación de plaquetas in vivo, se inocularon ratones con Bay (10 mg/kg). Luego de 24 hs, la agregación plaquetaria inducida por ADP fue inhibida en un  $57 \pm 3\%$  respecto a la agregación en los ratones control ( $n=7$ ,  $p < 0,05$ ). Estos hallazgos proponen una novedosa acción no genómica del NFkappaB/IkappaB y sugieren que la activación del mismo sería otra vía de señalización involucrada en la activación plaquetaria.

**0392. (0665) IMPLICANCIA FUNCIONAL Y RESTRICCIÓN AL LINAJE MEGACARIOCÍTICO DE LA DISMINUCIÓN DEL CXCR4 EN PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL.** JP Salim, NP Goette, CD Chazarreta, PR Lev, PG Heller, FC Molinas, RF Marta

Hematología Investigación-Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari

Existen quimoquinas (QQ) implicadas en el desarrollo megacariocítico y en la producción plaquetaria (plaq). Previamente hallamos disminución de CXCR4, único receptor conocido para la QQ SDF-1, en la membrana de plaq y a nivel del ARNm intraplaquetario en pacientes (pac) con trombocitemia esencial (TE), con niveles plasmáticos normales de la QQ. La TE es una enfermedad mieloproliferativa crónica que presenta hiperplasia megacariocítica y aumento de plaquetas. Aquí evaluamos las consecuencias funcionales de ésta disminución y si se extiende a otros linajes celulares. Los estudios funcionales consistieron en agregación plaq con SDF-1 e internalización del CXCR4. Las subpoblaciones leucocitarias se identificaron con AcMo específicos. La agregación plaq con SDF-1 en controles normales (CN) fue completa, bifásica, dosis dependiente, presentándose anomalias (solo 1ª onda, retardo de respuesta o ausencia de agregación) en los 11 pac evaluados. Para la internalización, se midió el CXCR4 en plaq por citometría de flujo antes y después del estímulo con SDF-1. Los 9 pac y sus respectivos CN no mostraron una la tasa de internalización diferente,  $36\%$  (26-61) y  $14\%$  (2-68), respectivamente,  $p = 0.358$ . Esto sugiere que en la disminución del CXCR4 no estaría implicada una mayor tasa de internalización. La IFR (Intensidad Fluorescencia Relativa) de CXCR4 en granulocitos de pac se halló elevada  $11.1$  (2.22-22.74), CN  $7.54$  (1.73-9.52),  $p = 0.036$  ( $n=7$ ). Resultados similares se hallaron en linfocitos CD3+,  $40.0$  (6.78-67.91) de pac y  $17.23$  (5.22-29.97) de CN,  $p = 0.036$ . Por el contrario, CXCR4 sobre la membrana del monocito fue normal, IFR pac  $49.81$  (1.17-118.28), CN  $74.23$  (3.0-80.49),  $p = 0.8$ . Esto demuestra que la disminución del CXCR4 esta restringido al linaje megacariocítico. Teniendo en cuenta el importante rol del eje SDF-1/CXCR4 en la megacariocitopoyesis, la desregulación del mismo en los pac con TE podría estar implicada en las alteraciones megacariocíticas vistas en la enfermedad.

**0393. (0819) ROL DE LOS AGONISTAS PPARg EN LA REGULACION DE LA SOBREVIDA DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS.** N Pacienza<sup>1</sup>, S Negrotto<sup>1</sup>, RG Pozner<sup>1</sup>, E Malaver<sup>1</sup>, LP D'Atri<sup>1</sup>, MA Lazzari<sup>1</sup>, O Torres<sup>1</sup>, RM Gomez<sup>2</sup>, M Schattner<sup>1</sup>

1 Academia Nacional de Medicina, 2 Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad Nacional de La Plata

Previamente demostramos que los ligandos del PPARg, como el endógeno 15d-PGJ2 (PGJ) y el sintético ciglitazona (CGZ), inhiben la proliferación de precursores megacariocíticos mediante inducción de arresto del ciclo celular y apoptosis. Con el fin de profundizar estos hallazgos se analizó el efecto de ambas drogas en la formación de colonias megacariocíticas en geles de colágeno utilizando células CD34+ aisladas de sangre de cordón umbilical mediante inmunoselección magnética positiva. Se observó que el número de colonias disminuyó significativamente de manera concentración dependiente ( $n=3$ ). Considerando que PGJ y CGZ actúan por mecanismos dependientes e independientes del receptor, analizamos la acción del GW-9662 (GW, inhibidor del PPARg) y del BAY 11-7082 (BAY, inhibidor de NFkB). La apoptosis mediada por PGJ no fue modificada por el tratamiento con GW pero aumentó significativamente en presencia del BAY (C= $10 \pm 1$ , BAY= $19 \pm 3$ , PGJ= $22 \pm 5$ , ambos= $33 \pm 6$ ,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ). Para determinar si este efecto era específico del linaje megacariocítico, células CD34+ fueron cultivadas con EPO, IL3, SCF, G-CSF o GM-CSF con o sin agonista. Posteriormente, se evaluó apoptosis y viabilidad celular por microscopía de fluorescencia y ensayo de

MTT. Ambos ligandos indujeron un significativo incremento en los niveles de apoptosis así como también una significativa disminución en la viabilidad celular independientemente del factor de crecimiento. Además, se examinó el efecto de PGJ o CGZ en la capacidad formadora de colonias granulocíticas, eritroides o mixtas de CD34+ en ensayos clonogénicos con metilcelulosa. Se obtuvo una marcada disminución en el número total de colonias (control=66±5, PGJ=27±6, CGZ=13±5, n=3, p<0,001) a expensas de un descenso en cada una de los linajes. Estos datos muestran que los agonistas del PPAR $\gamma$  poseen un efecto supresor sobre todos los progenitores hematopoyéticos, que en el caso de PGJ estaría asociado a una acción indirecta sobre el factor de transcripción NF $\kappa$ B.

**0394. (0499) PERFIL DE ACTIVACIÓN DE MONOCITOS Y SU RELACIÓN CON LA MUTACIÓN DEL JAK2 EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS.** NP Goette, PR Lev, LI Kornbliht, JP Salim, FC Molinas, RF Marta

*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari*

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMC) son un grupo de enfermedades caracterizadas por proliferación clonal de células hematopoyéticas. Se describió en un subgrupo de pacientes con SMC Phi negativo una mutación en la tirosinquinasa Jak2 que incrementa la sensibilidad de las células hematopoyéticas a factores de crecimiento. En trabajos anteriores describimos activación de monocitos en SMC, evidenciada por aumento de la expresión del receptor de IL-2, como marcador de activación clásica, y de liberación del receptor soluble de IL-6 (IL-6sR). El IL-6sR puede generarse por el clivaje del receptor de membrana o por splicing alternativo. En este trabajo continuamos con el estudio de activación en monocitos y los mecanismos por los cuales ocurre. Determinamos los niveles de expresión de TGF- $\beta$ 1, marcador de activación alternativa, en condiciones basales por RT-PCR semicuantitativa, utilizando como referencia la expresión de la  $\beta$ 2-microglobulina. Además determinamos la liberación de IL-6sR de monocitos en cultivo por ELISA, en presencia de un inhibidor del clivaje proteolítico (TAPI). Se estudiaron 11 pacientes con SMC y 11 controles normales. La expresión de TGF- $\beta$ 1 fue similar en ambos grupos: relación TGF- $\beta$ 1/ $\beta$ 2-microglobulina en pacientes 2.96 (1.52-6.44), mediana y rango, controles 2.97 (1.27-6.70). La liberación de IL-6sR por los monocitos cultivados en presencia de TAPI estuvo ligeramente aumentada en los pacientes, 337.4 pg/ml (121-731.5) con respecto a los controles, 207.7 pg/ml (82.5-335.0), p=0.0625. Los pacientes con la mutación del JAK2 tuvieron valores superiores de producción de IL-6sR, p=0.057. En conclusión, la tendencia a la activación de monocitos parece ser selectiva y restringida en los pacientes. El mecanismo del aumento de IL-6sR en los pacientes podría ser por splicing alternativo del ARN mensajero, siendo los pacientes con la mutación de Jak2 los que presentan valores más altos.

**0395. (0579) INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA MEDIADA POR AGONISTAS DEL PPARGAMMA Y ASPIRINA.** E Malaver<sup>1</sup>, S Negrotto<sup>1</sup>, LP D'Atri<sup>1</sup>, RG Pozner<sup>1</sup>, N Pacienza<sup>1</sup>, R Benzádon<sup>2</sup>, M Lazzari<sup>1</sup>, M Schattner<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Trombosis I, Academia Nacional de Medicina, 2 Banco de Sangre, CEMIC.*

Los receptores activados por proliferadores del peroxisoma (PPARs) son miembros de una familia de factores de transcripción activados por ligando. La isoforma  $\gamma$  si bien originalmente se le reconoció como función principal la regulación de la diferenciación de adipocitos y la homeostasis de la glucosa, su expresión ubicua la involucra actualmente en diferentes funciones incluyendo regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Recientemente se demostró que las plaquetas expresan PPAR $\gamma$  y que sus ligandos inhiben la activación plaquetaria sugiriendo a este receptor como un nuevo blanco para la terapia antiagregante. En este trabajo profundizamos los mecanismos involucrados en la inhibición mediada por agonistas del PPAR $\gamma$  y su efecto en combinación con la aspirina (AAS). Las plaquetas fueron obteni-

das de donantes voluntarios de sangre. El agonista natural del PPAR $\gamma$ , 15-d-prostaglandina J2 (PGJ 10 $\mu$ M) inhibió (55±5%, n=6, p<0.001) la exposición de sitios de unión al fibrinógeno (medido por la unión al anticuerpo PAC-1 por citometría de flujo) inducida por Trombina (TR). No hubo modificación con otros ligandos sintéticos como troglitazona y rosiglitazona (30 $\mu$ M). El tratamiento con un antagonista específico del PPAR $\gamma$ , GW-9662, no revirtió el efecto inhibitorio en la unión al PAC-1. La PGJ inhibió la agregación plaquetaria (evaluada por turbidimetría) estimulada por TR (IC50=10  $\mu$ M±2). La inhibición de la ciclooxigenasa plaquetaria por la incubación con AAS 300  $\mu$ M potenció la inhibición del PAC-1 mediada por PGJ (TR+PGJ 47±3, TR+PGJ+AAS 77±2%\* de inhibición n=3, \*p<0.05 vs PGJ) y la agregación plaquetaria (TR+PGJ 51±18, TR+PGJ+AAS 92±2%\* n=3, \*p<0.05 vs PGJ). Los resultados muestran que PGJ regula negativamente la agregación plaquetaria inhibiendo el cambio conformacional de la GPIIb/IIIa a través de mecanismos independientes de la activación del PPAR $\gamma$ . La combinación de PGJ y AAS resulta en una potenciación de la acción antiagregante individual de cada droga.

## GASTROENTEROLOGÍA II

**0396. (0496) ALUMINIO Y ESTRÉS OXIDATIVO. EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA A NIVEL HEPÁTICO EN RATAS.** MA González, MC Contini, N Millen, S Mahieu

*Laboratorio de Investigaciones Fisiológicas Experimentales*

La acumulación de aluminio, producto de altas ingestas como contaminante alimentario o por el uso terapéutico en distintas enfermedades, podría conducir a estrés oxidativo. Son conocidos las propiedades antioxidantes de la melatonina. El objetivo del siguiente trabajo fue analizar el efecto antioxidante de la Melatonina sobre el estrés oxidativo ocasionado por el aluminio en ratas Wistar machos adultos (n=5 c/ grupo). Grupos experimentales: A: controles; B: Lactato de Aluminio (Al) (0.62 mg Al/100 g pc.ip durante 3 meses); C: Melatonina (10 mg/kg pc. ip durante 3 meses); D: tratamiento simultáneo Melatonina + Al. Se analizaron parámetros de estrés oxidativo hepático: la actividad de catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión reductasa (GR), Lipoperoxidación (LPO) y el contenido de glutatión total (GSH). Se determinaron las concentraciones de Al en sangre y en hígado medidas por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un test de variancia seguido test de Tukey y se expresan como media  $\pm$  SEM. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos p < 0.05. LPO (nmolMDA/g tej) A:153.35 $\pm$  3.05a, B:290.52  $\pm$  5.59b, C: 169.02 $\pm$ 13.53a, D:165.63 $\pm$ 5.26a. GSH (mmol/ g híg.). A:3.47 $\pm$  0.14a, B: 2.01 $\pm$ 0.12 b, C:4.05 $\pm$ 0.056a, D:2.69 $\pm$ 0.5a. GR(nmol NADPH/min.mg prot.). A:7.59 $\pm$ 1.05a, B: 4.92 $\pm$ 0.74b, C:9.06 $\pm$ 1.7a, D:7.56 $\pm$ 0.78a. GSH-Px (U/mg prot.). A:82.84 $\pm$ 7.05a, B: 45.12 $\pm$ 3.31b, C:95.25 $\pm$ 2.98a, D:100.28 $\pm$ 2.92a. CAT (U/mg prot.). A: 138.89 $\pm$  3.4a, B: 84.41 $\pm$ 12.98b, C:203.24 $\pm$ 21.31c, D: 224.3 $\pm$  35.61c. En concordancia con trabajos anteriores, la exposición crónica al Al produjo estrés oxidativo a nivel hepático. A partir de los datos obtenidos, se puede observar un efecto protector de la melatonina sobre la membrana del hepatocito. Estos hallazgos podrían tener significancia clínica ya que sugerirían que las posibles alteraciones ocasionadas por el aluminio podrían ser atenuadas por el tratamiento antioxidante con Melatonina.

**0397. (0238) HIPOCAMPO Y APOPTOSIS EN RATAS CON HIPERTENSIÓN PORTAL PREHEPÁTICA.** S Tallis<sup>1</sup>, J Bustamante<sup>2</sup>, S Lorez-Arnaiz<sup>2</sup>, DM Roselló<sup>1</sup>, NR Lago<sup>3</sup>, MG Chelujá<sup>1</sup>, A Lemberg<sup>1</sup>, JC Perazzo<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Hipertensión Portal, Cát. de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Laboratorio de Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 3 Laboratorio de Patología Experimental, Fac. de Medicina, UBA*

**Introducción.** La hipertensión portal (HP) es una complicación de la cirrosis hepática que induce cambios en el hipocampo (H) en el sistema nervioso central. Diferentes vías de señalización extrínsecas e intrínsecas (mitocondrial), conducen a la apoptosis. **Objetivos.** Evaluar la presencia de apoptosis y su relación con la función mitocondrial en la etapa temprana de la HP Prehepática. **Material y Métodos.** La HP se generó por ligadura parcial de la vena porta en ratas Wistar de 250g de peso c. divididas en 2 grupos: HP (n=8) y Controles con operación simulada (n=8). La caracterización de apoptosis se realizó por el método de TUNEL y a través de la expresión de la proteína Bax asociada a la fracción mitocondrial. Se evaluó además la función mitocondrial a través del consumo de oxígeno y la actividad y expresión de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) y microscopía electrónica del H. **Resultados.** En el TUNEL se observó focos de intensa fluorescencia asociada a zonas de evidente condensación de la cromatina. La expresión de la proteína pro-apoptótica Bax se encontró aumentada en HP. En estos animales, la respiración se encontró disminuida en 29% en el estado 4 y un 42% en el estado 3 y el control respiratorio disminuyó un 20%. La expresión de mtNOS disminuyó en HP evidenciado por una disminución del 46% en la actividad de la enzima. Se observaron alteraciones en la ultraestructura mitocondrial en el H confirmando un proceso apoptótico. **Conclusión:** Se describe por primera vez apoptosis en el H en la Hp que explicarían los cambios en la misma.

**0398. (0124) PROBIÓTICO BIOFLORA EN LA PREVENCIÓN DE LESIONES GASTROINTESTINALES INDUCIDAS POR INDOMETACINA, EN RATAS.** O Laudanno, R Villarruel, A Godoy, J Cesolari

*Facultad de Ciencias Médicas Rosario*

Estudiar al Probiótico Bioflora (Bio) en la prevención de las lesiones agudas gastrointestinales por Indometacina (Indo) y su mecanismo. Grupos aleatorios de ratas hembras Sprague-Dawley (n = 10 c/grupo), ayuno 24 hs agua ad libitum, se realizaron: I. Indo 30 mg/Kg sc c/24 hs 2 días. II. Bio 1 ml (1.3 x 10.7 bacterias vivas) orogástrica c/12 hs 2 días e Indo. Las ratas fueron sacrificadas, laparotomía, gastrectomía y enterectomía; se tabuló el % área necrótica gástrica y erosiva intestinal (mm<sup>2</sup>), cortes para MPO, cultivos bacteriológicos intestinales (CFU) y de los ganglios linfáticos mesentéricos y se reseco 4 cm íleon terminal para histoquímica linfocitos T (CD4+). Se calculó t Student y ANOVA. El % área necrótica gástrica dio: I. 65 ± 7. II. 7.5 ± 1.3 (p < 0.001). MPO: I. 416 ± 31 mg/proteína. II. 30 ± 7 (p < 0.01). Erosiones ID: I. 380 ± 31. II. 41 ± 6 (p < 0.01). MPO: I. 435 ± 45. II. 51 ± 11 (p < 0.01). Cultivos ID: I. 7.5 ± 3.5 x 10.10. II. 2.3 ± 0.8 x 10.5 (p < 0.01) y en linfáticos: I. 9 (+) 1 (-). II. 8 (-) 2 (+) (p < 0.02) y linfocitos T íleon: I. 0.5 ± 0.1. II. 4 ± 1 (p < 0.01). Conclusiones: El Probiótico Bioflora impidió las lesiones agudas gastrointestinales inducidas por Indo, el infiltrado neutrófilo, el sobredesarrollo bacteriano intestinal e incrementó los linfocitos T (CD4+) intestinal.

**0399. (0562) EFECTOS DE LA GALECTINA-1 SOBRE LA ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR, HEPG2, Y SOBRE LA POLARIZACIÓN DE SUS MEMBRANAS.** MF Troncoso<sup>1</sup>, MV Espelt<sup>1</sup>, P Carabias<sup>1</sup>, GA Rabinovich<sup>2</sup>, C Wolfenstein de Todel<sup>1</sup>

*1 IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 IByME-CONICET*

La galectina-1 es una proteína con afinidad por β-galactósidos que interviene en la regulación del crecimiento y adhesión, apoptosis y metástasis. Un factor clave para la progresión de tumores es la migración celular y el primer evento involucrado en el fenómeno migratorio es la polarización de las células tumorales. Las células epiteliales hepáticas, al ser cultivadas a alta densidad, adoptan un fenotipo polarizado caracterizado por la formación de canalículos biliares (CB). El primer objetivo fue investigar el efecto de la galectina-1 recombinante (rGal-1) sobre la adhesión de células de hepatocarcinoma humano, HepG2. Observamos, mediante la tinción con Cristal Violeta, que la rGal-1 (400

µg/ml, 14 µM) incubada en forma soluble con la suspensión de células promovió significativamente la adhesión (149±18%, tiempo de incubación 1h) respecto a las células control (100%). Este efecto fue dependiente de la dosis observándose la máxima respuesta a la concentración de 14 µM. Además, la adhesión de las células aumentó significativamente (138±9%) cuando éstas se cultivaron en placas recubiertas con la rGal-1 inmovilizada (20 µg/pocillo). El segundo objetivo fue evaluar el efecto de la rGal-1 sobre la polarización de las células HepG2. Los CB se visualizaron por microscopía de fluorescencia utilizando faloidina-TRITC. Simultáneamente, se utilizó el colorante nuclear Hoechst y la polaridad celular se estimó como la media ± error estándar de CB/100 células. En presencia de la rGal-1 (7 µM) la polaridad a las 48h aumentó (15±2) con respecto al control (8±2). Luego de 72h, se observó la misma polaridad en las células control (12±4) y en las tratadas (15±1), sin embargo, la Gal-1 indujo un aumento en el área relativa de los CB. Estos resultados demuestran que la Gal-1 promueve la adhesión de las células HepG2 y la hiperpolarización de sus membranas y sugieren su posible rol en la diferenciación hepática durante la embriogénesis o la transformación maligna.

**0400. (0280) LA IMPORTANCIA DE LA DETERMINACION DEL PERFIL DE ACIDOS BILIARES SERICOS EN PACIENTES CON COLESTASIS DEL EMBARAZO TRATADAS CON ACIDO URSODESOXICOLICO.** S Lucangioli, S Flor, V Tripodi

*Cátedra de Química Analítica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

La colestasis intrahepática del embarazo (CIE) es una condición de etiología desconocida, caracterizada por la presencia de prurito. Si bien es benigna para la madre, la CIE resulta extremadamente peligrosa para el feto ya que se encuentra asociada a casos de morbi-mortalidad perinatal. Dado que se la considera una condición de alto riesgo, el diagnóstico precoz, el tratamiento eficaz y su seguimiento resultan esenciales. Hasta el presente, el parámetro más específico de diagnóstico y seguimiento post tratamiento con ácido ursodesoxicólico (UDCA) es el aumento de ácidos biliares séricos (ABS) totales maternos. Sin embargo, en un trabajo previo, hemos demostrado cómo el perfil de ABS resulta más útil en el diagnóstico diferencial de la CIE observándose incrementos en los niveles de los ácidos biliares más tóxicos como el litocólico (LCA) y desoxicólico (DCA). Hasta el presente, no existen datos respecto de la modificación del perfil de ABS y las ventajas de su determinación durante el tratamiento con UDCA probablemente debido a la falta de una metodología analítica capaz de cuantificar simultáneamente cada uno de los ABS con elevada precisión y exactitud. En este trabajo evaluamos el perfil de ABS en pacientes con CIE durante la administración de UDCA utilizando la electroforesis capilar con detección UV que permite cuantificar 15 ácidos biliares en suero simultáneamente. Los resultados demuestran que a pesar de no existir una disminución de los niveles de ABS totales luego del tratamiento con UDCA (53.7± 7.6 vs 48.8±6.3), su perfil se modifica dramáticamente con reducción de los niveles de LCA (20.2±5.3 vs 2.3±0.9, p < 0.002) y DCA (12.3±4.3 vs 2.7±1.2, p < 0.05). Nuestros resultados establecen que la evaluación del perfil de ABS por electroforesis capilar y en especial la determinación de LCA resulta más ventajosa que la determinación de los niveles de ABS totales para el diagnóstico y seguimiento de la CIE post tratamiento con UDCA.

**0401. (0212) ALTERACIONES HEPÁTICAS Y CAMBIOS EN LA INTEGRIDAD DE LA BARRERA HEMATO ENCEFÁLICA INDUCIDOS POR MONOCROTALINA EN RATAS.** CT Coll, DM Roselló, S Tallis, MG Cheluja, SG Coll, T Coll, FX Eizayaga, S Romay, A Lemberg, JC Perazzo

*\*Laboratorio de Hipertensión Portal, Cát. Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

**Introducción:** La monocrotalina (MCT) es un alcaloide pirrólico, metabolito producido por numerosas plantas. Se reportaron

intoxicaciones en humanos tras la ingestión accidental en infusiones y/o consumo de granos o derivados de *Crotalaria* o *Senecio*, entre otras, con daño pulmonar, renal y hepático con oclusión de la vena hepática e Hipertensión Portal. **Objetivo:** Determinar posibles cambios estructurales y funcionales en la barrera Hematoencefálica (BHE) tras la administración de MCT. **Material y métodos:** 48 ratas Wistar, divididas en 2 grupos: A) grupo MCT (n=24) se administra una dosis de MCT (60 mg/Kg peso corporal, intraperitoneal) y B) grupo Control (n=24) vehículo, sc. fisiológica. A los 44 días se sacrifican todos los animales y se evalúa: la integridad cualitativa (test de Trypan blue) y cuantitativa (test de Evans blue) de la BHE, concentración de proteínas en LCR, injuria hepática con parámetros bioquímicos, microscopía de luz y electrónica y evaluación de la presión portal. **Resultados:** (Media  $\pm$  DS)

	Parámetro MCT	Control
Trypan blue	Positivo	Negativo
Evans blue (mg Evans blue (mg EB/gr tej)*)	8,34 $\pm$ 0,25	6,12 $\pm$ 0,27
Proteínas LCR (gr/L) *	0,41 $\pm$ 0,07	0,19 $\pm$ 0,04
Presión Portal (mm Agua) *	12,1 $\pm$ 1,0	7,6 $\pm$ 0,2
ALT (GPT) (UI/L) *	68 $\pm$ 9	41 $\pm$ 4
AST (GOT) (UI/L) *	239 $\pm$ 25	149 $\pm$ 14
Fosfat. alcalina (UI/L) *	698 $\pm$ 44	396 $\pm$ 16
Albuminemia (gr/dl) *	3,2 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,1

\* (p<0,05)

El test de Trypan muestra la difusión en el hipocampo. La microscopía óptica muestra necrosis, fibrosis y esteatosis hepática con trombosis de la vena Porta. Por microscopía electrónica se observa fragmentación de las crestas mitocondriales y vacuolas perinucleares. **Conclusiones:** La administración de una dosis de MCT en ratas induce injuria hepática, hipertensión portal y cambios en la integridad de la BHE con aumento en la permeabilidad de la misma.

**0402. (0279) DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL MICRORARN-122 EN EL HÍGADO DE RATAS TRATADAS CON TIOACETAMIDA.** LM Veggi<sup>1,2</sup>, L Pretto<sup>2</sup>, AL Nocito<sup>3</sup>, SM Daniele<sup>2</sup>, JF Palatnik<sup>2,4</sup>

1 IFISE (CONICET-UNR), 2 Fac. Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR), 3 Fac. Ciencias Médicas (UNR), 4 IBR (CONICET-UNR)

El daño al hígado por tioacetamida (TA) en la rata es un modelo clásico de hepatotoxicidad. Los microARNs (miRs) son ARNs no codificantes (20-23 nt) que regulan negativamente la expresión de ARN mensajeros blancos. La mayoría de los miRs se expresan como transcritos primarios de ARN (pri-miRs) que se procesan en el núcleo a un fragmento de 60 a 80 nt denominado pre-miR. Este intermediario se transporta al citoplasma para ser finalmente cortado a su tamaño maduro. El miR-122 se expresa en el hígado en desarrollo y del organismo adulto, en el cual representa el 70% del total de los miRs. Se propone que miR-122 cumple un rol importante en el establecimiento del patrón de expresión génica responsable del estado de diferenciación del tejido hepático. En este trabajo se inyectaron ratas macho wistar adultas con TA (i.p., 400 mg/kg rata, n=3) y solución fisiológica (vehículo TA, i.p., n=3) siendo sacrificadas a las 24 hs. Se extrajeron muestras de suero para el dosaje de enzimas (ALT, AST, ALP y LDH). Sobre muestras de hígado se realizaron estudios histológicos en cortes coloreados con hematoxilina-eosina y purificaciones de ARN total en las que se midió los niveles de miR-122 (northern blot) y sus precursores (Real time-PCR). Los datos se analizaron con la prueba t-student. Se observó en las ratas tratadas con TA una necrosis hepatocitaria importante junto con un aumento significativo de las actividades de las enzimas medidas. Se observó que TA produjo una disminución de la expresión de miR-122 (unid. arbitrarias de densitometría, TA 845 $\pm$ 75 vs C 1221 $\pm$ 228, p<0,05) y esta alteración se correlacionó con una disminución de la expresión de sus precursores pri-miR-122 (% relativo control, TA 7 $\pm$ 4 vs C 100 $\pm$ 28, p<0,05) y pre-miR-122 (% re-

lativo control, TA 4 $\pm$ 2 vs C 100 $\pm$ 77, p<0,05). Estos resultados indican que el miR-122 disminuye su expresión en hígado en un modelo de toxicidad aguda por TA en la rata debido principalmente a la reducción de la transcripción de su precursor pri-miR-122.

**0403. (0729) EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL ALUMINIO EN MUCOSA INTESTINAL DE RATAS.** M Contini, M González, N Millen, S Mahieu

Laboratorio de Investigaciones Fisiológicas Experimentales (LIFE). UNL

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto antioxidante de la melatonina sobre el estrés oxidativo ocasionado por el aluminio en mucosa intestinal de ratas Wistar machos adultas (n=5 c/ grupo), peso promedio 300 g, divididas en los siguientes grupos experimentales: A: controles; B: LAC, tratadas con Lactato de Aluminio (0.62 mg Al/100 g pc.ip 3 veces por semana durante 3 meses); C: Melatonina (10mg/kg peso, i.p 5 veces por semana, durante 3 meses); D: tratamiento simultaneo Mel+LAC. Se analizaron parámetros de estrés oxidativo en mucosa intestinal: la actividad de catalasa (CAT:U/mg prot) por el método de Beers, Glutathion Reductasa (GR:nmol NADPH/min.mg prot.) por el método de Horn, lipoperoxidación (LPO:nmoIMDA/g tej) a través del dosaje de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico por el método de Ohkawa y el contenido de glutatión total (GSH: umol/ g tej.) por el método de Ellman. Se correlacionaron dichos valores con las concentraciones de Al en sangre y en mucosa intestinal medidas por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un test de variancia (ANOVA), seguido del test de Tukey y se expresan como media  $\pm$  SEM. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados p < 0.05.

	A	B	C	D
LPO	78.65 $\pm$ 6.09a	116.28 $\pm$ 2.98b	86.13 $\pm$ 0.99a	86.76 $\pm$ 6.56a
GSH	2.38 $\pm$ 0.05a	2.05 $\pm$ 0.12a	1.79 $\pm$ 0.23a	2.42 $\pm$ 0.47a
GR	23.73 $\pm$ 0.81a	23.53 $\pm$ 2.45a	49.17 $\pm$ 1.68b	42.43 $\pm$ 0.38c
CAT	7.23 $\pm$ 2.79a	9.31 $\pm$ 2.38	18.81 $\pm$ 1.80b	19.28 $\pm$ 2.06b

En concordancia con trabajos anteriores, la exposición crónica al aluminio produjo estrés oxidativo a nivel intestinal. A partir de los datos obtenidos, se puede observar un efecto protector de la melatonina sobre la mucosa intestinal. Estos hallazgos sugerirían que los daños ocasionados por el aluminio podrían ser atenuados por el tratamiento antioxidante con melatonina.

**0404. (0366) LA CITOQUINA TNF $\alpha$  DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINA-8 (AQP8) EN HEPATOCITOS DE RATA POR AUMENTO EN LA DEGRADACIÓN PROTEICA.** GL Lehmann, LR Soria, FI Carreras, RA Marinelli

Instituto de Fisiología Experimental IFISE-CONICET - UNR - Argentina

La colestasis hepatocelular es una complicación frecuente de la sepsis bacteriana asociada a alteraciones en la expresión de transportadores hepatobiliares. Recientemente observamos en colestasis por endotoxemia una disminución en la expresión hepática de AQP8 por mecanismos postranscripcionales. El bloqueo específico *in vivo* de TNF $\alpha$  logró prevenir la caída de AQP8, sugiriendo un rol preponderante para esta citoquina. **Objetivos:** Se estudió el efecto de TNF $\alpha$  directamente en cultivo primario de hepatocitos, así como la posible contribución de las vías de degradación proteicas a la disminución de los niveles de AQP8, particularmente las vías lisosomal y proteosomal. **Materiales y Métodos:** Cultivos primarios de hepatocitos de rata fueron preincubados durante 30 min en presencia de los inhibidores de proteasas lisosomales leupeptin (250  $\mu$ M) o cloroquina (100  $\mu$ M) y los inhibidores del proteosoma MG132 (10  $\mu$ M) o lactacystin (5  $\mu$ M) y luego por 8 h adicionales en ausencia o presencia de TNF $\alpha$  recombinante (1000 U/mL). **Resultados:** En concordancia con lo

observado previamente *in vivo*, TNF $\alpha$  disminuyó la expresión de AQP8 (-55 %;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ), mientras que la expresión de otra aquaporina hepática, AQP9, permaneció estable. TNF $\alpha$  no alteró la viabilidad celular según lo determinado por el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa. Consistente con esto, el número de células vivas (por exclusión de azul tripán) y el contenido de proteína fueron similares en controles y tratadas con TNF $\alpha$ . El pretratamiento de los cultivos con leupeptin o cloroquina previno la bajada de la expresión de AQP8 inducida por TNF $\alpha$  (-95%;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ). Del mismo modo, MG132 y lactacystin lograron prevenir la disminución de la expresión de AQP8 provocada por TNF $\alpha$  (-89%;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ). **Conclusión:** Estos resultados sugieren que el TNF $\alpha$  induce la degradación de AQP8 hepática por mediación de las vías proteolíticas lisosomal y proteosomal.

**0405. (0031) EL TNF-ALFA INHIBE LA SECRECIÓN SALIVAL POR ACTIVACIÓN DE RECEPTORES HIPOTALÁMICOS DE CANNABINOIDES.** J Fernandez-Solari<sup>1, 2</sup>, JP Prestifilippo<sup>1</sup>, V Rettori<sup>1</sup>, JC Elverdin<sup>2</sup>

*1 Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET-UBA, 2 Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA*

Se ha descrito que los endocannabinoides (EC) modulan la neurotransmisión autonómica. Previamente, demostramos que el EC anandamida inyectado en forma intracerebroventricular (icv) inhibe la secreción salival. Además, el LPS (5 mg/Kg, ip) así como el TNF $\alpha$  (100 ng/rat, icv) incrementaron la actividad hipotalámica de la enzima AEA sintasa, lo que nos permitió demostrar la conexión entre los sistemas inmune y neuroendocannabinoide centrales. En el presente trabajo estudiamos el efecto central del TNF $\alpha$  sobre la secreción salival y si el mismo es mediado por el sistema endocannabinoide hipotalámico. Con este fin, determinamos, por inmunohistoquímica, la presencia de receptores de cannabinoides tipo 1 (CB1) en el área hipotalámica lateral, que ejerce el control central de la secreción salival. En segundo término, se estudió la secreción salival secretada por la glándula submaxilar (GSM) de ratas Wistar macho adultas (5/grupo). Para obtener la saliva, se canuló el conducto excretor principal de la GSM. La secreción salival fue inducida por dosis crecientes de metacolina (MC: 1, 3 y 10  $\mu$ g/Kg), agonista colinérgico, inyectada a través de la vena femoral, antes (curva control) y después de la administración de las distintas drogas a través de cánulas colocadas en el ventrículo lateral del cerebro: TNF $\alpha$  (100 ng/5 $\mu$ l); AM251 (500 ng/5 $\mu$ l), un antagonista específico para CB1; AM251+TNF $\alpha$ ; o salina (5  $\mu$ l). Los resultados fueron analizados por ANOVA de dos vías y post-test de Bonferroni. El tratamiento con TNF $\alpha$  redujo la secreción salival inducida MC; con 1  $\mu$ g/Kg, de 10.5 $\pm$ 1.5 mg a 4.5 $\pm$ 1.3 mg ( $p > 0,05$ ); con 3  $\mu$ g/Kg, de 24.0 $\pm$ 3.0 mg a 11.0 $\pm$ 1.8 mg ( $p < 0,05$ ); y con 10  $\mu$ g/Kg, de 49.5 $\pm$ 4.9 a 27.0 $\pm$ 3.7 mg ( $p < 0,001$ ). Pero, cuando se co-inyectaron AM251 y TNF $\alpha$ , el efecto inhibitorio fue bloqueado. Por lo tanto, se concluye que el TNF $\alpha$  activa el sistema EC central provocando la inhibición de la secreción salival inducida por metacolina. (Subsidios: PICT 14264 y PIP 6149).

**0406. (0275) GLUCAGON INDUCE LA EXPRESIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE LA AQUAPORINA-8 (AQP8) MITOCONDRIAL HEPÁTICA EN LA RATA.** LR Soria, GL Lehmann, RA Marinelli

*Instituto de Fisiología Experimental-CONICET, Universidad Nacional de Rosario.*

La AQP8 funciona como una aqua(amoni)oprina, o sea que además de agua, también facilita el transporte de amoníaco. La AQP8 mitocondrial (AQP8mt, 28 kDa) está presente en la membrana mitocondrial interna de los hepatocitos. En estas células, la hormona glucagon estimula la ureagénesis a partir del amoníaco, aumentando la expresión de las enzimas del ciclo de la urea. La AQP8mt podría participar en la metabolización del amoníaco, al facilitar su transporte mitocondrial, y así abastecer el ciclo de la urea. Por lo tanto, nuestro objetivo fue estudiar si la expresión

de la AQP8mt es regulada por glucagon. Ratas Wistar macho adultas fueron inyectadas con glucagon (0,2 mg/100g peso i.p. por 40 hs). Se utilizó como control positivo del efecto inductor de la hormona, la actividad enzimática fosfatasa alcalina hepática, que mostró un aumento en su actividad específica (+106%,  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ). Se prepararon fracciones subcelulares enriquecidas en mitocondrias y en membranas mitocondriales internas (mitoplastos). El enriquecimiento de los mitoplastos, determinado con la enzima mitocondrial aspartato aminotransferasa, no mostró diferencias entre ratas controles y tratadas con glucagon (+300% respecto a mitocondrias,  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ). El contenido de AQP8mt se determinó por inmunoblotting y posterior densitometría. Glucagon incrementó la expresión de AQP8mt un 60% en la fracción de mitocondrias (estadísticamente no significativo) y un 160% en mitoplastos ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ). Se prepararon, además, vesículas de membrana mitocondrial interna y por filtración rápida se estudió el transporte mitocondrial de amoníaco utilizando el análogo [14C]metilamina. Las vesículas provenientes de las ratas tratadas con glucagon mostraron un aumento de 73% ( $p < 0,05$ ;  $n=3$ ) en la captación de [14C]metilamina respecto al control. **Conclusión:** los resultados sugieren que en el hepatocito, glucagon induce la expresión de la proteína AQP8mt, incrementando el transporte mitocondrial de amoníaco.

**0407. (0236) DISFUNCIÓN DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN RATAS CON COLESTASIS POR LIGADURA DEL CONDUCTO BILIAR.** CT Coll, DM Roselló, MG Cheluja, S Tallis, S Coll, T Coll, S Romay, FX Eizayaga, A Lemberg, JC Perazzo

*Laboratorio de Hipertensión Portal, Cát. de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

**Introducción:** La ligadura crónica del conducto biliar en ratas (LCB) produce severos cambios morfofuncionales en hígado. La patología hepática con hipertensión portal se acompaña de alteraciones en el sistema nervioso central. Aún no se ha descrito alteraciones en el SNC en la LCB. **Objetivo:** Estudiar la integridad de la Barrera Hematoencefálica (BHE) del SNC en el modelo de BDL en ratas. **Material y métodos:** Se usaron ratas Wistar, de 260 g de peso divididas en dos grupos: A) grupo con Ligadura del conducto biliar (LCB) ( $n=12$ ) y B) grupo Control ( $n:12$ ) con operación simulada. Ambos grupos se sacrificaron luego de 21 días post-cirugía. Se evaluaron la BHE: integridad cualitativa a través del test de Trypan blue y cuantitativa por el test de Evans Blue; concentración de proteínas en LCR, compromiso hepático con parámetros bioquímicos; medición de la Presión Portal y microscopía óptica hepática. **Resultados:** Media $\pm$ DS, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$

	LCB	Control
Trypan Blue	Positivo	Negativo
Evans B (mg EB/g tej)*	8,71 $\pm$ 0,51	5,90 $\pm$ 0,32
Proteínas LCR (mg/dl)**	37,85 $\pm$ 5,31	0,19 $\pm$ 0,04
Presión Portal	10,5 $\pm$ 1,5	5,5 $\pm$ 1,5
Amonemia (mg/dl)*	0,51 $\pm$ 0,08	0,24 $\pm$ 0,06
ALT (U/L)*	66 $\pm$ 7	41 $\pm$ 4
AST (U/L)*	342 $\pm$ 45	152 $\pm$ 27
LDH (U/L)**	8330 $\pm$ 890	1362 $\pm$ 72
Bilirrubina Tot (mg/dl)**	2,03 $\pm$ 0,48	0,23 $\pm$ 0,05

La microscopía óptica muestra necrosis, fibrosis y esteatosis hepática con trombosis de la vena Porta. Los parámetros bioquímicos demuestran el daño morfofuncional del hígado. **Conclusiones:** La LCB en ratas induce injuria hepática e hipertensión portal con hiperamonemia leve con cambios en la integridad de la BHE.

**0408. (0377) MODULACIÓN POR GLUCAGON (G) DE LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRADIOL-17 $\beta$ -GLUCURÓNIDO (E17G).** AE Zucchetti, AC Boaglio, FA Croceni, EJ Sánchez Pozzi

*Instituto de Fisiología Experimental – CONICET – UNR. Argentina*

AMPc previene la colestasis por estradiol 17 $\beta$ -glucuronido. Los niveles hepáticos de AMPc son regulados por glucagon, por lo que estudiamos la capacidad de esta hormona para proteger de la colestasis. Se utilizó un modelo in vitro de duplas aisladas de hepatocitos (DAHR) para evaluar el efecto de G sobre la alteración por E17G de la función de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2. Se obtuvieron DAHR por perfusión con colagenasa seguida de elutriación. Luego de 5 hs de cultivo, DAHR se incubaron con G (0,4mg/l), seguido de incubación con concentraciones crecientes de E17G (6,25 a 800  $\mu$ M) o solvente y finalmente expuestas a colilil fluoresceína (CLF, sustrato de Bsep) y clorometil fluoresceína diacetato (CMFDA, cuyo metabolito conjugado con glutation, GMF, es sustrato de Mrp2). Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CLF (acCLF) o GMF (acGMF). Las curvas concentración/respuesta (n=4) se analizaron con el programa Prism 3.0. Se estimaron los parámetros: concentración efectiva 50 (CE50), efecto máximo, efecto mínimo y pendiente de Hill. **Resultados** (media $\pm$ ES): E17G redujo, en forma concentración dependiente, acCLF (CE50: 53 $\pm$ 1  $\mu$ M) y acGMF (CE50: 53 $\pm$ 2  $\mu$ M). G tuvo efecto preventivo, desplazando significativamente las curvas (acCLF, CE50: 108 $\pm$ 2  $\mu$ M; acGMF, CE50: 97 $\pm$ 1  $\mu$ M, p<0.05). La presencia de G no afectó los otros parámetros de las curvas concentración/respuesta. **Conclusión:** G previene el efecto de E17G sobre la función de Bsep y de Mrp2, por lo tanto, se puede hipotetizar que la elevación de niveles plasmáticos de G sería de utilidad terapéutica, ya que se requerirían concentraciones plasmáticas mayores de E17G para producir colestasis.

### SISTEMA CARDIOVASCULAR III

**0409. (0436) EL AYUNO PREVIO (AY) PRESERVA LA RELACIÓN TISULAR GLUTATIÓN REDUCIDO/GLUTATIÓN OXIDADO (GSH/GSSG) Y AUMENTA LA ACTIVIDAD DE LA GLUCOSA-6-P-DESHIDROGENASA (G6PDH) EN CORAZONES AISLADOS DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.** M González, MG Marina Prendes, N Pascale, C Garbini, E Savino, A Varela

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

Trabajos anteriores demostraron que el AY (24 h) mejora la recuperación funcional de corazones de rata sometidos a isquemia-reperfusión y previene parcialmente la transición de la permeabilidad mitocondrial sin afectar la viabilidad celular. La protección funcional se acompaña de una disminución en la producción isquémica de lactato sin modificaciones en la glucogenólisis, por lo que no se puede descartar un desvío de la glucosa hacia la vía de las pentosas. Sobre esta base y debido a que la G6PDH –enzima clave de la vía de las pentosas– contribuye al mantenimiento de un entorno citosólico reducido, fenómeno que aumenta la resistencia a los daños ocasionados por la isquemia-reperfusión, se evaluó la actividad de dicha enzima en ambas condiciones metabólicas. Se exploró también si el AY preserva la relación tisular GSH/GSSG. Con la finalidad de evaluar el daño oxidativo, se midieron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) al finalizar la RP. Corazones perfundidos Langendorff provenientes de ratas alimentadas ad libitum o ayunadas 24 hs, fueron sometidos a 25 min de isquemia global flujo cero (I), y 30 min de reperusión (RP) (n=8/grupo). La estadística se realizó con ANOVA. Los corazones ayunados mostraron una mayor actividad de G6PDH tanto preisquémica como al finalizar la RP (preisquémica: AY: 2,45 $\pm$ 0,34 vs AL 1,45 $\pm$ 0,28 mU/mg proteínas, p<0,05; fin de RP: AY: 2,25 $\pm$ 0,36 vs AL: 1,01 $\pm$ 0,34 mU/mg proteínas, p<0,05). Los niveles de GSH/GSSG fueron también mayores en ayunadas (preisquémica: AY: 46,76 $\pm$ 6,58 vs AL: 16,30 $\pm$ 4,29, p<0,05; fin de RP: AY: 24,58 $\pm$ 5,98 vs AL: 7,92 $\pm$ 1,7 p<0,05). Los TBARS fueron menores en AY al finalizar el experimento (fin de RP: AY: 15,57 $\pm$ 2,20 vs AL: 20,75 $\pm$ 2,10 nmol/gh, p<0,05). Los resultados sugieren que la mayor actividad de la

enzima clave de la vía de las pentosas podría estar relacionada con la protección ejercida por el ayuno previo contra el atontamiento cardíaco, posiblemente mediante la preservación de los niveles de GSH/GSSG.

**0410. (0253) EL ATP EXTRACELULAR INDUCE CORRIENTES CATIÓNICAS NO SELECTIVAS EN LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA.**

N Enrique, S Salemm, A Rebolledo, P Martín, V Milesi

*GINFIV, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP*

Los receptores P2X pertenecen a la familia de receptores purinérgicos. Están formados por 3 subunidades que al agruparse constituyen un canal iónico del tipo catiónico no selectivo. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar la respuesta de las células de músculo liso de la arteria umbilical humana (AUH) a la aplicación de ATP extracelular. En estas células se ha descrito mediante RT-PCR la presencia de los receptores P2X1, P2X4 y P2X7. Mediante la técnica de patch clamp (célula entera) se midieron corrientes evocadas por la aplicación de ATP. El ATP 100  $\mu$ M produjo una corriente entrante (IATP) de 232  $\pm$ 56 pA con una tau de inactivación ( $\tau$ ) de 405  $\pm$ 59 ms (n=16) a un potencial de membrana de -50 mV y con una solución extracelular con 150 mM Na<sup>+</sup>, 2,5 mM Ca<sup>2+</sup> y 1,2 mM Mg<sup>2+</sup> (SE). La ausencia de Mg<sup>2+</sup> de la SE (modulador de este tipo de corrientes) no modificó la IATP evocada por la misma concentración de ATP (IATP: 173  $\pm$ 47 pA,  $\tau$  = 476  $\pm$ 69 ms; n=5). La suramina 100  $\mu$ M (bloqueante de varios tipos de receptores de ATP) inhibió parcialmente la IATP aumentando significativamente la cinética de inactivación (IATP en suramina: 68  $\pm$ 14 pA,  $\tau$  = 4146  $\pm$ 645 ms, n=8). La acción de suramina fue reversible (n=7). Al utilizar una solución extracelular sin Na<sup>+</sup> con 2,5 mM Ca<sup>2+</sup> y 1,2 mM Mg<sup>2+</sup>, en 7 de 8 células (89%) no se observó IATP. En 4 de estas células se ensayó la inmediata reposición de Na<sup>+</sup> y se observó en 3 de ellas la recuperación de la corriente obteniéndose así una IATP de 110  $\pm$ 25 pA y  $\tau$  = 158  $\pm$ 31 ms. Trabajando con una solución sin Na<sup>+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup> pero con 10 mM Ca<sup>2+</sup> en 3 de 6 células se observó una IATP de 77  $\pm$ 22 pA y  $\tau$  = 484  $\pm$ 51 ms. Concluimos que en las células de músculo liso vascular de AUH el ATP extracelular es capaz de inducir corrientes iónicas llevadas por Na<sup>+</sup> o por Ca<sup>2+</sup> que se inhiben por suramina y cuyas características cinéticas coinciden con aquellas producidas por la activación de receptores purinérgicos de tipo P2X1 en otros tipos celulares.

**0411. (0261) DESARROLLO DE FUERZA DEPENDIENTE DEL ESTIRAMIENTO Y DEL CALCIO EXTERNO EN LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA.** AR Roldán Palomo, L Rimorini, J Digiorge, MF Iveli, V Milesi

*GINFIV, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP*

Los estímulos de estiramiento de la pared vascular son capaces de modificar la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> en las células de músculo liso que la forman y modificar así el estado contráctil del vaso. El objetivo de este trabajo es caracterizar la respuesta contráctil inducida por el estiramiento en la arteria umbilical humana e investigar los mecanismos involucrados. Mediante la medición del desarrollo de fuerza isométrica en anillos vasculares intactos se estudió la respuesta frente a un estímulo mecánico variable en ausencia y en presencia de Ca<sup>2+</sup> externo. Se aplicó el estímulo de estiramiento en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y luego se agregó el Ca<sup>2+</sup> (2,5 mM) al medio extracelular. Los resultados mostraron que cuando se adiciona el Ca<sup>2+</sup> externo en condiciones control se produce un inmediato desarrollo de fuerza significativo en todos los casos ensayados, y que existe una correlación positiva y lineal entre el grado de estiramiento del anillo vascular (x) y la magnitud de la fuerza desarrollada (y) (y = 1,7x + 23,7; R<sup>2</sup> = 0,8; n=42), indicativo de que existe un influjo de Ca<sup>2+</sup> dependiente del grado de estiramiento de la pared del anillo vascular. Este protocolo se realizó en presencia y ausencia de sustancias inhibitorias de las estructuras que conocemos pueden mediar un

influjo de Ca<sup>2+</sup> en esta arteria. Utilizamos nifedipina 5  $\mu$ M (inhibidor de canales de Ca<sup>2+</sup>), gadolinio 200  $\mu$ M (inhibidor de canales catiónicos) y 5  $\mu$ M de KBR7943 (inhibidor del intercambiador Na/Ca en modo reverso). En presencia de estos tres inhibidores, la fuerza desarrollada disminuye significativamente, los datos presentan una mayor dispersión y la pendiente de la curva de correlación disminuye significativamente ( $y = 0,3x + 29,3$ ;  $R^2=0,5$ ;  $n=10$ ). Concluimos que en este vaso el estiramiento de la pared modula el desarrollo de fuerza en forma dependiente del Ca<sup>2+</sup> externo y que canales catiónicos no selectivos, el intercambiador Na/Ca y canales voltaje operados tendrían un rol importante en este mecanismo.

**0412. (0537) AUMENTO DE LA ACTIVIDAD DE MN SOD CITOSÓLICA EN ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN CORAZONES DE RATAS HIPERTENSAS ESPONTÁNEAS (SHR).**

S Mosca<sup>1</sup>, JC Fantinelli<sup>1</sup>, G Schinella<sup>2</sup>

*1 Centro de Investigaciones Cardiovasculares, 2 Cátedra de Farmacología, Fac. Cs Médicas, UNLP, Comisión de Investigaciones Científicas Pcia Bs As*

Trabajos previos establecen la importancia de la enzima superóxido dismutasa dependiente de Mn (MnSOD) en el proceso de isquemia-reperfusión miocárdica. Sin embargo, aún no se conoce cuál es su participación en ratas hipertensas espontáneas (SHR) adultas sometidas a dicho proceso. Para dar contestación a este interrogante corazones aislados de SHR y de ratas WKY usadas como controles normotensos, fueron asignados a los siguientes protocolos experimentales: I) los corazones fueron perfundidos durante 3 hs; II) después de un período de estabilización de 25 minutos los corazones fueron sometidos a un período de isquemia global de 35 minutos y 2 hs de reperfusión. Al final de la reperfusión se midió el tamaño del infarto a través de la tinción con sales de tetrazolio y se evaluó la contractilidad miocárdica a través de la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI). En otros corazones se determinó el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el contenido de glutatión reducido (GSH) y la actividad de MnSOD citosólica. El tamaño del infarto obtenido después de la isquemia-reperfusión y la PDVI fueron similares en las dos cepas ( $29 \pm 6\%$  y  $7 \pm 2\%$  para WKY y  $30 \pm 5\%$  y  $6 \pm 1\%$  para SHR, respectivamente). Las TBARS fueron similares en los dos protocolos, no observándose diferencias entre WKY y SHR. El contenido de GSH fue menor en las SHR comparado con las WKY ( $20 \pm 3$  vs  $30 \pm 3$   $\mu$ g/mg) y disminuyó en la isquemia-reperfusión en un porcentaje similar en ambas cepas. La actividad de MnSOD citosólica aumentó significativamente durante el protocolo II en SHR ( $51 \pm 6$  vs  $26 \pm 1$  mU/mg), no observándose cambios en las ratas WKY. Estos datos muestran que la actividad de MnSOD citosólica aumenta en respuesta a la isquemia-reperfusión en SHR, efecto que podría actuar como mecanismo protector contra el daño oxidativo producido por dicha situación experimental en esta cepa de ratas.

**0413. (0060) ASOCIACIÓN DE LA HIPERHOMOCISTEINEMIA Y EL POLIMORFISMO C677T DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA CON UN MAYOR RIESGO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN UNA POBLACIÓN DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES.** V Vanasco<sup>1</sup>, M Junco<sup>1</sup>, L Gariglio<sup>2</sup>, I Bañes<sup>2</sup>, M Potenzoni<sup>2</sup>, R Porcile<sup>2</sup>, O Fridman<sup>1,3</sup>

*1 Centro de Altos Estudios en Ciencias de la Salud. Universidad Abierta Interamericana, 2 Hospital Universitario. Universidad Abierta Interamericana, 3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*

Numerosas evidencias relacionan hiperhomocisteinemia con disfunción endotelial y proliferación de células musculares lisas, contribuyendo a elevar la presión arterial. Estudiamos en una muestra poblacional tomada al azar en tres centros de salud de la Ciudad de Bs As las frecuencias de la variante genética C677T del gen de la enzima remetilante Metilentetrahidrofolato Reductasa (MTHFR) y su correlación con homocisteinemia (tHcy) y otros factores de riesgo como hipertensión, tabaquismo, dislipemia, diabetes y anteceden-

tes familiares. **Métodos.** Se confeccionó un cuestionario y se extrajo sangre venosa. Criterios de exclusión: menores de 18 años e ingesta de vitaminas. El polimorfismo C677T se estudió por PCR-RFLP y tHcy en ayunas por quimio-luminiscencia. Estadística: test "t" Student y análisis de regresión logística. **Resultados.** Población compuesta por 44 varones y 94 mujeres entre 18 y 79 años. El 58% manifestó relación directa de familiares (padres, hermanos) y del entrevistado con diagnóstico de hipertensión, enfermedad coronaria, cerebrovascular, vascular periférica y demencia o deterioro cognitivo. La hipertensión arterial ocupó un 29,0% de los sujetos y las enfermedades vasculares el 11,1%. La tHcy fue en hipertensos (HT)  $10,6 \pm 3,0$   $\mu$ moles/L (40) y en normotensos (NT)  $8,9 \pm 3,3$  (98) ( $p=0,008$ ). Las frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo C677T no difirieron significativamente entre NT e HT. Sin embargo, considerando este polimorfismo y el índice de masa corporal (IMC) como variables independientes, el número combinado de sujetos con el alelo T (heterocigotas CT y homocigotas TT) fue significativamente mayor en HT con  $IMC < 30$  kg/m<sup>2</sup> que en NT con  $IMC < 30$  (OR=2.393, IC95%:1,323–4,329;  $p=0,002$ ). Conclusiones. En la población estudiada, la tHcy contribuye a la elevación de la presión arterial. La mutación C677T de la MTHFR está asociada a mayor riesgo de hipertensión si se descartan otros factores de riesgo como la obesidad. PIP 02402.

**0414. (0090) DIFERENTE EXPRESIÓN FENOTÍPICA DEL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA EN VARONES Y MUJERES DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES.** M Junco<sup>1</sup>, V Vanasco<sup>1</sup>, L Gariglio<sup>2</sup>, I Bañes<sup>2</sup>, M Potenzoni<sup>2</sup>, R Porcile<sup>2</sup>, O Fridman<sup>1,3</sup>

*1 Centro de Altos Estudios en Ciencias de la Salud. Universidad Abierta Interamericana, 2 Hospital Universitario. Universidad Abierta Interamericana, 3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas*

El polimorfismo C677T del gen de la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) se asocia con reducida actividad enzimática e incremento de la homocisteinemia (tHcy), factor de riesgo de enfermedades vasculares. Estudiamos en una población tomada al azar en tres centros de salud de la Ciudad de Bs As, las frecuencias de la variante genética C677T y su correlación con tHcy en ambos sexos. **Métodos.** Se extrajo sangre venosa. Criterios de exclusión: menores de 18 años e ingesta de vitaminas. El polimorfismo C677T se estudió por PCR-RFLP y tHcy en ayunas por quimioluminiscencia. Estadística: test "t" Student, ANOVA y análisis de regresión logística. **Resultados.** Población compuesta por 44 varones y 94 mujeres entre 18 y 79 años. La tHcy correlacionó positivamente con la edad en la población total, en varones y en mujeres mayores de 50 años. Los valores de tHcy en varones fueron  $11,0 \pm 3,6$   $\mu$ moles/L y en mujeres:  $8,8 \pm 3,0$  ( $p < 0,001$ ); El 41,3% presentó el genotipo C677C(CC), 48,6% el C677T(CT) y 10,1% el T677T(TT) y los valores de tHcy fueron para la población total:  $9,5 \pm 3,4$  y  $9,5 \pm 3,5$  (56) para CC,  $9,4 \pm 3,4$  (67) para CT y  $10,0 \pm 2,7$  (14) para TT ( $p > 0,05$ ). El número combinado de sujetos con el alelo T (heterocigotas CT y homocigotas TT) y tHcy del cuarto cuartil ( $> 10,99$   $\mu$ moles/L) fue significativamente superior respecto de los tres cuartiles inferiores, en la población total (OR=1,658; IC.95% 0,935-2,942;  $p=0,035$ ), altamente significativo en varones (OR=2,585; 1,447-4,615;  $p=0,001$ ) y no significativo en mujeres (OR=1,304; 0,738-2,304;  $p=0,186$ ). También en varones con tHcy del cuarto cuartil fue significativamente mayor la frecuencia del alelo T respecto de los tres cuartiles inferiores (OR=2,000; 1,102-3,628;  $p=0,009$ ). Conclusiones. En varones, el alelo T del polimorfismo C677T está asociado a hiperhomocisteinemia. La actividad estrogénica en mujeres explicaría las diferencias género-específicas observadas. PIP 02402.

**0415. (0468) EL PRECONDICIONAMIENTO ALIMENTARIO (PA) MEJORA LA RESPUESTA FUNCIONAL DE CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA (I) – REPERFUSIÓN (RP).** MM Jaitovich, C Sbarbati, MG Marina Prendes, E Savino, A Varela

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

El PA consiste en el acceso restringido a la comida durante dos horas fijas diarias, durante 3 semanas, lográndose una alternancia entre un estado anabólico (luego de la ingesta) y un estado catabólico (previo a la ingesta). Se generan así cambios hormonales para una optimización de la utilización de nutrientes durante el periodo restringido de la ingesta que eventualmente podría resultar ventajosa ante situaciones de estrés agudo como la isquemia. Aún no han sido investigados los efectos del PA sobre la recuperación funcional del corazón sometido a I-RP. El objetivo del presente estudio fue evaluar, si el PA afecta la respuesta funcional de corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a I global flujo cero (25min) - RP (30 min). Debido a que la glucosa-6-P-deshidrogenasa (G6PDH) —enzima clave de la vía de las pentosas— aumenta la resistencia a los daños ocasionados por la isquemia-reperfusión, se determinó también la actividad de la misma. La contractilidad se evaluó mediante el producto presión sistólica x frecuencia (PxF) y las velocidades de contracción y relajación ( $\pm$ dP/dt). La contractura, mediante la presión diastólica final (PDF). La G6PDH se midió por método cinético. La estadística se hizo con ANOVA (n=10). El PA mejoró la recuperación funcional pos-isquémica con respecto a ratas alimentadas ad libitum (C) (RP 10 min: PxF:  $38\pm 6$  vs  $13\pm 5\%$   $p<0,05$ , +dP/dt:  $70\pm 9$  vs  $43\pm 7\%$   $p<0,05$ , -dP/dt:  $83\pm 16$  vs  $40\pm 9$   $p<0,05$ ). También disminuyó la contractura post-isquémica: PDF:  $5,58\pm 3,15$  vs  $45,07\pm 6,53\%$   $p<0,01$  a los 5 min de RP. La preservación de la funcionalidad se acompañó de una activación de la G6PDH (30 min RP: C:  $1,31\pm 0,12$ , PA:  $2,43\pm 0,44$  mU/mgproteínas,  $p<0,05$ ). Los resultados demuestran que el PA mejora marcadamente la recuperación funcional pos-isquémica, efecto que se acompaña de una mayor actividad de G6PDH enzima que contribuye al mantenimiento de un entorno citosólico reducido, fenómeno que aumenta la resistencia a la injuria por isquemia-reperfusión.

**0416. (0475) INFLUENCIA DEL AYUNO EN LOS EFECTOS DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) EN CORAZÓN DE RATA SOMETIDO A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.** MM Jaitovich, C Sbarbati, MG Marina Prendes, E Savino, A Varela

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

Se evaluó la acción del PC sobre la recuperación funcional, la utilización de triglicéridos endógenos (TG), la actividad de glucosa-6-P-deshidrogenasa (G6PDH) y la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a isquemia global flujo cero (I) (25 min)-reperfusión (RP) (30 min). Se emplearon dos situaciones metabólicas —corazones provenientes de ratas alimentadas ad libitum (AL) y ayunadas 24 hs (AY)— con el fin de provocar cambios en el contenido y utilización celular de las reservas energéticas. El PC consistió en 6 ciclos de RP-I al finalizar la isquemia sostenida. La contractilidad se evaluó mediante el producto presión sistólica pico x frecuencia (PxF) y las velocidades de contracción y relajación ( $\pm$ dP/dt). La contractura mediante la presión diastólica final (PDF). La estadística se hizo con ANOVA (n=8/grupo). Coincidiendo con trabajos anteriores, el ayuno aceleró la recuperación contractil (RP 10 min, PxF (%):  $52\pm 10$  vs  $13\pm 5\%$   $p<0,01$ ). El PC mejoró la recuperación de PxF en AL ( $40\pm 5$   $p<0,05$ ), pero la retrasó en AY ( $21\pm 6$ ,  $p<0,05$ ). Los mismos efectos se observaron en  $\pm$ dP/dt. La PDF no fue modificada por el PC. El nivel preisquémico de TG ( $\mu$ mol/g ps) fue mayor en AY que en AL ( $2,56\pm 0,16$  vs  $1,65\pm 0,09$   $p<0,05$ ), pero no hubo diferencias en el consumo durante la I-RP (30 min RP: AY  $2,52\pm 0,11$ , AL  $1,93\pm 0,16$ ). El PC no modificó dicho consumo en AL (30 min RP:  $1,57\pm 0,1$ ), pero lo aumentó en AY (30 min RP:  $1,94\pm 0,18$   $p<0,05$ ). El PC no modificó la actividad de G6PDH en AY pero la aumentó en AL (30 min RP:  $2,11\pm 0,32$  vs  $1,01\pm 0,35$  mU/mg proteínas). La relación GSH/GSSG fue mayor en AL poscondicionadas al finalizar la RP ( $29,94\pm 4,48$  vs  $6,25\pm 1,35$ ). Los resultados indican que el PC ejerce efectos nocivos en corazones AY, los cuales se

acompañan de una estimulación del consumo de TG endógenos. Los efectos beneficiosos del PC sobre corazones AL se relacionan con estimulación de la G6PDH.

**0417. (0274) PARTICIPACIÓN DE LA NOS MITOCONDRIAL EN LA PERSISTENCIA DE LA CARDIOPROTECCIÓN CONFERIDA POR LA HIPOXIA HIPOBÁRICA CRÓNICA DURANTE LA DESACLIAMATIZACIÓN.** P La Padula<sup>1</sup>, J Bustamante<sup>2</sup>, A Czerniczyniec<sup>2</sup>, LE Costa<sup>1 2</sup>

*1 Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA, 2 Laboratorio de Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

En trabajos previos (J Appl Physiol 98:2363-2375, 2005), un aumento en la actividad de óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) cardíaca durante la aclimatización de ratas a hipoxia hipobárica fue asociado a la preservación de los parámetros contráctiles basales juveniles y de su recuperación luego de un episodio de hipoxia aguda en músculo papilar. Este efecto protector persistió por más de 5 meses (mo) una vez suprimido el estímulo hipóxico. En el presente estudio se analiza la participación de la mtNOS en el mecanismo involucrado. Se utilizaron ratas sometidas a 53.8 kPa en una cámara de hipopresión durante 5 mo e igual número de controles (C) a 101.3 kPa. A los 0.4, 2 y 5 mo de interrumpida la hipopresión se extrajo el corazón de 5 ratas de cada grupo y se aislaron mitocondrias del ventrículo izquierdo. En membranas submitocondriales (SMM) se determinó la producción de NO por el método espectrofotométrico de la oxihemoglobina y la expresión de nNOS, iNOS y eNOS por análisis de Western blot. La actividad de mtNOS fue 40% mayor en el grupo de 0.4 mo prehipóxico que en C ( $p < 0.01$ ) y declinó linealmente durante la desaclimatización, alcanzando un 50% (t1/2) a los 5.0 mo. La expresión de iNOS y de nNOS fueron asimismo 42 y 43 % mayores en las SMM del mismo grupo ( $p < 0.05$ ) y declinaron linealmente con t1/2 = 5.3 y 3.8 mo, respectivamente. El mejor ajuste ( $R^2 = 0.99$ ) entre la actividad de mtNOS y la tensión desarrollada (TD) por el músculo papilar (antes y después de la recuperación post-hipoxia) medida anteriormente, sustentó la hipótesis (J Appl Physiol, 2005) de una respuesta bifásica, con TD máxima a 0.66 nmol NO/min.mg proteína. El comportamiento similar de la actividad mecánica basal (t1/2 = 5.9 mo) y recuperación post-hipoxia (t1/2 = 5.3 mo) determinadas previamente y la actividad y expresión de mtNOS, sugiere que un aumento de esta proteína participa en el mecanismo involucrado en la memoria de la cardioprotección conferida por la aclimatización.

**0418. (0243) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA TRH POR AGENTES HIPERTROFICOS EN CULTIVOS DE FIBROBLASTOS CARDIACOS DE RATAS NEONATAS.** ML Schuman, V Copa, MS Landa, A Alvarez, CJ Pirola, SI García

*Cardiología Molecular- Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari - Facultad de Medicina- UBA.*

Describimos por primera vez la presencia de TRH y su receptor tipo I en miocitos y fibroblastos de ratas neonatas. A partir de estudios que muestran a los fibroblastos cardiacos (FC) no solo como formadores de la matriz, sino como capaces de transmitir estímulos directos a miocitos, analizamos si la estimulación por 24 y 72 hs con agentes hipertroficiantes, capaces de estimular la expresión de TRH en miocitos provocaban efectos a nivel de los FC. Realizamos cultivos de FC de neonatos de ratas macho Wistar, SHR y WKY estimulados con Fenilefrina (Phe) 1y 100  $\mu$ M o Inositol 3P 100 nM (libre de suero - 24hs) y cuantificamos la expresión de TRH y ANP mediante RT-real time PCR a partir del RNA total. Los corazones fueron digeridos con tripsina-colagenasa. Los FC se separaron por gradiente de percoll. La Phe provocó un aumento de la expresión del gen de TRH de 4 veces a las 24 y 72 hs ( $p < 0,001$ ), asimismo el IP3 provocó un aumento tiempo dependiente ( $p < 0,03$ ,  $n = 3$ ). Obtuvimos resultados similares en la expresión del gen de ANP bajo estas mismas condiciones y una correlación significativa con los niveles de la expresión del gen de TRH ( $r: 0,48$   $p < 0,04$ ). Finalmente analizamos la

expresión del gen de TRH bajo estos estímulos en FC de neonatos de SHR vs WKY. Sorprendentemente, en células de neonatos (donde aún no son evidentes las alteraciones a nivel cardíaco) encontramos un aumento de casi el 70% en el cultivo de SHR en la condición basal respecto de la WKY ( $p < 0,05$ ). Se observó un aumento de la expresión de TRH con Phe que fue dosis y tiempo dependiente solo en la cepa WKY ( $p < 0,001$ ), sugiriendo una incapacidad de los FC de SHR para responder a estos agentes. Demostramos por primera vez la regulación del gen de la TRH por agentes hipertrofiantes en FC de neonatos. La presencia y regulación de la TRH en FC plantea la posible participación en la fisiopatología cardíaca al estar aumentada en las SHR presentando un comportamiento diferencial frente a las WKY aun a la edad neonata.

**0419. (0259) EL ANTIPSICÓTICO ATÍPICO RISPERIDONA AFECTA EL ESTADO CONTRÁCTIL DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA.** F Ivelí, A Rebolledo, S Salemme, AR Roldán Palomo, V Milesi

*GINFIV, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP*

La risperidona es un antipsicótico atípico frecuentemente usado en el tratamiento de mujeres embarazadas esquizofrénicas, por lo cual tanto el feto como su sistema de circulación feto-placentaria estarían expuestos a esta sustancia. Esta droga es un potente antagonista de receptores de serotonina (5-HT), de histamina (tipo H1) y de dopamina (tipo DA2). Por otro lado, se vio que en miocitos cardíacos inhibe canales de K<sup>+</sup> rectificadores tardíos. Estas acciones podrían afectar el estado contráctil de los vasos del cordón umbilical y alterar el flujo feto-placentario. Nuestro objetivo fue, entonces, evaluar los efectos de la risperidona sobre el músculo liso vascular de la arteria umbilical humana (AUH) mediante experimentos de contractilidad en anillos vasculares que permiten evaluar el desarrollo de fuerza isométrica en respuesta a diferentes estímulos. Risperidona mostró un efecto relajante de las contracciones estables producidas por 5-HT 1  $\mu$ M a partir de una concentración de 0,03 nM (dosis ensayadas 0,003 a 300 nM; EC50 = 0,11 nM). Además risperidona (0,003 a 3000 nM) produjo una relajación de contracciones estables de histamina 0,1  $\mu$ M (EC50 = 120 nM, n=14). A su vez, los anillos pretratados con risperidona 300 nM no respondieron ni a 5-HT ni a histamina. Por otro lado, risperidona (300 nM) no produce ningún efecto cuando es agregada sobre una contracción estable inducida por una solución despolarizante de alto K<sup>+</sup> (80 mM de ClK) mientras que risperidona 3 nM produce una contracción significativa de 30,0  $\pm$  6,0% de la fuerza desarrollada por una solución despolarizante de alto K<sup>+</sup> 40 mM (n=6;  $p < 0,05$ ). Este efecto fue bloqueado por TEA 5 mM, un inhibidor inespecífico de canales de K<sup>+</sup>. Concluimos que en la AUH la risperidona a dosis terapéuticas antagoniza contracciones de 5-HT y de histamina y sería capaz de bloquear canales de K<sup>+</sup>, mecanismos que podrían afectar el estado contráctil de los vasos umbilicales y por ende el flujo a través de ellos.

**0420. (0260) ACTIVACIÓN DE CORRIENTES CATIÓNICAS NO SELECTIVAS Y DE CALCIO OPERADAS POR VOLTAJE POR SOLUCIONES HIPOTÓNICAS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO AISLADAS DE ARTERIA UMBILICAL HUMANA.** S Salemme, N Enrique, L Rimorini, A Rebolledo, V Milesi

*GINFIV, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP*

En distintos tipos celulares se ha demostrado que las soluciones hipotónicas extracelulares activan canales catiónicos no selectivos de tipo Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV). La activación de estos canales es mediada por el estiramiento de la membrana provocado por el hinchamiento celular. Nuestro objetivo fue indagar si en células aisladas de músculo liso vascular de la arteria umbilical humana el estiramiento de la membrana inducido por una solución hipotónica activa este tipo de canales. Se utilizó la técnica de patch-clamp en la configuración de célula entera. Se midieron corrientes iónicas evocadas por pulsos de

voltaje desde -50 mV hasta +90 mV con un potencial de mantenimiento de -50 mV. En las condiciones de control las células fueron expuestas a una solución extracelular (SE) isotónica (con 92 mM sacarosa) y a continuación, para provocar un shock hipotónico, a una SE sin sacarosa, generando un cambio de osmolaridad de 92 mOsm. La solución hipotónica aumentó de forma significativa la corriente catiónica no selectiva (ICNS control = -39,8  $\pm$  6,6 pA vs ICNS hipotónica = -82,6  $\pm$  9,1 pA, medida a -70 mV; n=12,  $p < 0,05$ ). La preincubación con rojo de rutenio 10  $\mu$ M, un inhibidor de los canales TRPV, suprimió completamente esta respuesta (n=8). Por otro lado, se observó que la solución hipotónica aumentaba de forma significativa una corriente de calcio operada por voltaje que previamente hemos caracterizado en estas células (24,8  $\pm$  4,6 % de aumento de la corriente pico medida a 0 mV; n=12,  $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren que un estiramiento de la membrana provocado por un shock hipotónico activa canales catiónicos no selectivos probablemente de tipo TRPV y canales de calcio operados por voltaje. Estos últimos podrían ser activados en forma directa por el estiramiento de la membrana o de forma indirecta a través de mecanismos inducidos por la activación de los TRPV. Nuestros próximos experimentos estarán dirigidos a analizar estas hipótesis.

**0421. (0271) LOS MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS RALOXIFENO Y GENISTEÍNA REGULAN EL CRECIMIENTO DEL TEJIDO VASCULAR.** M Sandoval<sup>1</sup>, P Cutini<sup>1,2</sup>, MB Rauschemberger<sup>1,2</sup>, S Benozzi<sup>1</sup>, C Alvarez<sup>1</sup>, V Massheimer<sup>1,2</sup>

*1 Cátedra de Análisis Clínicos II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur (UNS), 2 CONICET*

El raloxifeno (Rx) es un modulador selectivo del receptor de estrógeno (SERM) empleado en el tratamiento de la osteoporosis postmenopáusicas. La Genisteína (Gen) es un SERM de origen natural (fitoestrógeno) propuesto como alternativa terapéutica para los síntomas asociados al hipoestrogenismo postmenopáusico. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de Rx y Gen sobre la proliferación y migración de células endoteliales (CE) y células musculares lisas vasculares (CMLV) aisladas por cultivo primario de explantes de anillos de aorta de rata. Utilizando la técnica de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina observamos que 24 h de tratamiento con Rx (1 y 10nM) estimulan la proliferación de CE (75 y 90% s/control respectivamente,  $p < 0,001$ ). A mayor dosis del fármaco el efecto es inhibitorio. La incubación con el antagonista del receptor de estrógenos (RE) ICI 182780 1  $\mu$ M suprimió el efecto proliferativo de 10nM Rx (1,41  $\pm$  0,19 vs 2,51  $\pm$  0,23; 1,42  $\pm$  0,15 vs 1,54  $\pm$  0,18 cpmx10<sup>3</sup>/mg prot; control vs Rx -/+ ICI 182780, 24 h,  $p < 0,01$ ). En cultivos de CMLV demostramos que Rx inhibe la síntesis de DNA a todas las dosis ensayadas (1nM-1  $\mu$ M) (87-120% de inhibición,  $p < 0,001$ ). Respecto de Gen demostramos que, en CMLV, 24 h de tratamiento con el fitoestrógeno (10 nM) estimula marcadamente la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, siendo este efecto suprimido por el antagonista del RE (56,3  $\pm$  4,3 vs 154,1  $\pm$  8,7; 60,2  $\pm$  1,4 vs 58,5  $\pm$  2,1 cpmx10<sup>3</sup>/mg prot; control vs Gen, -/+ ICI 182780,  $p < 0,001$ ). En estudios de migración celular (revelado por tinción con hematoxilina-eosina), ambos SERM reducen significativamente la movilidad de las CMLV luego de 72 h de tratamiento con 10nM Rx o 10nM Gen. **Conclusión:** los resultados presentados muestran que Gen y Rx regulan, en forma dependiente de la participación del RE, la mitogénesis de los principales componentes celulares del lecho vascular (CMLV y CE). Ambos SERM inhiben la migración de CMLV, evento fundamental en la progresión de la una lesión vascular.

**0422. (0308) EFECTOS DE ATORVASTATINA EN ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO EXPERIMENTAL ATEROGÉNICO.** JI Facello<sup>1</sup>, MP Scribano Parada<sup>1</sup>, R Domínguez<sup>1</sup>, A Balceda<sup>1</sup>, A Ritzer<sup>1</sup>, L Flores<sup>1</sup>, P Pons<sup>2</sup>, M Moya<sup>1</sup>

*1 Cátedra Física Biomédica- FCM- UNCórdoba, 2 Centro Microscopía Electrónica-FCM-UNCórdoba*

Se ha demostrado la relación entre hiperfibrinogenemia (FP), estrés oxidativo y lesiones compatibles con aterogénesis. El objetivo del estudio fue valorar el efecto de la atorvastatina sobre FP y el estrés oxidativo en ratas con lesiones compatibles con aterogénesis. Se usaron 36 ratas machos cepa Suquia: A) control; B) Injurias múltiples por 60 días (IMx60 ds) y C) IMx60 ds+ Atorvastatina (0,04/mg/rata/día) durante 45 días. IM se generó en (B) y (C) por inyección de adrenalina (0,1 mL/rata/día). Se dosó en todos los grupos por espectrofotometría: FP (mg/dL), óxido nítrico (NO) (mM) y L-citulina (mM). Se evaluaron por microscopía electrónica (ME) cortes de aorta torácica para valorar la morfología mitocondrial del músculo vascular. Las variables cuantitativas se analizaron por ANOVA y las categóricas por Chi Cuadrado, se estableció una de  $p < 0,05$ . Los resultados de FP muestran que en el GII aumentó significativamente ( $370 \pm 52$ ) con respecto al GI ( $202 \pm 21$ ) ( $p < 0,0001$ ) mientras que los valores de GIII disminuyeron a valores control ( $205 \pm 21$ ). L-citulina mostró un aumento significativo en GII ( $6,73 \pm 0,38$ ) comparado con GI ( $5,57 \pm 0,90$ ) ( $p < 0,001$ ) disminuyendo significativamente en GIII ( $3,05 \pm 0,47$ ) ( $p < 0,001$ ). NO disminuyó significativamente en GII ( $4,85 \pm 2,38$ ) con respecto a GI ( $25,92 \pm 5,99$ ), mientras que GIII ( $19,88 \pm 3,63$ ) presento valores similares al control. ME mostró dilatación de espacio intermembranosos y desorganización de crestas en GII mientras que en GIII área y diámetro mitocondrial similar al control. Atorvastatina actuaría a nivel del endotelio, mejorando la disfunción endotelial y el proceso inflamatorio reflejado por el comportamiento del FP, estabilización de NO y disminución de niveles de L-citulina, produciendo regresión parcial de lesiones mitocondriales.

**0423. (0096) EFECTOS DE LA ROSUVASTATINA SOBRE EL TAMAÑO DE INFARTO Y LA ACTIVACIÓN DE MMP-2 EN CORAZONES DE CONEJOS NORMO E HIPERCOLESTEROLÉMICOS.** V D Annunzio<sup>1</sup>, L Erni<sup>1</sup>, V Miksztoiwicz<sup>2</sup>, B Buchholz<sup>1</sup>, M Donato<sup>1</sup>, G Berg<sup>2</sup>, R Wikinski<sup>2</sup>, L Schreier<sup>2</sup>, RJ Gelpi<sup>1</sup>, N Basso<sup>1</sup>

*1 Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, UBA, 2 Laboratorio de lípidos y lipoproteínas. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

Las estatinas son drogas hipolipemiantes, preservan la función endotelial, atenúan los procesos inflamatorios y reducen la mortalidad cardiovascular. Además, protegerían al miocardio de la injuria por isquemia/reperfusión. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la administración de rosuvastatina, durante la reperfusión, sobre el tamaño de infarto, la disfunción ventricular postisquémica y la activación de metaloproteasas de la matriz (MMP) en corazones de conejos normales e hipercolesterolémicos. Corazones aislados fueron perfundidos según la técnica de Langendorff y sometidos a 30 min de isquemia global seguidos por 120 min de reperfusión (G1). En G2 se repitió G1 pero se administró rosuvastatina (50µM) durante la reperfusión. En G3 y G4 se repitieron G1 y G2 respectivamente, pero los animales se alimentaron con una dieta rica en colesterol (1%) durante un mes. Se evaluó la presión desarrollada del VI (PDVI), y la presión diastólica final del VI (PDFVI, rigidez miocárdica). Se midió la actividad de MMP-2 por zimografía a los 2 y 5 min de la reperfusión. El tamaño de infarto se midió con trifeniltetrazolium. Colesterol basal:  $59,6 \pm 9,3$ , luego de 1 mes de dieta:  $185,4 \pm 21,4$  mg/dl ( $p < 0,05$ ). No hubo diferencias en la recuperación de la PDVI y la PDFVI en los grupos normocolesterolémicos. Por el contrario, la rosuvastatina atenuó la disfunción postisquémica en los grupos hipercolesterolémicos. \* $p < 0,05$  vs G1. # $p < 0,05$  vs G3. X±ESM

	MMP-2 (basal)	MMP-2 (2 minR)	MMP-2 (5 minR)	Infarto (%)
G1 (n=10)	100,0±0,0	88,2±12,2	63,7±18,3	16,6±2,6
G2 (n=10)	100,0±0,0	38,2±8,1*	27,3±10,6*	4,5±0,4*
G3 (n=10)	100,0±0,0	100,9±12,8	92,3±7,5	25,05±2,6*
G4 (n=8)	100,0±0,0	52,6±15,7#	68,2±17,5	5,5±1,6 #

La rosuvastatina, administrada durante la reperfusión, disminuye el tamaño de infarto en conejos normales e hipercolesterolémicos, y atenúa la disfunción ventricular postisquémica sólo en los animales hipercolesterolémicos. Además, disminuye la activa-

ción de MMP-2, la cual podría estar involucrada en su mecanismo de protección.

## REPRODUCCIÓN III

**0424. (0446) CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN OVÁRICA TEMPRANA EN RATONES TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA QUE DESARROLLA TUMORES DE OVARIO DE TIPO TERATOMA.** B González<sup>1</sup>, M Poutanen<sup>2</sup>, I Huhtaniemi<sup>3</sup>, R Calandra<sup>1,4</sup>, S Rulli<sup>1</sup>

*1 Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET, Buenos Aires, 2 Dto. de Fisiología, Universidad de Turku, Finlandia, 3 Imperial College London, Reino Unido, 4 IMBICE, La Plata*

La hipersecreción de hCG en ratones transgénicos (TG) induce la formación de tumores de ovario de tipo teratoma, que surgen de la activación espontánea de ovocitos y dan origen a diversos tejidos. El objetivo del presente trabajo fue identificar posibles alteraciones de la función ovárica en hembras TG en estadios previos a la formación del tumor. Se analizó: a) el perfil sérico de FSH y prolactina (PRL) por RIA; b) la morfología ovárica por histología clásica; c) la inmunolocalización de la enzima P450scc, marcador de esteroidogénesis por inmunohistoquímica; d) la expresión de genes marcadores del desarrollo folicular, ovulación, luteinización y esteroidogénesis por RT-PCR semicuantitativa, en ovarios TG y controles (WT) entre las 2 y 6 semanas de edad. A las 3 semanas, los niveles séricos de FSH fueron: TG:  $2,6 \pm 1,0$ , WT:  $12,6 \pm 1,1$  ng/ml ( $p < 0,05$ ), y de PRL: TG:  $186 \pm 42$ , WT:  $30 \pm 4$  ng/ml ( $p < 0,05$ ), sin cambios significativos a las 4 y 6 semanas. A las 2 semanas se detectó una mayor expresión del receptor (R) de LH y P450scc ( $p < 0,05$ ) en ovarios TG, e inmunomarcación positiva de P450scc en las células de la teca. A las 3 semanas, se observaron folículos antrales atrésicos, hipertrofia de la teca y luteinización prematura con inmunomarcación positiva para P450scc. Se detectó además un aumento en la expresión génica de los marcadores R-LH, P450scc, R-PRL, aromatasa, StAR y COX-2 ( $p < 0,05$ ). A las 4 semanas se observó la formación de quistes foliculares, y un aumento en la expresión de COX-2 ( $p < 0,05$ ). A las 6 semanas, el ovario TG sufrió una masiva luteinización y formación de cuerpos embrionarios, sin cambios en la expresión de marcadores ováricos. Estos resultados indican que el ovario TG es esteroidogénicamente activo desde edades muy tempranas, en concordancia con los signos de pubertad precoz en las hembras TG. Dichas alteraciones en el desarrollo folicular temprano podrían estar involucradas en la activación anormal del ovocito y posterior formación del teratoma.

**0425. (0233) EFECTO MODULADOR DE LA LEPTINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEASAS OVÁRICAS Y SUS INHIBIDORES TISULARES DURANTE EL PROCESO OVULATORIO DE LA RATA.** MG Bilbao<sup>1</sup>, MP Di Yorio<sup>1</sup>, SM Núñez<sup>1</sup>, AG Faletti<sup>1,2</sup>

*1 CEFYBO - CONICET, 2 Dto. Qca. Biológica, FCEyN - UBA*

La leptina, proteína codificada por el gen de la obesidad y sintetizada principalmente por el tejido adiposo, es capaz de ejercer efectos bifásicos sobre la función ovárica, dosis dependiente. Las metaloproteasas (MMPs) son enzimas que degradan la matriz extracelular y son activadas durante el desarrollo folicular y la ovulación. El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto de la leptina sobre la actividad de las principales MMPs ováricas (MMP2 y MMP9) durante el proceso ovulatorio. Para ello realizamos cultivos de explantes de ovarios de ratas inmaduras estimuladas con gonadotropinas en presencia de leptina (0,3-500 ng/ml). Por Western Blot (WB), se detectó la expresión de las MMPs de masa molecular relativa de 65 y 82 kDa correspondiente a las MMPs activas 2 y 9 respectivamente, y de 72 kDa correspondiente a la forma latente

inactiva de la MMP2. Como la leptina no modificó el contenido de ninguna de estas proteínas, estudiamos la actividad gelatinolítica de estas MMPs secretadas al medio de incubación por zimografía, utilizando gelatina como sustrato. Observamos que la actividad más abundante fue detectada para MMP9, pero la actividad de ambas MMPs aumentaron en presencia de bajas concentraciones de leptina cuya máxima respuesta fue obtenida con 10 ng/ml (MMP2: 92% y MMP9: 98%,  $p < 0.01$ ). Como la acción de estas enzimas está regulada por inhibidores tisulares (TIMPs), estudiamos el contenido proteico de estos inhibidores tisulares por WB. Detectamos la presencia de TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 correspondientes a las bandas de 31, 21 y 25 kDa, respectivamente. A su vez la leptina aumentó de 7 a 10 veces el contenido proteico de estos inhibidores, con máxima respuesta en presencia de 10 ng/ml de leptina ( $p < 0.01$ ), sin respuesta a mayores concentraciones. Estos resultados indican que la leptina podría estar activamente involucrada en la ruptura folicular por modular la actividad de las metaloproteasas ováricas y sus inhibidores tisulares.

**0426. (0489) LIBERACION DE CORTISOL IN VITRO EN DIFERENTES ESTRUCTURAS FOLICULARES OVÁRICAS DE BOVINOS, EN RESPUESTA A ESTIMULOS GONADOTRÓFICOS Y BETA ADRENÉRGICOS.** HH Ortega<sup>1</sup>, A Paredes<sup>2</sup>, NR Salvetti<sup>1</sup>, F Rey<sup>1</sup>, HE Lara<sup>2</sup>

*1 Cátedra de Biología Celular, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Santa Fe, ARGENTINA., 2 Laboratorio de Neurobioquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, CHILE.*

Se ha propuesto que las variaciones en los niveles intrafoliculares de cortisol, pueden influenciar la maduración folicular y la ovulación. En bovinos, la enfermedad quística ovárica (COD) es un importante desorden reproductivo en el que permanecen muchos interrogantes por ser resueltos en relación a los mecanismos que participan de su patogenia a nivel ovárico. Considerando que el estrés es uno de las posibles causas desencadenantes de esta enfermedad, nuestro objetivo fue estudiar la liberación de cortisol en tejidos ováricos como respuesta a estímulos gonadotróficos y beta adrenérgicos. Tejidos correspondientes a la pared de folículos antrales pequeños, antrales grandes y quísticos, se incubaron 2 horas con hCG y/o isoproterenol (estimulante beta adrenérgico). Los niveles de cortisol se determinaron en el medio de cultivo y en el líquido folicular mediante EIA. La secreción basal fue mayor en los folículos antrales grandes ( $0,031 \pm 0,004 \mu\text{g/ml}$ ) que en los pequeños ( $0,014 \pm 0,004 \mu\text{g/ml}$ ) e intermedia en los quistes ( $0,024 \pm 0,004 \mu\text{g/ml}$ ). La respuesta a la hCG fue mayor en los quistes ( $0,118 \pm 0,009 \mu\text{g/ml}$ ) que en los folículos antrales grandes ( $0,059 \pm 0,011 \mu\text{g/ml}$ ) y pequeños ( $0,024 \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$ ). Solamente se observó estimulación en la liberación mediada por el isoproterenol en los folículos pequeños ( $0,032 \pm 0,008 \mu\text{g/ml}$ ). No se evidenció efecto potenciador entre isoproterenol y hCG. En el líquido folicular, se hallaron niveles significativamente mayores de cortisol en los quistes ( $26,405 \pm 2,842 \mu\text{g/ml}$ ) que en los folículos antrales grandes ( $13,425 \pm 1,437 \mu\text{g/ml}$ ) y pequeños ( $8,473 \pm 0,727 \mu\text{g/ml}$ ). Podemos concluir que los folículos ováricos del bovino presentan la capacidad de liberar cortisol en respuesta a estímulos mediados por gonadotropinas, la que se encuentra aumentada en los folículos quísticos. Además, los folículos pequeños son capaces de responder a estímulos beta adrenérgicos, aunque esta capacidad se pierde en folículos de mayor tamaño.

**0427. (0255) LA CAPACIDAD ESTEROIDOGÉNICA DE LOS MACRÓFAGOS SOBRE EL OVARIO ES MODIFICADA EN RATA CON POLIQUISTOSIS OVÁRICA.** M Forneris, R Davicino, B Micalizzi, L Oliveros

*Departamento Bqca. y Cs. Biológicas. Facultad Qca, Bqca. y Farmacia. UNSL, 5700-San Luis. e-mail: mform@unsl.edu.ar*

Hemos mostramos con anterioridad que la respuesta esteroideogénica del ovario de rata con poliquitosis ovárica (SOP) se

modifica por el sobrenadante de los líquidos de cultivo (LC) de esplenocitos tratados con testosterona. En este trabajo se estudió en particular el efecto de los LC de macrófagos (Mφ) de bazo de ratas SOP, sobre la liberación de progesterona (P) y androstenediona (A) por el ovario SOP. La condición SOP fue inducida en rata de 60 días por una inyección i.m. de 2mg/rata de valerato de estradiol. Los quistes se observaron 60 días después, momento del sacrificio. Ratas controles (C) se sacrificaron en estro. Los Mφ del bazo fueron purificados por adherencia a las placas de cultivo en medio DMEM y se cultivaron ( $1 \times 10^6 \text{cél./ml}$ ) por 24 hs en DMEM, adicionado de suero fetal bovino inactivado a 48° C y antibióticos. Los sobrenadantes de sus LC fueron usados para estimular ovarios SOP incubados en baño metabólico y determinar los ng/mg ovario de P y A (por RIA) en el líquido de incubación. Los LC de Mφ SOP aumentaron la liberación de P ( $p < 0.001$ ) y disminuyeron la de A ( $p < 0.001$ ), respecto a los LC de Mφ C. En los Mφ SOP, la producción de óxido nítrico (ON) (nitritos por reacción de Griess) y TNF- $\alpha$  (kit ELISA) disminuyó ( $p < 0.01$ ), respecto a los C. La actividad fagocítica (zimozán nitro blue tetrazolium) y la enzimática lisosomal (ensayo de fosfatasa alcalina) no se modificó respecto a los Mφ C. Esta regulación inmunoendocrina a nivel periférico que afecta la liberación de P y A por el ovario SOP, se manifiesta en los Mφ de bazo con una disminución en la producción de TNF- $\alpha$  y ON, factores que intervienen en la esteroidogénesis.

**0428. (0581) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A ENDOSULFÁN ALTERA LA DIFERENCIACIÓN ORGANOGÉNICA DEL ÚTERO DE LA RATA.** S Boimvaser, J Varayoud, VL Bosquiazzo, M Muñoz-De-Toro, EH Luser

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

La diferenciación organogénica del útero se completa durante los primeros días luego del nacimiento, siendo este período crítico y altamente sensible a xenoestrógenos. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la exposición neonatal a endosulfán, pesticida de supuesta acción estrogénica y ampliamente utilizado en nuestro país, sobre la expresión de moléculas involucradas en la morfogénesis del útero. Ratas hembras Wistar fueron inyectadas (vía sc) con vehículo (Control), Endosulfán 6  $\mu\text{g/kg/día}$  (Endo 6) y 600  $\mu\text{g/kg/día}$  (Endo 600) los días postnatales (DPN) 1, 3, 5 y 7. Las dosis de endosulfán fueron seleccionadas por ser "ambientalmente relevantes". El DPN 8 se sacrificaron los animales y se diseccionaron ambos cuernos uterinos, uno fue incluido en parafina y el otro se utilizó para la extracción de ARN total. Se determinó por RT-PCR en tiempo real los niveles de ARNm de los genes Wnt5a, Wnt7a, Hoxa10 y Hoxa11. Por inmunohistoquímica se cuantificó la expresión de Receptor de Estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) y  $\alpha$  Actina de Músculo Liso ( $\alpha$ AML) en los distintos compartimentos celulares del útero. La exposición neonatal a Endo 6 y Endo 600 indujo una disminución significativa en la expresión de Hoxa10, Hoxa11 y Wnt5a, mientras que sólo Endo 600 disminuyó los niveles del ARNm de Wnt7a ( $p < 0.05$ ). Por inmunohistoquímica observamos que Endo 6 y Endo 600 aumentó significativamente la expresión del RE $\alpha$  en el miometrio, y que sólo el grupo Endo 600 presentó un aumento significativo en la expresión de  $\alpha$ AML ( $p < 0.05$ ). Estos resultados demuestran que la exposición neonatal a endosulfán desregula la expresión de moléculas que guían la diferenciación uterina postnatal. Estos cambios y los detectados en el miometrio, compartimento clave durante el parto y de especial importancia por la alta incidencia de tumores benignos (leiomiomas), podrían ser responsables de la creciente incidencia de patologías reproductivas.

**0429. (0846) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN MODELO IN-VITRO DE DECIDUALIZACIÓN DE CÉLULAS ENDOMETRIALES DE RATA.** D Maschi<sup>1</sup>, G Vallejo<sup>1</sup>, R Maronna<sup>2</sup>, V Yoahi<sup>3</sup>, B Miguel<sup>4</sup>, P Saragüeta<sup>1</sup>

*1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET, 2 Departamento de Bioestadística, Universidad*

Nacional de La Plata, 3 Instituto Superior del Cálculo, FCEyN-UBA, 4 Centro de Regulación Genómica, Barcelona.

La deciduización es el proceso de diferenciación que da como resultado la transformación del estroma del endometrio en la decidua. Los cambios morfológicos y de expresión génica que experimenta el endometrio durante este proceso son necesarios para la implantación embrionaria. **Resultados** previos de nuestro laboratorio muestran que las células UIII, células de estroma de endometrio de rata, en cultivo adquieren una morfología y un patrón de expresión de marcadores de deciduización compatible con lo observado in-vivo. Con el objetivo de caracterizar el perfil de expresión génica durante la deciduización in-vitro en células UIII utilizamos la técnica de microarray (15K NIA cDNA microarray). El análisis de los datos reveló 459 genes diferencialmente expresados en forma significativa ( $FDR > 0,005$ ). Para validar los datos obtenidos analizamos la expresión de 8 genes por RT-PCR (Tspan5, Tetraspanin5; Eef1a1, eukaryotic elongation factor 1, alfa 1; Fstl1, follistatin like protein 1; PrlR, Prolactin receptor; Ovgp1, oviductal protein1; Gja1, Gap Junction Protein alpha 1; Suv39h1, Suppressor of variegation 3-9 homolog1 and Myst3, MYST histone acetyltransferase 3) obteniéndose para todos ellos un resultado similar al obtenido en el microarray. Los datos obtenidos fueron analizados por medio de herramientas computacionales (Onto-Express, <http://vortex.cs.waynw.edu/projects.html>) permitiéndonos identificar 12 genes relacionados con el proceso de diferenciación, de los cuales 9 (Tetraspanin5, Tspan5; Amino-terminal enhancer of split, Aes; Bone morphogenetic protein 1, Bmp1; Forkhead box N4, Foxn4; Guanine nucleotide binding protein, alpha 12, Gna12; THO complex 5, Thoc5; Epimorphin, Epim; Enhancer of Zeste homolog 2, Ezh2 and Drebrin 1, Dbn1) no han sido descritos anteriormente en deciduización. El comportamiento en el microarray de los 3 restantes (Wilms tumor homolog, Wt1; Prolactin Receptor, PrlR; FK506 binding protein 4, Fkbp4) coincide con lo descrito en bibliografía, mostrando la validez de nuestro modelo experimental.

#### 0430. (0395) EL IGF II MODULA EL CRECIMIENTO FETAL Y LA EXPRESIÓN DE LA LIPASA ENDOTELIAL PLACENTARIA

V White<sup>1</sup>, A Jawerbaum<sup>1</sup>, R Higa<sup>1</sup>, G Desoye<sup>2</sup>, U Hiden<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción y Metabolismo CEFyBO CONICET UBA, <sup>2</sup> Department Obstetrics and Gynaecology Frauenklinik Austria.

El factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 2 (IGF II) posee propiedades mitogénicas. Modelos experimentales que no expresan IGF II son más pequeños y livianos, mientras que aquéllos que lo sobreexpresan presentan aumento de peso con respecto a sus controles. Diversas enzimas, canales específicos y proteínas transportadoras regulan a nivel placentario el pasaje de nutrientes al feto en desarrollo. En la transferencia lipídica materno-fetal se encuentran involucradas lipasas específicas, destacándose dos enzimas clave: la lipoproteína lipasa (LPL) y la lipasa Endotelial (EL). Los objetivos de este estudio fueron estudiar los efectos de la administración fetal de IGF II sobre el crecimiento del feto y la expresión placentaria de lipasas. **Métodos:** Ratas preñadas fueron operadas en los días 19, 20 y 21 de preñez, y sus fetos inyectados los días mencionados con IGF II (2 o 0.02 ng) o con solución salina. Los fetos fueron removidos mediante operación cesárea en el día 21 de preñez. Se pesaron los fetos, las placentas y los órganos fetales. El tejido placentario se procesó para luego analizar la expresión génica de LPL y EL a través de RT-PCR. **Resultados:** La administración de IGF II indujo un incremento en el peso fetal en un 10% ( $p < 0,05$ ) comparado con los controles, como así también de varios órganos fetales como el hígado ( $p < 0,05$ ), riñones ( $p < 0,05$ ), páncreas ( $p < 0,01$ ), intestino ( $p < 0,01$ ) y estómago ( $p < 0,001$ ) sin afectar el peso de pulmones y corazón fetal, ni incrementar el peso placentario. La expresión placentaria de LPL no fue afectada mientras que la expresión de EL se incrementó en un 147% ( $p < 0,01$ ). **Conclusión:** IGF II promueve el crecimiento fetal y de algunos pero no todos los órganos fetales. La placenta no incrementa en peso, pero la expresión de EL aumenta, probablemente contribuyendo a una

mayor transferencia lipídica al feto, y por lo tanto sustentando el efecto mitogénico de IGF II.

#### 0431. (0484) ESTUDIO DEL BALANCE PROLIFERACIÓN/APOPTOSIS EN ESTRUCTURAS FOLICULARES DE BOVINOS CON ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE. HH Ortega, ML Stangaferro, NR Salvetti, D Arcangelo, MM Palomar

Cátedra de Biología Celular, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. Esperanza, Santa Fe, ARGENTINA.

En bovinos, la enfermedad quística ovárica (COD) es un importante desorden reproductivo. En su patogenia participan mecanismos endócrinos pero también existen componentes locales a nivel ovárico entre los que se ha mencionado una alteración en los mecanismos de proliferación/muerte celular. Por ello, nuestro objetivo fue estudiar la proliferación y la apoptosis en los ovarios de vacas con enfermedad quística inducida experimentalmente. La COD fue inducida mediante la administración de ACTH y como controles se utilizaron animales en estro. Sobre muestras de tejido ovárico se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para detectar Ki-67 y la técnica de TUNEL para identificar células en apoptosis y se cuantificaron los porcentajes de marcación en granulosa (G), teca interna (TI) y teca externa (TE). El índice de proliferación observado en los folículos terciarios de los animales controles ( $G=36,89 \pm 2,44\%$ ;  $TI=23,22 \pm 3,13\%$ ;  $TE 22,56 \pm 3,87\%$ ) fue significativamente mayor que en los folículos terciarios de los animales tratados ( $G=13,5 \pm 2,4\%$ ;  $TI=12,73 \pm 1,97\%$ ;  $TE 5,25 \pm 1,07\%$ ) y que en los folículos atrésicos tanto de los controles ( $G=6,33 \pm 1,5\%$ ;  $TI=2,33 \pm 0,33\%$ ;  $TE 5,0 \pm 1,86\%$ ) como de los tratados ( $G=1,25 \pm 0,48\%$ ;  $TI=3,25 \pm 0,63\%$ ;  $TE 4,25 \pm 1,03\%$ ). La proliferación en los quistes inducidos fue similar a la observada en los folículos atrésicos ( $G=1,25 \pm 0,75\%$ ;  $TI=4,75 \pm 0,85\%$ ;  $TE 5,03 \pm 1,22\%$ ). Con respecto a la técnica de TUNEL, se evidenció una alta marcación en los folículos atrésicos de los animales controles ( $G=8,25 \pm 2,25\%$ ;  $TI=3,75 \pm 0,85\%$ ;  $TE 1,25 \pm 0,25\%$ ) y tratados ( $G=21,5 \pm 5,56\%$ ;  $TI=3,25 \pm 0,62\%$ ;  $TE 1,50 \pm 0,29\%$ ) y no se hallaron células positivas en los folículos terciarios ni en los quistes. Los resultados indican que la pared de los quistes foliculares, muestra una baja actividad proliferativa y baja apoptosis, lo que implica que estas estructuras crecen lentamente y permanecen en una condición estática, lo que explicaría en parte su persistencia.

#### 0432. (0224) NORADRENALINA INHIBE EL EFECTO DE VIP Y SP EN GANGLIO CELÍACO SOBRE LA RESPUESTA DE PROGESTERONA Y ÓXIDO NÍTRICO POR EL OVARIO DE RATA. M Forneris, M Garraza, L Gatica, L Oliveros

Lab Biol Reprod., Facultad de Qca. Bqca. y Farmacia. Univ. Nac. de San Luis. 5700-San Luis. e-mail: mhg@unsl.edu.ar

En trabajos previos hemos mostrado en el sistema *ex vivo* Ganglio Celíaco (GC)-Nervio Ovárico Superior (SON)-ovario (O) que la liberación de Progesterona (P) por el O de rata Holtzman en Diestro 2 es estimulada por la adición de Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) o Sustancia P (SP) en el GC. Teniendo en cuenta la presencia de receptores para Noradrenalina (NA), VIP y SP en GC, en el presente trabajo estudiamos en dicho sistema el efecto de la presencia conjunta de NA con VIP o SP en el GC sobre la liberación de P. También se evaluó la respuesta de óxido nítrico (ON), involucrado en la funcionalidad del O. El GC fue incubado en buffer Krebs-Ringer sólo (condición basal) y con 50 ng/ml de cada péptido, con y sin  $10^{-6}M$ , en baño metabólico. La P fue determinada por RIA, el ON por reacción de Griess y la expresión de Oxido Nítrico Sintetasa inducible (iNOS) por Western blot. Análisis estadístico por ANOVA, una vía. El O del sistema GC-SON-O en condiciones basales libera 0.015, 0.027, 0.028 y 0.040 ng P/mg ovario, a los 30, 60, 120 y 180 min, mientras que la liberación de ON es constante (1,3  $\mu M/mg$  ovario). La adición de NA con VIP en GC, revierte ( $p < 0,001$ ) el aumento de P y la disminución de ON ( $p < 0,001$ ) ováricos inducidos por VIP solo. El

cambio en los niveles de ON liberado es acompañado por la expresión de iNOS en el O. SP sola no modifica el ON y la expresión de iNOS. La adición de NA con SP revierte el aumento de P inducido por SP y aumenta el ON ( $p < 0,001$ ) y la expresión de iNOS. El efecto inhibitorio de NA en GC sobre P predomina respecto al estimulador de VIP y SP, asociado a un incremento de ON.

**0433. (0348) AGONISTAS DIETARIOS DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES REGULAN EL METABOLISMO LIPÍDICO DE LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA EN RATAS SANAS Y DIABÉTICAS.**

E Capobianco, N Martínez, M Sosa, A Jawerbaum, E González

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo. CEFYBO-CONICET-UBA

Estudios previos realizados *in vitro* muestran la capacidad de agonistas de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) de regular el metabolismo lipídico feto-placentario. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga son ligandos de los PPARs. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar el metabolismo lipídico en la unidad feto-placentaria de ratas alimentadas con dietas suplementadas con aceite de oliva (AO) o aceite de cártamo (AC), los cuales contienen respectivamente 75% de ácidos grasos monoinsaturados y 75% de ácidos grasos poliinsaturados. **Métodos:** Ratas controles (C) y diabéticas por administración neonatal de estreptozotocina (90mg/kg) (D) fueron alimentadas con la dieta AO (6%) o con la dieta AC (6%) desde el 1º día de gestación. En el día 13.5 de gestación las ratas fueron sacrificadas y las placentas y fetos explantados. Los niveles de lípidos: ésteres de colesterol (EC), triglicéridos (TG), colesterol (COL) y fosfolípidos (FL) fueron analizados por TLC y densitometría. La síntesis *de novo* de lípidos fue evaluada mediante incorporación de  $^{14}\text{C}$ -acetato a lípidos. **Resultados:** el tratamiento con AC no modificó los niveles lipídicos en placentas ni fetos C. En ratas D, AC incrementó los niveles de EC (84%,  $p < 0,05$ ) y TG (66%,  $p < 0,01$ ) en la placenta y los niveles de FL (43%,  $p < 0,05$ ) en los fetos comparados con los niveles de la dieta con AO. AC disminuyó la síntesis de EC ( $p < 0,05$ ), COL ( $p < 0,05$ ) y FL ( $p < 0,05$ ) en placentas C (35%, 31%, 33%) y D (26%, 75%, 61%), mientras que esta dieta incrementó la síntesis de todas las especies lipídicas analizadas en fetos C ( $p < 0,05$ ) y la síntesis de EC (70%,  $p < 0,01$ ) y TG (184%,  $p < 0,01$ ) en fetos D. Conclusiones: el tratamiento con una dieta suplementada con ácidos grasos poliinsaturados, agonistas de PPARs, induce profundos cambios en el metabolismo lipídico que llevan a una mayor acumulación de lípidos en la unidad feto-placentaria de ratas diabéticas.

**0434. (0283) ESTÍMULO COLINÉRGICO GANGLIONAR MODIFICA LA LIBERACIÓN DE ESTRADIOL Y NITRITOS DESDE EL OVARIO DE RATA EN DIESTRO.** IC Capone, CD Bronzi, CJ Martínez, Z Sosa, AM Rastrilla

Lab. Biol. de la Reprod. (LABIR). Fac. Qca, Bqca. y Farmacia. Univ Nac. de San Luis. e-mail: zsosa@unsl.edu.ar

Trabajos previos avalan el concepto que el estado de excitabilidad neuronal en ganglio mesentérico superior, estaría en relación no sólo con cambios en la irrigación ovárica sino también con cambios cíclicos en la liberación de esteroides. El objetivo en este trabajo fue elucidar si la adición de acetilcolina (ACh  $10^{-6}$  M) en ganglio mesentérico superior (GMS) modifica la liberación ovárica de estradiol ( $\text{E}_2$ ) y nitritos (metabolito soluble del óxido nítrico) en un sistema *ex vivo*, ganglio mesentérico superior (GMS)-plexo nervioso ovárico (PNO)- ovario(O) de ratas en diestro I (DI) y diestro II (DII) previamente estandarizado. La incubación se realizó con y sin la presencia de ACh ( $10^{-6}$ M) en el compartimiento ganglionar. La liberación de  $\text{E}_2$  fue medida a los 15, 30, 60 y 120 min. por RIA y nitritos por el método de Griess en los mismos tiempos. Se utilizó Buffer Krebs-Ringer-bicarbonato pH 7.4 como medio de incubación y en baño metabólico a  $37^\circ\text{C}$ . Se aplicó el test de Student con una significancia de  $p < 0,05$  con respecto al control. La presencia de ACh en ganglio en DI, disminu-

yó la liberación de  $\text{E}_2$  en todos los tiempos ( $p < 0,001$ ), mientras los nitritos aumentaron a los 30 ,60 y 120 min. ( $p < 0,05$ ). En DII, ACh incrementó la liberación de  $\text{E}_2$  a los 30 y 60 min. ( $p < 0,001$ ) y nitritos disminuyó a los 15, 30 ( $p < 0,001$ ) y 60 min. ( $p < 0,05$ ). Los resultados muestran que el estímulo en el sistema nervioso periférico estaría involucrado en la liberación de estradiol ovárico y nitritos a través de la participación de receptores colinérgicos ganglionares vía plexo nervioso ovárico.

**0435. (0389) ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA EXPRESIÓN DE FMRP EN DISTINTOS ESTADIOS DEL DESARROLLO FOLICULAR EN OVARIO DE RATA.** I Ferder<sup>1</sup>, V Sundblad<sup>1</sup>, D Abramovich<sup>1</sup>, V Chiauszi<sup>1</sup>, F Parborell<sup>1</sup>, E Charreau<sup>1</sup>, M Tesone<sup>1,2</sup>, L Dain<sup>1,3</sup>

1 Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, 2 Departamento de química biológica, FCEyN, UBA, 3 Centro Nacional de Genética Médica, ANLIS

La falla ovárica prematura (FOP) es un síndrome muy heterogéneo de patogénesis multicausal que se caracteriza por amenorrea primaria o secundaria antes de los 40 años, hipoestrogenismo e hipergonadotropismo con distintos grados de atresia folicular. En los últimos años, un número cada vez más creciente de trabajos dan cuenta de la asociación entre el estado de premutación (amplificación de tripletes CGG entre 55 y 200 repeticiones) en el gen FMR-1 y FOP. Asimismo, es sabido que la proteína FMRP se expresa en varios tejidos incluyendo al ovario, si bien su función en el mismo no está establecida. No se conoce además, si existe expresión diferencial a lo largo del desarrollo folicular. El objetivo del trabajo fue estudiar la expresión de FMRP en distintos estadios del desarrollo folicular. La expresión de la proteína se analizó por Western-blot a partir de extractos enriquecidos en fracción ribosomal obtenidos de folículos previamente aislados, o bien por inmunohistoquímica (IHQ) a partir de cortes de tejido ovárico. Para los estudios se utilizaron ratas prepúberes, ratas que al destete fueron inyectadas por 3 días con una solución de DES (1mg/rata, ejemplares con ovarios inmaduros), o bien superovuladas con una dosis única de 25 UI/rata con PMSG (ejemplares enriquecidos en folículos preovulatorios). Se utilizaron entre 4 y 24 ovarios por tratamiento, y cada experimento se repitió al menos 2 veces. **Resultados** de los Western-blot estarían sugiriendo que ratas prepúberes no expresan FMRP, mientras que si se observa expresión en las ratas tratadas con DES y PMSG. Por otro lado, resultados de la IHQ confirman los obtenidos por Western-blot, observándose que los folículos preantrales no expresan la proteína, mientras que sí lo hacen los estadios más avanzados en el desarrollo folicular. Sólo se observa señal en células de granulosa en folículos preovulatorios. Estos resultados estarían indicando que FMRP se expresaría de forma diferencial de acuerdo al estadio folicular.

**0436. (0369) AGONISTAS DIETARIOS DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES DELTA MODULAN LOS NIVELES DE ÓXIDO NITRICO, PROSTAGLANDINAS I<sub>2</sub> Y E<sub>2</sub> EN EL EMBRIÓN DE RATA SANA Y DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGÉNESIS TEMPRANA.** R Higa, V White, J Fernandez, E González, A Jawerbaum

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, CEFYBO-CONICET-UBA.

La diabetes materna induce malformaciones embrionarias principalmente durante la etapa de organogénesis temprana. Trabajos previos han demostrado que la activación *in vitro* del receptor nuclear PPARdelta modula parámetros que se encuentran alterados en el embrión de rata diabética, tales como los niveles de prostaglandina  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) y el óxido nítrico (NO), ambos morfógenos durante el desarrollo embrionario. La prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ) y los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFFAs) son agonistas endógenos de este receptor nuclear. El **objetivo** del presente trabajo fue determinar si la administración dietaria de PUFFAs regulan los niveles de  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$  y NO en los embriones de rata sana (ES) y diabética (ED) durante la organogénesis

temprana. **Metodología:** Ratas sanas y diabéticas fueron alimentadas desde el día 0.5 al 10.5 de gesta con dieta estándar o suplementada con 6% de aceite de oliva (75% ácidos grasos monoinsaturados) o aceite de cártamo (75% PUFFAs). Se obtuvieron los embriones en el día 10.5 de preñez y se dosaron los niveles de PGE<sub>2</sub> mediante RIA, PGI<sub>2</sub> mediante EIA y los niveles de nitros-nitritos (índice de la producción de NO) mediante el ensayo de Griess. **Resultados:** Los niveles de PGI<sub>2</sub> se encuentran disminuidos en ED (54% p<0,05) en relación a EC, y la dieta enriquecida en PUFFAs incrementa los niveles de este agonista de PPARdelta tanto en EC (167% p<0,01) como en ED (57% p<0,05). ED posee bajos niveles de PGE<sub>2</sub> (42% p<0,05) comparado con EC, y el aceite de cártamo aumenta los niveles de dicha prostaglandina en EC (109% p<0,001) y ED (289% p<0,02). Los niveles de nitros-nitritos están elevados en ED (164% p<0,001) en relación al control, y la administración de aceite de cártamo revierte dicha anomalía (40% p<0,05). **Conclusiones:** La administración dietaria de PUFFAs que activan PPARdelta es capaz de revertir las anomalías en los niveles de prostaglandinas y la producción de NO embrionarias inducidas por la diabetes materna.

#### 0437. (0290) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS Y SUS RECEPTORES DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR EN LA RATA.

A Rodríguez Celín<sup>1</sup>, M Tesone<sup>1,2</sup>, F Parborelli<sup>1</sup>

1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina, 2 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina

La adquisición de un adecuado aporte vascular es probablemente un paso limitante en la selección y maduración del folículo dominante destinado a ovular. Mientras el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es el principal mediador en la angiogenesis; la maduración y la diferenciación de la red vascular, requiere de la acción coordinada de las angiopietinas (ANPT-1 y -2). El objetivo del presente estudio fue evaluar la presencia de marcadores angiogénicos durante los distintos estadios foliculares en el ovario de la rata inmadura. Se utilizaron ratas prepúberes y/o estimuladas con DES (diétilstilbestrol) o eCG para estudiar los distintos estadios foliculares (folículos preantrales, FP; folículos antrales, FAT; folículos preovulatorios, FPO). Se extrajeron los ovarios para inmunohistoquímica (IHQ) y para aislamiento de folículos por disección bajo lupa para western blot. Los resultados mostraron que los niveles proteicos de ANPT-1 aumentan en forma paralela a los niveles proteicos de su receptor Tie-2 a lo largo del desarrollo del folículo ovárico. En cambio, la expresión proteica de ANPT-2 permanece inalterable tanto en los FA como en los FPO. También se demuestra por primera vez que la expresión proteica de VEGF-R2, Flk-1, se acrecienta a lo largo del desarrollo folicular. Por IHQ, se observó que sólo las células tecales de los folículos expresan tanto ANPT-1 como su receptor Tie-2. La ANPT-2 y el VEGF se expresan tanto en células de la teca como en células de granulosa. Por otro lado, el receptor para VEGF, Flk-1, se expresa sólo en células de la teca en los FP pero en ambos tipos celulares en los FA y FPO. En conclusión, este es el primer trabajo que describe la presencia y localización de los principales factores angiogénicos que intervienen en el sistema ANPT/Tie-2 en el ovario de la rata durante todo el desarrollo folicular.

#### 0438. (0403) AGONISTAS DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES $\alpha$ (PPAR $\alpha$ ) MODULAN EL METABOLISMO LÍPIDICO Y NITRÍDÉRICO EN LA PLACENTA DE RATA CONTROL Y DIABÉTICA. N Martínez, E Capobianco, DF Do Porto, A Jawerbaum, E González

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo. CEFYBO-CONICET-UBA. Buenos Aires, Argentina

La diabetes en la gestación induce alteraciones de desarrollo y función placentaria. Se observan estrés oxidativo y nitrosativo,

y anomalías en el metabolismo lipídico placentario. El receptor nuclear PPAR $\alpha$  regula procesos anti-inflamatorios y modula diversas vías del metabolismo lipídico en diferentes tejidos. El objeto de este estudio fue evaluar si agonistas de PPAR $\alpha$  regulan los niveles de lípidos, la producción de óxido nítrico y la peroxidación lipídica en tejido placentario de rata sana y diabética. **Metodología:** La diabetes es inducida por administración neonatal de estreptoizotocina (90 mg/kg). Explantes placentarios obtenidos en el día 21 de gestación se incuban en presencia o ausencia de agonistas de PPAR $\alpha$ , LTB<sub>4</sub> (0.1  $\mu$ M) y clofibrato (20  $\mu$ M), para luego determinar: 1) los niveles de distintas especies lipídicas mediante TLC, revelado y cuantificación por densitometría, 2) la producción de NO mediante el dosaje de nitros/nitritos y 3) la peroxidación lipídica mediante la determinación de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARs). **Resultados:** Tanto LTB<sub>4</sub> como clofibrato reducen los niveles placentarios de colesterol (p<0.05, 53%), triglicéridos (p<0.01, 35%) y ésteres de colesterol (p<0.05, 57%). Dichos agonistas reducen los niveles de nitros/nitritos (p<0.05) tanto en placenta control (51%) como diabética (47%). En la placenta de rata sana, la activación de PPAR $\alpha$  no modifica los niveles de TBARs. En la placenta diabética, donde la peroxidación lipídica se encuentra incrementada en relación al control (p<0.01, 108%), la adición de clofibrato reduce los niveles de TBARs (p<0.01, 68%). **Conclusiones:** Se evidencia la capacidad de PPAR $\alpha$  de regular el metabolismo lipídico placentario, así como de controlar la producción de NO y la peroxidación lipídica, agentes que están incrementados y que generan daño placentario en la diabetes materna.

## ONCOLOGÍA V

#### 0439. (0333) EFECTO *IN VITRO* DE COMPUESTOS $\beta$ -ADRENÉRGICOS EN LA LÍNEA TUMORAL MAMARIA HUMANA MDA-MB-231. C Pérez Piñero, A Bruzzone, L Castillo, I Luthy

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

Previamente describimos un efecto proliferativo de agonistas  $\alpha_2$ -adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas y murinas. El rol de los compuestos  $\beta$ -adrenérgicos aún no había sido completamente elucidado. El objetivo de este trabajo fue analizar su efecto *in vitro* en la línea tumoral mamaria humana MDA-MB-231. Se realizó inmunofluorescencia en microscopio confocal con anticuerpos específicos comerciales. Para el ensayo de proliferación, se incubaron las células con el compuesto adrenérgico en medio suplementado con 2% SFBA, con cambios de medio cada 24 hs durante 3 días. El último día se agregó la Timidina tritiada. Las células se cosecharon y se contó la radiactividad en un contador Beta. Por inmunofluorescencia en microscopio confocal detectamos tinción positiva para  $\beta_2$ -RA y  $\alpha_{2B}$ -RA en estas células. Al analizar el efecto del ligando endógeno epinefrina (EPI), se observó un efecto estimulador significativo de la incorporación de [<sup>3</sup>H]-Timidina. Por ejemplo: EPI 0.1 nM: 124,3 $\pm$ 8,2% respecto del control (p<0.05) y 1 nM: 138,7 $\pm$ 7% (p<0.01). Considerando que la EPI se une a  $\beta_2$ -RA y  $\alpha_2$ -RA, utilizamos entonces el agonista  $\beta$ -adrenérgico isoproterenol (ISO) para elucidar este efecto. En este caso también se observó una estimulación del crecimiento celular estadísticamente significativa. Ejemplos: ISO 10 nM: 133,6 $\pm$ 7,7% respecto al control (p<0.05); ISO 100 nM 151,6 $\pm$ 5,4% (p<0.01). Por otro lado, al bloquear la acción de EPI sobre los receptores  $\beta$ -adrenérgicos utilizando el antagonista  $\beta$  propanolol, no se observó una reversión del efecto sobre la proliferación. Este hecho podría deberse a que los  $\alpha_2$ -RA también median un efecto proliferativo. A partir de estos resultados se puede concluir que en las células MDA-MB-231 tanto los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos poseen efectos mitogénicos. Este efecto es opuesto a otras líneas celulares, en las que los receptores  $\alpha_2$ -RA estimulan y los  $\beta_2$ -RA inhiben la proliferación celular.

**0440. (0456) QUIMIOTERAPIA COMBINADA CON DESMOPRESINA (DDAVP) EN MODELOS PRECLÍNICOS MURI-NOS DE CÁNCER MAMARIO Y COLÓNICO.** GA Hermo, GV Ripoll, MJ Krzymuski, S Girón, DE Gómez, DF Alonso

*Universidad Nacional de Quilmes*

DDAVP es un análogo peptídico sintético de vasopresina con propiedades hemostáticas, profibrinolíticas y antimetastásicas. Hemos demostrado que DDAVP promueve una acción antiangiogénica y que su aplicación perioperatoria aumenta la sobrevida en un ensayo clínico veterinario en caninos con cáncer mamario. En este trabajo, investigamos la acción antitumoral de DDAVP en combinación con quimioterapia en los modelos F3II de carcinoma mamario y CT26 de adenocarcinoma colónico en ratones singénicos Balb/c. Se inocularon 200.000 células F3II en el espacio subcutáneo o 15.000 células CT26 por vía intraesplénica. Los animales portadores de F3II se trataron con 3 a 4 ciclos semanales intraperitoneales de carmustina (20 mg/kg) o paclitaxel (25 mg/kg), mientras que los portadores de CT26 recibieron 5-fluorouracilo (25 mg/kg). La administración de 2 dosis endovenosas de 2 ug/kg de DDAVP, 30 min antes y 24 hr después de cada ciclo, mejoró los resultados de la quimioterapia ya que contribuyó a contener la infiltración local del tumor mamario F3II residual en los animales que recibieron carmustina y a reducir las metástasis en pulmón en los que recibieron paclitaxel (Paclitaxel:  $6.6 \pm 3.8$  versus Paclitaxel plus DDAVP:  $2.3 \pm 0.9$  nódulos/ratón;  $p < 0.05$  U test). Por otro lado, el tratamiento con 2 dosis de DDAVP 30 min antes y 24 hr después de la inoculación de células CT26 redujo la implantación tumoral en bazo (Control:  $1.54 \pm 0.16$  versus DDAVP:  $0.66 \pm 0.14$  gr/bazo;  $p < 0.001$  t test). Sin embargo, no se encontró mayor acción antitumoral del 5-fluorouracilo al combinarse con DDAVP. Estos datos preclínicos ratifican el potencial de DDAVP como terapia adyuvante en cáncer mamario, en este caso combinada con drogas quimioterápicas convencionales. En el modelo de cáncer colónico, si bien DDAVP por sí sola reduciría la implantación de las células tumorales, no fue posible demostrar una acción beneficiosa del péptido al combinarse con quimioterapia en las condiciones experimentales ensayadas.

**0441. (0315) ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UN COMPUESTO PEPTÍDICO INHIBIDOR DE LA CASEÍNA KINASA 2 (CK2) SOBRE CÉLULAS TRANSFORMADAS POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (HPV).** FR Benavent Acero<sup>1</sup>, Y Perera<sup>2</sup>, SE Perea<sup>2</sup>, BE Acevedo<sup>2</sup>, DF Alonso<sup>1</sup>, DE Gomez<sup>1</sup>, HG Farina<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina, 2 Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.*

La CK2 es una serina/treonina kinasa involucrada en la fosforilación de un conjunto de substratos intracelulares que modulan expresión génica, crecimiento celular y apoptosis. Su sobre-expresión está asociada al desarrollo de cáncer pulmonar y otras variantes tumorales y, además, CK2 es capaz de activar a la oncoproteína viral E7 en células infectadas por HPV. Previamente demostramos que el péptido cíclico denominado P15-Tat (compuesto CIGB-300) se une al dominio ácido de CK2 y bloquea su actividad, provocando una acción proapoptótica y regresión tumoral al ser administrado en forma intralesional en ratones. En este trabajo, se estudió el efecto antitumoral sistémico de P15-Tat y la actividad antiangiogénica, como también su biodistribución y penetrabilidad celular. Cinco dosis diarias intravenosas de P15-Tat (20 mg/kg) causaron una reducción significativa del crecimiento de tumores subcutáneos inducidos en ratones atímicos hembra (nu/nu) por células HeLa de adenocarcinoma cervical humano (Control:  $40.5 \pm 7.1$  mm<sup>3</sup> versus P15-Tat:  $5.3 \pm 2.2$  mm<sup>3</sup>, al día 28 posttratamiento;  $p < 0.05$ ). La marcación radiactiva de P15-Tat con Tc99 mostró una máxima captación en los tumores 4 horas después de la inyección sistémica. Los estudios de penetrabilidad se realizaron mediante técnicas fluorescentes, encontrándose una rápida internalización del péptido en células HeLa cultivadas en

presencia de dosis de 100 µM. Por otra parte, P15-Tat (20-100 µM) fue capaz de inhibir in vitro la formación de cordones vasculares por células endoteliales humanas HUVEC ( $p < 0.01$ , ANOVA test). El uso de microarreglos para estudiar la expresión de genes asociados a apoptosis y angiogénesis (GEArray) mostró descensos en los niveles de ARNm de AKT1, VEGF, PDGF y MMP-2 en células HeLa tratadas con P15-Tat. Los resultados ratifican la actividad antitumoral del compuesto peptídico P15-Tat en células transformadas por HPV y muestran un adecuado perfil de penetrabilidad celular y biodistribución en ratones.

**0442. (0612) ESTUDIOS RADIOBIOLÓGICOS EN UNA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER INDIFERENCIADO DE TIROIDES (CIT) PARA LA APLICACIÓN DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT).** M Crivello<sup>1</sup>, M Perona<sup>1</sup>, S Thorp<sup>1</sup>, E Pozzi<sup>1</sup>, M Casal<sup>2</sup>, R Cabrini<sup>1</sup>, GJ Juvenal<sup>1</sup>, MA Pisarev<sup>1,3,4</sup>, MA Dagrosa<sup>1,4</sup>

*1 CNEA, 2 Instituto Roffo, 3 Facultad de Medicina-UBA, 4 CONICET*

BNCT se basa en la reacción nuclear  $^{10}\text{B}(\text{n}, \alpha)^7\text{Li}$ . En estudios previos demostramos la efectividad de esta terapia para el tratamiento del CIT utilizando 10BPA borofenilalanina y 10BOPP (2,4-bis (dihydroxyethyl)-deutero-porphyrin IX). En este trabajo evaluamos in vitro el efecto antiproliferativo y la formación de micronúcleos, como mecanismos de daño inducidos por BNCT. Además calculamos los factores de efectividad biológica relativa del haz de neutrones (RBE) y de los compuestos borados utilizados (CBEs). Estos factores son utilizados para expresar la dosis física absorbida en la unidad que utiliza la radioterapia convencional. Las células de la línea de CIT humano (ARO) fueron distribuidas en los siguientes grupos: 1) BPA (10 ppm) + neutrones; 2) BOPP (10 ppm) + neutrones; 3) neutrones; 4) gamma. La irradiación fue realizada con el haz de neutrones del RA3 (flujo: 7.5 109n/cm<sup>2</sup> seg) y con 60Co (1Gy/min) de manera de obtener dosis físicas entre 1-5 Gy ( $\pm 10\%$ ). Se observó una respuesta dependiente directamente de la dosis hasta los 2.5 Gy. A esta dosis la frecuencia de células binucleadas con micronúcleos (MNCB), indicador del % de células con daño cromosómico, fue: 67 (g. 1), 63.32 (g. 2), 60.2 (g. 3) y 50.6 (g. 4), mientras el número de micronúcleos por célula binucleada (MN/CB), marcador del número promedio de lesiones cromosómicas por célula fue: 1.98 (g. 1), 1.56 (g. 2), 1.48 (g. 3) y 1 (g. 4). El % CB, indicador del efecto antiproliferativo fue significativamente menor para el grupo 1 (g.1 Vs. g.4  $p < 0.01$ ). La irradiación con neutrones y boro mostró un aumento en el daño al ADN que fue mayor con BPA. El RBE del haz y los CBEs fueron calculados para los parámetros MNCB y MN/CB y los resultados obtenidos fueron los siguientes, RBE: 2 y 3.4; CBE del BPA: 10.9 y 17.9; CBE del BOPP: 2 y 4.8 respectivamente. Los factores calculados serán de utilidad para la dosimetría en estudios clínicos.

**0443. (0629) DIFERENCIACIÓN ANTIGÉNICA EN CÉLULAS CLONOGÉNICAS (STEM) DE MELANOMA HUMANO.** M Aris<sup>1</sup>, AI Bravo<sup>2</sup>, AP Wunderlich<sup>3</sup>, E Levy<sup>3</sup>, M Bianchini<sup>3</sup>, E von Euw<sup>1</sup>, M Barrio<sup>3</sup>, M Rodríguez Zubieta<sup>1</sup>, J Mordoh<sup>1,3</sup>

*1 Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires, 2 HIGA Eva Perón, San Martín, Provincia de Buenos Aires, 3 Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA, Ciudad de Buenos Aires*

El modelo de crecimiento y diferenciación aceptado para tejidos normales es el de una pirámide invertida, en cuyo vértice se encuentran las células stem, con capacidad de autorenovación y de generación de una progenie mayoritariamente diferenciada. Hay evidencia de que dicho modelo sería extrapolable a los tumores, implicando que sólo la eliminación total de las células stem tumorales (CST) conllevaría a la erradicación tumoral. El objetivo de este trabajo fue investigar si los antígenos (Ags) de diferenciación melanocítica MelanA/Mart-1 y gp100, utilizados frecuentemente como inmunógenos en vacunas terapéuticas, se hallan presentes en las CST de melanoma humano. Se utilizaron como

modelo dos líneas celulares, MEL-XY1 y Mel-XY3, asimilando operacionalmente las células clonogénicas a las CST. Se aislaron bajo microscopio colonias provenientes de células con capacidad de crecimiento independiente de anclaje, por medio del ensayo en agar blando. El número de colonias desarrolladas es de alrededor del 5% de las células sembradas, lo que descartaría la presencia de factores parácrinos que afecten el crecimiento de las CST. Se estudió la proliferación celular en las colonias mediante un pulso de bromodeoxiuridina e inmunocitoquímica (ICQ), y la expresión de los Ags por ICQ y PCR en tiempo real. Se comprobó que las células proliferantes se ubican principalmente en la periferia de las colonias, disminuyendo su proporción al aumentar el tamaño de las mismas. Las colonias expresan los Ags MelanA/Mart-1 y gp100 en forma heterogénea, detectándose colonias con expresión total, parcial o nula de los mismos. Estos resultados sugieren que: i) la expresión de MelanA/Mart-1 y gp100 no bloquea la capacidad clonogénica de las CST de melanoma; ii) existen subpoblaciones de CST que no expresan dichos Ags pero que poseen capacidad proliferativa. Estos hallazgos poseen profundas implicancias para la comprensión de los mecanismos de diferenciación e inmunoterapia en melanoma humano.

**0444. (0341) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOSO RESISTENTES AL TRATAMIENTO FOTODINÁMICO CON ME-ALA.** NB Rumie Vittar<sup>1</sup>, El Yslas<sup>1</sup>, IM Fernández<sup>1</sup>, A Zamarrón<sup>2</sup>, E Carrasco<sup>2</sup>, F Sanz-Rodríguez<sup>2</sup>, VA Rivarola<sup>1</sup>

*1 Departamento Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina, 2 Departamento Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España.*

Uno de los tumores epiteliales más comunes son los carcinomas de células escamosas (CEEs). La Terapia Fotodinámica (TFD) constituye una modalidad terapéutica que se emplea principalmente para el tratamiento de tumores pequeños y superficiales. Debido a la accesibilidad de la piel a las fuentes de luz, la TFD posee un amplio potencial en el campo de la dermatología. No obstante, uno de los problemas tanto de la TFD como también de otras terapias, es la aparición de células resistentes las que serían responsables de las recidivas y procesos metastáticos. Los objetivos del presente trabajo fueron: (1) obtener poblaciones celulares resistentes a tratamientos repetidos de TFD con el derivado metilado del 5-ALA (Me-ALA) en células de carcinoma escamoso de piel humana (SCC-15); (2) caracterizar las células resistentes, en comparación con las parentales, analizando la localización de protoporfirina IX, y la organización y expresión de proteínas de adhesión celular; (3) estudiar la implicancia de survivina y Pgp en la resistencia adquirida. Para generar poblaciones resistentes las células SCC-15 se trataron con TFD (1mM Me-ALA durante 4 h y luego 15 min de irradiación con luz roja). La protoporfirina IX (microscopía de fluorescencia) presentó diferente patrón de localización entre células parentales y generaciones resistentes. En cuanto a proteínas de adhesión, se observaron cambios en la distribución y expresión de E-cadherina, b-catenina, vinculina. Además, se evidencian un incremento en la expresión de proteínas relacionadas con resistencia, Pgp y survivina (inmunofluorescencia indirecta, Western blot). **Conclusión:** respecto a los resultados obtenidos, el posible mecanismo de resistencia se podría deber a la participación de proteínas de resistencia a multidroga (Pgp) y proteínas anti-apoptóticas (survivina). Las características de las líneas resistentes proporcionan información que permite mejorar la eficacia y las aplicaciones del Me-ALA en dermatología clínica.

**0445. (0584) BÚSQUEDA DE MARCADORES DE DESARROLLO TUMORAL EN MELANOMA: UN ENFOQUE PROTÉOMICO DE TIPO BOTTOM-UP.** MR Girotti<sup>1</sup>, M Fernández<sup>2</sup>, JP Albar<sup>2</sup>, JA López<sup>3</sup>, E Camafeita<sup>3</sup>, OL Podhajcer<sup>1</sup>, AS Llera<sup>1</sup>

*1 Fundación Instituto Leloir- IIBBA, CONICET, Buenos Aires, 2 Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, 3 Centro Nacional de Investigaciones Cardiológicas, Madrid*

SPARC es una proteína de matriz extracelular involucrada en remodelamiento de tejidos, angiogénesis y agresividad tumoral. A pesar de que se sabe que la expresión de SPARC está aumentada en numerosos tipos de tumores, todavía no se conocen a ciencia cierta los mecanismos moleculares modificados por SPARC que conducen al desarrollo tumoral. Nuestro laboratorio ha decidido encarar la búsqueda de dichos intermediarios mediante el análisis proteómico de una línea celular de melanoma humano, MEL-LES cuyos niveles de expresión de SPARC han sido modulados mediante el uso de ARNi. Se estudiaron mediante electroforesis bidimensional diferencial (DIGE) las proteínas secretadas por las líneas derivadas de MEL-LES que denominamos LBLAST (control) y L2F6 (clon celular cuya expresión de SPARC ha sido disminuída un 80%). Mientras LBLAST provoca el crecimiento de tumores en ratones nude, el clon L2F6 no desarrolla tumor. El análisis DIGE de los medios condicionados de las mencionadas líneas arrojó un total de 98 proteínas diferencialmente expresadas en ambas líneas, con una significación estadística de 0.05 calculada por el test T de Student. Dichas proteínas, identificadas por huella peptídica mediante espectrometría de masas, mostraron una importante proporción de proteasas extensamente asociadas con invasión y metástasis tumoral. La validación técnica de algunas de estas proteínas mediante Western blotting confirmó las diferencias observadas. Estos resultados definen un set de proteínas potencialmente relacionadas al desarrollo tumoral mediado por SPARC. Más aún, estudios preliminares de migración celular indican que SPARC afectaría la progresión tumoral a través de al menos una de las proteasas cuya expresión es modificada por SPARC. En la actualidad estudiamos la posibilidad de que un conjunto de proteínas modificadas por SPARC pueda ser usado como marcadores de estadios de evolución tumoral en biopsias de melanoma.

**0446. (0046) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA PRODUCIDOS POR LA 2'-NITROFLAVONA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PULMÓN.** MG Cárdenas<sup>1</sup>, D Pfeifer<sup>2</sup>, VC Blank<sup>1</sup>, MN Marder<sup>1</sup>, U Martens<sup>2</sup>, LP Roguin<sup>1</sup>

*1 IQUIFIB (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina, 2 Departamento de Hematología/Oncología, Universidad de Friburgo, Alemania*

En trabajos previos demostramos que el flavonoide sintético 2'-nitroflavona (2'-NF) inhibe eficientemente el crecimiento de células de tumor mamario y de cuello uterino. Puesto que el cáncer de pulmón de células no pequeñas es generalmente resistente a la quimioterapia, en el presente estudio decidimos evaluar el efecto antitumoral de la 2'-NF en una línea de células grandes derivadas de cáncer de pulmón humano (NCI-H460), utilizando como control fibroblastos humanos normales (HK-1). Los valores de IC<sub>50</sub> estimados a partir de curvas dosis-respuesta revelaron que la 2'-NF inhibió selectivamente el crecimiento de las células NCI-H460 (IC<sub>50</sub> 8±3 µM), sin afectar la proliferación de células no neoplásicas HK-1 (IC<sub>50</sub> > 80 µM). Asimismo, por ensayos de citometría de flujo, comprobamos que la 2'-NF incrementó la población sub-G1 de células NCI-H460 luego de 48 h de incubación (26% células tratadas vs 6% control). Con el propósito de explorar el mecanismo de acción del compuesto, se determinó mediante microarrays de cDNA el perfil de expresión génica de células incubadas 24h en presencia o ausencia de 2'-NF. Se detectaron 5733 genes expresados diferencialmente, de los cuales 942 participan en vías de señalización conocidas. El análisis de los resultados reveló un aumento en la expresión de genes involucrados en la inducción de apoptosis (ej, p53, caspasa 8, proteína proapoptótica Bcl-2L11) y una menor expresión de genes que participan en la regulación del ciclo celular (ej, quinasas dependientes de ciclinas y factores de transcripción E2F). En su conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la 2'-NF es un potente agente antitumoral que inhibe selectivamente el crecimiento de

células no pequeñas de cáncer de pulmón, sin afectar a células no neoplásicas. La alteración de la expresión de genes involucrados en la señalización de las vías apoptóticas y del ciclo celular sería responsable del efecto antitumoral del flavonoide.

**0447. (0342) EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL INTERFERON BETA (IFN-B) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE VEJIGA HUMANO T24.** C Lodillinsky, M Villaverde, E Sandes, L Finocchiaro, G Glikin, A Casabé, AM Eiján

*Instituto de Oncología "Ángel H Roffo" - UBA*

Los IFNs tipo I generalmente han sido utilizados como agentes antitumorales contra diferentes tipos de cáncer. El IFN-B es un inmunomodulador con propiedades citotóxicas contra tumores como el melanoma. BCG es una inmunoterapia efectiva para el carcinoma de vejiga in situ y el superficial de alto grado. Sin embargo existe un porcentaje importante de pacientes que es refractario al tratamiento. El mecanismo de acción, aunque no completamente conocido, implica una actividad inmunológica y un efecto directo sobre las células tumorales. Una de las causas por la cual los pacientes no tienen una respuesta satisfactoria a BCG sería la inmunosupresión local provocada por la célula tumoral. **Objetivo:** evaluar in vitro si el IFN-B mejora la actividad de BCG. **Materiales y métodos:** La línea celular de cáncer de vejiga humana T24, tratadas o no con BCG (1mg/ml) se lipofectan con el gen de INF-B y con el gen indicador B-gal. Por otro lado las células son tratadas con distintas concentraciones de INF-B o de INF-alfa recombinante humano en forma exógena con y sin BCG evaluándose: a) viabilidad por el método de MTS. Resembrando a igual número de células 24 h post transfección evaluamos b) apoptosis mediante coloración con naranja de acridina y bromuro de etidio y c) expresión de p53 por inmunofluorescencia. **Resultados:** Tanto el agregado exógeno de IFN-B como de IFN-alfa inducen inhibición del crecimiento en forma proporcional a la dosis y es potenciado por BCG 1mg/ml (% del control: INF-B 100 UI: 50+/-7 vs BCG+INF-B: 30±4, p<0.001; para INF-alfa 59±2 vs INF-alfa+BCG: 25±2 n=6, p<0.001 ANOVA, Tukey). En la transfección con el gen de IFN-B se observan tres veces más figuras necróticas post apoptosis comparado con el control, (CRL 1%; B-gal:22.7±5; IFN-B:63.6±5, n=4, t-Student p<0.001). Se observa también una concomitante expresión nuclear de p53. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento combinado con IFN-B podría mejorar la terapia con BCG.

**0448. (0527) EL TUMOR MIXTO LM38-LP GENERA UN ESTADO DE INMUNOSUPRESIÓN QUE PERMITE SU CRECIMIENTO IN VIVO.** MA Krasnapolski, E Bal de Kier Joffe, AM Eiján

*Área Investigación. Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"*

El adenocarcinoma mamario murino M38 está formado por varias subpoblaciones de células tumorales. Hemos generado la línea mixta LM38-LP (luminal y mioepitelial), la epitelioides LM38-HP y la mioepitelial LM38-D2. La línea LM38-HP, inoculada s.c. en ratones singéneos BALB/c, crece menos comparada con las LM38-D2 y LM38-LP. Sin embargo, es la línea que presenta la mayor velocidad de duplicación in vitro. Para evaluar si la disminución del crecimiento in vivo se debe a una interacción con el sistema inmune (SI) del huésped realizamos un ensayo de citotoxicidad in vitro. Enfrentamos por 24h células tumorales con esplenocitos (1:50) de ratones BALB/c portadores de tumores s.c. LM38-LP o LM38-HP (ELP y EHP), y estimamos su viabilidad con MTS. Los esplenocitos habían sido previamente sensibilizados in vitro durante 5 días con células tumorales homólogas formolizadas. LM38-HP fue más sensible que LM38-LP tanto a ELP (63,6% vs 52,8%, p=0,033) como a EHP (77,5% vs 60,5%, p=0,014). Observamos además que EHP fueron más citotóxicos que ELP para cualquiera de las células tumorales, sugiriendo que la línea mixta podría disminuir la respuesta inmune antitumoral. Utilizando un bioensayo medimos la actividad de TGFβ, un conocido regulador negativo del SI. Las LM38-D2 secretaron un 25% más de TGFβ total y un 50% más de TGFβ activo que las LM38-HP. Dado que el TGFβ puede inhibir la proliferación de linfocitos

(LT), evaluamos el crecimiento in vivo de LM38-HP en ratones atímicos nude comparado con inmunocompetentes BALB/c. La inoculación s.c. de 2x10<sup>6</sup> células mostró una mayor tumorigenicidad [6/6 (100%) vs 2/7 (28%) p<0,05, chi cuadrado] y velocidad de crecimiento [74 (42 – 254) mm3/día vs 0,07 [0,01 – 0,13] mm3/día p<0,01, K-W] en ratones nude que en BALB/c. La línea mixta LM38-LP presentaría un mecanismo de escape mediado posiblemente por la producción de TGFβ activo secretado principalmente por las células mioepiteliales que actuaría tolerizando a los LT.

**0449. (0539) EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA TIPO I (TGF-B) PROMUEVE EL DESARROLLO METASTÁSICO EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA MURINO DE PULMON.** PF Vázquez<sup>1</sup>, MJ Carlini<sup>1</sup>, LS Lauria<sup>2</sup>, ED Bal de Kier Joffé<sup>1</sup>, LI Puricelli<sup>1</sup>

*1 Instituto de Oncología Ángel H Roffo, 2 Dpto de Biodiversidad y Biología Experimental FCEyN (UBA)*

A pesar de su relevancia clínica, la metástasis es el aspecto menos conocido de la carcinogénesis. Trabajos recientes señalan que el tumor primario puede acondicionar el microambiente del órgano blanco de la metástasis mediante la secreción de factores específicos y la movilización de células de médula ósea (nichos premetastásicos). Anteriormente demostramos que el tratamiento de las células de carcinoma de pulmón murino LP07 con la citoquina TGFβ promueve la metástasis. Nuestro objetivo fue estudiar el rol de TGFβ en la formación de los nichos premetastásicos y analizar in vitro efectos biológicos asociados con el proceso metastásico. Células LP07 tratadas o no con TGFβ durante 24hs fueron inoculadas por vía i.v en ratones BALB/c (n=30). A los 7, 14 y 21 días postinoculación los ratones fueron sacrificados y los pulmones se procesaron para obtener cortes histológicos que se inmunomarcaron con anticuerpos anti fibronectina (FN) y anti receptor 1 de VEGF (VEGFR1). Por otro lado, se estudió en los medios condicionados de células LP07 tratadas o no con TGFβ la presencia de 1) citoquinas, utilizando un array de anticuerpos para 18 proteínas analizado por densitometría y 2) metaloproteasas por zimografía cuantitativa. En los cortes histológicos de pulmón se observó previo al desarrollo de las metástasis la formación de acúmulos de células mononucleares, algunas positivas para VEGFR1, alojadas en una matriz inmunomarcada para FN. Este evento se observó más tempranamente en los animales inoculados con células LPO7 tratadas con TGFβ (7 vs 14 días en los controles). In vitro el tratamiento con TGFβ aumentó 3,7 veces la secreción de la quimoquina RANTES con respecto al control (p<0,05) y la actividad de MMP-2 (tratado vs control, p<0,05). Concluimos que el TGFβ podría estimular la capacidad metastásica de las células LP07 a través de la inducción de cambios tempranos en el órgano blanco y la modulación de citoquinas y enzimas proteolíticas relevantes en el proceso invasivo.

**0450. (0634) LA PRESENCIA DEL RECEPTOR I DE TGFβ (TRANSFORMING GROWTH FACTOR B) SE ASOCIA CON MAL PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN NSCLC ESTADIO I.** PF Vázquez<sup>1</sup>, LV Mauro<sup>1</sup>, ML Dalurzo<sup>2</sup>, D Smith<sup>2</sup>, J Lastiri<sup>2</sup>, B Vasallo<sup>2</sup>, MG Pallota<sup>2</sup>, ED Bal de Kier Joffé<sup>1</sup>

*1 Instituto de Oncología Ángel H Roffo, 2 Hospital Italiano de Buenos Aires*

Actualmente, se considera que TGFβ tendría un rol dual y antagónico en cáncer, actuando como supresor tumoral en las etapas tempranas de la tumorigénesis y estimulando la progresión tumoral en etapas más avanzadas. Para ejercer su acción biológica TGFβ debe activar a sus receptores específicos TBR, siendo el tipo I fundamental para la transducción de la señal. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión de TBR1, mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de 56 tumores NSCLC de estadio EI (E1a n=22, E1b n=34) y correlacionar su expresión con las características histopatológicas del tumor, con la clínica del paciente al momento del diagnóstico y con la super-

vivencia global. Se encontró que 16/56 paciente muestran tinción específica para TBRI en más del 10% de las células tumorales. A estos tumores se los consideró positivos para el marcador. No observamos asociación estadísticamente significativa entre la expresión de TBRI y el sexo, la edad, el tipo histológico, el estadio (Ia vs Ib), el hábito de fumar o la presencia de células tumorales en el lavado pleural (test de Chi cuadrado y análisis de correlación). La curva de Kaplan-Meier mostró que la presencia de TBRI está asociada con una menor supervivencia global (Log Rank test: 4,64,  $p < 0,05$ ), así mientras que el 31,3% (5/16) de los pacientes cuyos tumores fueron TBRI positivo muere, sólo el 7,7% (3/39) TBRI negativo lo hacen. El estudio multivariado indicó que TBRI es una variable independiente, no asociada a ninguno de los parámetros pronósticos usados en la patología NSCLC. Por lo tanto, concluimos que la presencia de TBRI, en este grupo de pacientes NSCLC EI, podría considerarse un marcador pronóstico independiente, cuya presencia está asociada a una menor supervivencia global. Nuestros resultados apoyarían la noción que una vez instalado el tumor, las células tumorales reprograman su respuesta a la citoquina TGF $\beta$ , la cual estimularía la progresión tumoral.

**0451. (0419) EFECTO DEL CRECIMIENTO DEL FIBROSARCOMA MURINO MCC SOBRE EL SISTEMA INMUNE DEL PORTADOR. I. ALTERACIONES EN LAS CÉLULAS INMUNES PRESENTES EN LOS GANGLIOS DRENANTE Y DISTAL DEL TUMOR A LO LARGO DE SU DESARROLLO.**  
AF Maglioco, GV Camerano, J Mundiñano, G Camicia, J Bruzzo, RA Ruggiero, GI Dran

*ILEX CONICET*

En las primeras etapas de su crecimiento el MCC despierta una respuesta inmune antitumoral, que desaparece cuando el tumor avanza. Con el fin de profundizar en la interacción del tumor y el sistema inmune se estudiaron los ganglios a los 2, 15 y 35 días p.i tumoral, representando las fases de tumor no palpable (NP), inmunogénico (INM) y avanzado (AV). En el ganglio drenante del tumor el N° de células dendríticas (CDs) CD11c+ se cuadruplica a partir de NP y se mantiene elevado. En NP aumenta la expresión por célula (IFM) de las moléculas coestimuladoras CD40 (636 $\pm$ 97\* vs 450 $\pm$ 112 ct) y CD80 (228 $\pm$ 46\* vs 178 $\pm$ 35 ct). En INM y AV aumentan el porcentaje e IFM de células MHCII+ (255 $\pm$ 33\* y 279 $\pm$ 26\* vs 199 $\pm$ 51 ct), sin variación en CD40 y CD80. Dado que ello es indicativo de fenotipo tolerizante en las CDs, se les estudió la expresión de CD19, B220 e IL10. El % de células CD19+ aumenta significativamente en INM y AV (38,9 $\pm$ 6\*\* y 34,5 $\pm$ 6,8\*\* vs 16,7 $\pm$ 5,2 ct), al igual que B220. En las mismas fases aparece una población de células IL10+, confirmada por RTPCR. Se produjo aumento de linfocitos TCD4+ en NP ( $p < 0,01$ ) seguido de disminución. La proporción de células CD25+ aumenta en NP ( $p < 0,01$ ) e INM ( $p < 0,05$ ), mientras que la de Foxp3 aumenta en INM. El número de linfocitos TCD8+ aumenta en todos los estadios con un incremento en la IFM de CD44 en INM y AV ( $p < 0,01$ ). El N° de linfocitos B (CD19+/B220+) aumenta en todos los estadios, con mayor expresión de CD40 en NP y de MHCII en INM y AV. Por último, se detectó un marcado aumento de células GR1+ acompañando todo el desarrollo tumoral. Los datos sugieren que la implantación del tumor induce en su entorno activación de las CDs, y aumento y activación de linfocitos TCD4+ y B. Cuando el tumor está establecido (INM y AV) predominan los signos de inmunosupresión. Los mismos parámetros se estudiaron en ganglios distales: allí no se detecta la activación temprana, mientras que la inmunosupresión posterior tiende a manifestarse sistémicamente.

**0452. (0658) EFECTO ANTITUMORAL DEL CELECOXIB INDEPENDIENTE DE LA INHIBICIÓN DE LA CICLOOXIGENASA 2 SOBRE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS MURINOS.**  
GD Peluffo, SM Klein

*Instituto de Oncología Ángel H. Roffo*

La ciclooxigenasa 2 (COX-2) esta sobreexpresada en diversos tumores humanos y murinos. No obstante, los efectos antitumorales de los antiinflamatorios no esteroides (AINEs), inhibidores específicos o inespecíficos de esta enzima, parecen no depender en todos los casos de la expresión de COX-2. Las líneas celulares de adenocarcinomas mamarios murinos LM3 y LMM3 difieren en su expresión de la COX-2. No obstante, el celecoxib (cbx), un inhibidor específico de la COX-2, redujo el crecimiento sc de tumores de ambas líneas celulares (LM3:  $p < 0,001$ ; LMM3:  $p < 0,001$ ) y la formación de metástasis espontáneas ( $p < 0,001$  en ambos casos) y experimentales: mediana de 12 (0-31) vs 43 (9-61) en los controles. El cbx y su derivado, dimetilcelecoxib, que carece de actividad inhibitoria de la COX-2, inhibieron la viabilidad in vitro de células LM3 y LMM3 (DL50: 25 y 10  $\mu$ M respect.). EL agregado exógeno de prostaglandina E $_2$  no revirtió este efecto sobre la viabilidad. Ambas drogas incrementaron el número de células apoptóticas determinado por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo en las células LM3 (control: 3,6; cbx: 45,7; DMC: 43,8%). Por Western Blot se detectó un aumento de la forma fosforilada de la quinasa de estrés p38 y una disminución de los niveles de fosfo-Akt. La transfección con una dominante negativa de p38 revirtió parcialmente la reducción de la viabilidad por el tratamiento con cbx y DMC ( $p < 0,001$ , ambas) en las células LMM3. Lo mismo se obtuvo con la transfección de la forma constitutivamente activa de la PI3K ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  para el cbx y el DMC respect.). Ambas drogas (50  $\mu$ M) inhibieron la actividad basal del factor de transcripción NF $\kappa$ B en las células LM3 y LMM3 ( $p < 0,001$  en todos los casos). De la misma manera inhibieron la actividad por NF $\kappa$ B inducida por TNF $\alpha$  ( $p < 0,001$  a 25  $\mu$ M, para ambas drogas). En conjunto, estos resultados sugieren la independencia de la expresión de COX-2 para la acción antitumoral del cbx, modulando las vías de la PI3K/Akt/NF $\kappa$ B y p38.

**0453. (0225) LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE P38 ESTÁ INVOLUCRADA EN LA APOPTOSIS INDUCIDA POR INTERFERÓN- $\alpha$ 2B (IFN- $\alpha$ 2B) EN HEPATOCITOS PROVENIENTES DE HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA.** AD Quiroga, ML Alvarez, JP Parody, MT Ronco, DE Francés, CE Carnovale, MC Carrillo

*Instituto de Fisiología Experimental (CONICET) - Fac. de Cs. Bioq. y Farm. (Universidad Nacional de Rosario).*

En trabajos previos demostramos que el IFN- $\alpha$ 2b induce apoptosis en hígados preneoplásicos de ratas a través de la perturbación del estado redox celular. Esto induce al complejo enzimático NADPH oxidasa, lo que gatilla la síntesis y secreción de TGF- $\beta$ 1. Por otro lado, la Proteína Kinasa Activada por Mitógenos p38 es sensible al estrés citotóxico, como el estrés oxidativo, y juega un rol importante en la regulación de la supervivencia en distintos tipos celulares. El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de p38 en el mecanismo de apoptosis descrito. Para ello se realizaron cultivos de hepatocitos de ratas iniciadas-promovidas: a) sin tratar, b) con IFN- $\alpha$ 2b, c) con IFN- $\alpha$ 2b + ASC, d) con IFN- $\alpha$ 2b + anti-TGF- $\beta$ 1 y e) con IFN- $\alpha$ 2b + SB203580 (inhibidor de la vía de señalización de p38). Transcurridos distintos tiempos de cultivo se realizaron diferentes mediciones. Apoptosis (Annexina V-FITC): el tratamiento con IFN- $\alpha$ 2b indujo un aumento de la apoptosis del 150%\* ( $p < 0,05$ ). El co-tratamiento con SB203580 bloqueó dicho aumento. p-p38 (Western Blot): p38 se fosforila a los 30 min luego del tratamiento con IFN- $\alpha$ 2b, a la hora de cultivo vuelve a sus valores basales y a las 8 h 30 min vuelve a fosforilarse. Esta última fosforilación se inhibe cuando al medio de cultivo se agrega anti-TGF- $\beta$ 1. p47phox (Western Blot): la subunidad citoplasmática de la NADPH oxidasa migra hacia la membrana plasmática a los 20 min de cultivo con IFN- $\alpha$ 2b y se mantiene en el tiempo hasta las 15 hs. En presencia de anti-TGF- $\beta$ 1 la actividad de la enzima comienza a decaer hacia las 7 hs de cultivo. Estos datos sugieren que tanto el IFN- $\alpha$ 2b agregado al medio de cultivo como el TGF- $\beta$ 1 segregado por los hepatocitos inducen la activación (fosforilación) de la quinasa p38. Esta estaría involucrada en la decisión de muerte celular en los hepatocitos provenientes de hígados preneoplásicos.

## INMUNOLOGÍA VI

- 0454. (0494) LA INTERACCIÓN DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS CON FC $\gamma$ RII DE EOSINÓFILOS INHIBE LA PRODUCCIÓN DE DERIVADOS TÓXICOS DEL OXÍGENO. AP**  
Garro, LS Chiapello, JL Baronetti, DT Masih

*Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

La virulencia del hongo levaduriforme *Cryptococcus neoformans* puede estar relacionada con la supresión de la acción microbicida de derivados tóxicos del oxígeno (DTO) y del nitrógeno (NO) producidos por células del sistema inmune innato. Previamente hemos demostrado que eosinófilos (Eo) de rata son capaces de fagocitar levaduras de *C. neoformans* opsonizadas con un anticuerpo monoclonal anti-cápsula (AcM 2H1) y este fenómeno inhibe la producción de NO por estas células. El objetivo de este trabajo fue investigar si levaduras opsonizadas modulan la liberación de derivados tóxicos del oxígeno por eosinófilos y la participación del receptor de tipo II de la cadena  $\gamma$  de la inmunoglobulina G (Fc $\gamma$ RII) en este proceso. Eosinófilos peritoneales de ratas Wistar se purificaron mediante un gradiente de Percoll. Luego se los incubó con levaduras de *C. neoformans* sin opsonizar o preopsonizadas con el AcM 2H1, en ausencia o presencia de un anticuerpo bloqueante del Fc $\gamma$ RII, por 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Los niveles de DTO se determinaron por oxidación de luminol o 2,7 Diclorofluorescein diacetato y detección por quimioluminiscencia o análisis por citometría de flujo, respectivamente. Se pudo observar que los Eo en medio sólo muestran una alta producción basal de DTO y que *C. neoformans* opsonizado inhibe significativamente esta producción ( $p < 0,01$ ). Por otra parte, el bloqueo del Fc $\gamma$ RII revirtió completamente la inhibición de los DTO producido por las levaduras opsonizadas. Este trabajo demuestra que la interacción de *C. neoformans* con Fc $\gamma$ RII inhibe la producción de DTO en Eo. Estos resultados sugieren un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata inducido por *C. neoformans*.

- 0455. (0745) MECANISMOS INMUNOLÓGICOS INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE ARTRITIS REACTIVA EN RATONES DEFICIENTES EN TNFRP55 INFECTADOS CON YERSINIA ENTEROCOLITICA O:3.** RJ Eliçabe<sup>1</sup>, C García Samartino<sup>2</sup>, GH Giambartolomei<sup>2</sup>, MS Di Genaro<sup>1</sup>

*1 Inmunología. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis., 2 Laboratorio de Inmunogenética Hospital de Clínicas "José de San Martín". Universidad de Buenos Aires.*

La artritis reactiva (ARe) es una enfermedad reumática inflamatoria clasificada dentro de las espondiloartropatías que desarrolla luego de una infección distante, generalmente asociadas al tracto gastrointestinal o genitourinario. *Yersinia enterocolitica* es una bacteria Gram negativa que causa enteritis y es uno de los agentes infecciosos frecuentemente asociado a ARe, particularmente el serotipo O:3. En estudios previos demostramos que ratones TNFRp55<sup>-/-</sup> desarrollan ARe crónica luego de la infección oral con *Y. enterocolitica* O:3. El objetivo del presente trabajo fue estudiar mecanismos inmunológicos articulares que podrían participar en el desarrollo de ARe en estos ratones inmunodeficientes. Ratones C57BL/6 normales y TNFRp55<sup>-/-</sup> fueron infectados con  $5 \times 10^8$  ufc de *Yersinia*. Se evaluó score clínico de artritis, y se realizaron determinaciones de niveles de óxido nítrico (NO) por reacción de Griess, y cuantificación de TNF- $\alpha$  e IL-6 por ELISA. Se estudió la expresión de RNAm de genes regulatorios (IL-10 y TGF- $\beta$ ) por RT-PCR en articulaciones extraídas a diferentes tiempos post-infección (p.i.). El día 14 p.i., ratones TNFRp55<sup>-/-</sup> desarrollaron artritis severa ( $p < 0,006$ ) con baja producción de NO ( $p < 0,002$ ) y TNF- $\alpha$  ( $p < 0,006$ ), y mayores niveles de IL-6 ( $p < 0,04$ ). El día 21 p.i., el grupo deficiente mostró artritis progresiva ( $p < 0,018$ ) con altos niveles de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,01$ ). Ratones C57BL/

6 normales mostraron incremento progresivo en la expresión de RNAm de genes regulatorios (IL-10 y TGF- $\beta$ ). Interesantemente, ratones TNFRp55<sup>-/-</sup> mostraron down-regulación de TLR2 y TLR4 el día 21 p.i. En base a estos resultados concluimos que la deficiencia de TNFRp55 induce alteraciones en mecanismos de clarificación antigénica y de la respuesta inmune local que contribuirían al desarrollo de inflamación articular crónica.

- 0456. (0789) VARIACIONES EN LOS NIVELES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMACITOIDES EN NIÑOS HIV+ SOMETIDOS A TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL: SU CORRELACIÓN CON PARÁMETROS INDICATIVOS DE LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.** S Raiden<sup>1</sup>, E Gaddi<sup>1</sup>, J Balbaryski<sup>1</sup>, M Candy<sup>1</sup>, H Salomon<sup>2</sup>, J Geffner<sup>3</sup>

*1 Hospital General de Niños Dr Pedro de Elizalde, División Inmunología Clínica, 2 Centro Nacional de Referencia de SIDA (CNRS), 3 IIHEMA, Academia Nacional de Medicina*

Las células dendríticas plasmacitoides (CDp) desempeñan un papel relevante en la inmunidad antiviral gracias a su capacidad de secretar altas concentraciones de interferones de tipo I. Previamente demostramos que el porcentaje de CDp en sangre periférica se encuentra significativamente descendido en niños HIV+ menores de 7 años de edad, en relación a los controles sanos del mismo grupo etario. En el presente trabajo efectuamos un estudio longitudinal en 60 niños HIV+ para establecer una posible correlación entre %CDp, carga viral plasmática (CVp), número de LTCD4+ y presencia de procesos infecciosos. El período de seguimiento fue de 2 años y las determinaciones se efectuaron cada 4-6 meses. Las CDp se evaluaron por citometría de flujo (células CD11c+, CD123+, HLA DR+) y en cada muestra de sangre se analizó, simultáneamente, el % de LTCD4+ y la CVp. Todos los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento antiretroviral desde el diagnóstico de la enfermedad. Observaciones: 1) el %CDp mostró una correlación positiva con el % de LTCD4 en los niños HIV+ < de 7 años ( $p < 0,01$ ), pero no en los niños mayores; 2) se observó una correlación inversa entre el %CDp y la CVp ( $p < 0,01$ ) en los niños < de 7 años, pero no en los niños mayores; 3) consistente con lo descrito en la literatura, encontramos una correlación inversa en el número de LTCD4+ y la CVp, en ambos grupos etarios ( $p < 0,05$  y  $p < 0,001$ , para niños menores y mayores de 7 años, respectivamente; 4) la presencia de bajos niveles de CDp se asoció a una prevalencia incrementada de infecciones virales en ambos grupos etarios sugiriendo una participación relevante de las CDp en el control de infecciones virales en niños HIV+.

- 0457. (0852) LOS ESPERMATÓZOIDES SON CAPACES DE TRANSINFECTAR CÉLULAS DENDRÍTICAS CON HIV-1.** A Ceballos<sup>1</sup>, J Sabatté<sup>1</sup>, S Pasqualini<sup>2</sup>, C Quintans<sup>2</sup>, H Salomón<sup>1</sup>, J Geffner<sup>1</sup>

*1 Centro Nacional de Referencia para el SIDA (CNRS), 2 Instituto Médico Halitus*

La transmisión sexual del HIV-1 representa la principal vía de diseminación de la infección por HIV-1 y el semen representa su principal vector de diseminación. Considerando que la transmisión del HIV-1 a través de las mucosas se observa francamente favorecida en presencia de alteraciones de su integridad, y ya que estas alteraciones facilitarían el acceso de espermatozoides, conjuntamente con el HIV-1, a las células dendríticas (CDs) presentes en mucosas y submucosas, examinamos aquí si los espermatozoides eran capaces de transferir HIV-1 a CDs. Las CDs humanas fueron obtenidas por cultivo de monocitos por 6 días con GM-CSF +IL-4. Los espermatozoides fueron purificados por centrifugación sobre gradientes de Percoll. El HIV-1 BaL fue obtenido del NIH. Los niveles de antígeno p24 fueron determinados por ELISA. Observaciones: a) Los espermatozoides (200  $\mu$ l,  $2 \times 10^7$ /ml), se incubaron con HIV-1 (10 ng/ml de p24) por 2 h a 37°C, fueron luego lavados y se cuantificó la presencia de p24 inmediatamente o luego de 24 hs de cultivo. Se encontraron valores de p24/ml

de  $0.12 \pm 0.22$  y  $0.10 \pm 0.11$  ng/ml (media  $\pm$  ES, n=5), a las 2 y 24 hs de cultivo, respectivamente. No se observaron incrementos posteriores en los niveles de p24. En experiencias en paralelo observamos que la incubación de los espermatozoides expuestos al HIV-1 (en las condiciones especificadas), posteriormente lavados y enfrentados a CDs (200 ul,  $2 \times 10^5$ /ml), resultó en la infección de las CDs, evidenciada a los 7 días de cultivo, por los altos valores de p24 presentes en los sobrenadantes ( $28 \pm 6$  ng/ml, media  $\pm$  ES, n=5). Por último, encontramos que la presencia de plasma seminal, aún en diluciones tan altas como 1:1000, resultaba en una marcada inhibición (% inhibición superior al 80%), tanto en la captura del HIV-1 por los espermatozoides como en su transferencia a las CDs. Nuestros resultados sugieren un novedoso mecanismo por el cual la transmisión del HIV-1 a través de las mucosas podría ser regulado.

**0458. (0289) TRATAMIENTO SUBCUTÁNEO DE RATAS CON LEVADURAS MUERTAS POR CALOR DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS RESULTA EN ACTIVACIÓN CELULAR Y SECRECIÓN DE CITOQUINAS EN BAZO.** JL Baronetti, LS Chiappello, AP Garro, DT Masih

*Micología. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina. CIBICI – CONICET.*

Nuestros previos estudios han demostrado que el tratamiento de ratas con levaduras muertas por calor de *C. neoformans* (LMC) emulsificadas en adyuvante de Freund completo (AFC), 4 días previos al desafío con *C. neoformans*; provee protección contra dicha infección, no obstante, si bien hemos reportado el importante rol de macrófagos en este fenómeno, el mecanismo por el cual es mediada esta protección no ha sido totalmente dilucidada. Por otra parte, en la defensa contra *C. neoformans*, la inducción de una inmunidad mediada por células es fundamental; además, células "natural killer" (NK) y NKT han sido reportadas para tener actividad anticriptocócica. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto del tratamiento con LMC-AFC sobre la respuesta montada en bazo al momento del desafío fúngico, la cual condicionaría el curso de la posterior infección. Para tal fin, 4 días después del tratamiento con LMC-AFC o AFC-PBS, la respuesta proliferativa de esplenocitos, evaluada por incorporación de timidina tritiada, la liberación de citoquinas determinada por ELISA y la población celular en bazo, a través de citometría de flujo, fue investigada. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con LMC-AFC induce una alta respuesta blastogénica ( $p < 0.03$ ), liberación de citoquinas Th1 y Th2, tales como IL12, TNF $\alpha$ , IL10 y TGF $\beta$  ( $p < 0.005$ ; 0,004; 0,0005 y 0,008), y el aumento de células T regulatorias, CD4+CD25+, a nivel esplénico ( $p < 0.005$ ) con respecto al tratamiento con AFC-PBS. Por otra parte, el porcentaje de células NK y NKT en bazo, no fue modificado por el tratamiento con LMC-AFC. Estos resultados indican que el tratamiento con LMC-AFC provoca una activación esplénica, con liberación de citoquinas Th1 y la presencia de células CD4+CD25+ las cuales podrían ser la fuente de citoquinas Th2, regulando de este modo la respuesta inmune montada, lo cual contribuiría a la protección observada en nuestro modelo. Por otra parte, células NK y NKT, no parecen estar involucradas en este fenómeno.

**0459. (0817) ROL DE IL-12P40 EN PULMÓN DURANTE LA INFECCIÓN CON YERSINIA ENTEROCOLITICA O:3.** J Gutierrez<sup>1</sup>, MS Di Genaro<sup>1</sup>, N Gómez<sup>2</sup>

*1 Inmunología. Área de Microbiología. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis, 2 Área de Morfología. Fac. de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.*

*Yersinia enterocolitica* es una enterobacteria. En estudios previos demostramos que interleuquina-12 (IL-12) p40 juega un rol protector en pulmón luego de la infección oral con *Yersinia enterocolitica* O:3. El objetivo fue determinar en pulmón indicadores de estrés oxidativo y el grado de injuria en ratones wild-type (WT) y knock-out (KO) en IL-12p40, tanto en la fase aguda

como crónica de la infección con *Yersinia*. Ratones WT y KO fueron infectados por vía intragástrica con  $2 \times 10^3$  -  $2 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias de *Y. enterocolitica* O:3. A los 3 y 21 días postinfección (pi) los ratones fueron sacrificados. Se evaluó en lavado broncoalveolar (LBA) daño celular determinado por viabilidad celular (tinción con azul de tripan) y permeabilidad celular midiendo concentración de proteínas (Lowry). En pulmón se determinó peroxidación lipídica por cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR'S), expresión de RNAm de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa 2 (SOD2), glutatión peroxidasa (Gpx) y expresión de RNAm de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) por RT-PCR. Evidencias histopatológicas de injuria fueron evaluadas por índices morfométricos. Se observó una disminución significativa en la viabilidad celular durante la fase temprana de la infección (día 3) en ambos grupos ( $p < 0.05$ ), siendo significativamente menor en ratones KO ( $p < 0.05$ ). En la fase crónica (día 21), se observó incremento significativo en los niveles de TBAR'S en ratones KO ( $p < 0.01$ ) que se correlacionó con una disminución en la expresión de las enzimas antioxidantes ( $p < 0.05$ ). La infección indujo en ambos grupos incremento en la concentración de proteínas en LBA y en la expresión de iNOS. Índices morfométricos indicaron daño pulmonar moderado en ambos grupos, siendo mayor en KO (score 7) comparados con WT (score 5). Se concluye que un incremento en el estrés oxidativo podría mediar el mayor daño pulmonar observado en ratones deficientes en IL-12p40 infectados con *Yersinia*.

**0460. (0572) ACTIVACIÓN POR ANTIGENOS BACTERIANOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASMA.** S Fink<sup>1</sup>, RD Paz<sup>2</sup>, NV Galassi<sup>1</sup>, MR Kohan<sup>2</sup>, AM Teper<sup>2</sup>, L Bezrodnik<sup>2</sup>, MR Finiasz<sup>1</sup>

*1 IIHema. Academia Nacional de Medicina, 2 Hospital de Niños R. Gutiérrez*

Los individuos asmáticos son susceptibles a infecciones respiratorias, sin mayor prevalencia aparente de tuberculosis (TB). Se evaluó la respuesta inmune (RI) de pacientes con asma atópico frente a bacterias que causan infecciones respiratorias, para estudiar si la presencia de una respuesta en curso de tipo Th2 en los individuos asmáticos atópicos, es capaz de determinar una respuesta diferencial a micobacterias patógenas (*M. tuberculosis* (M)) y a neumococos (*S. pneumoniae* (Sp)). Se determinó por citometría de flujo (CF) el porcentaje de los linfocitos que expresan los antígenos de activación temprana (CD69) y tardía (CD25) a las 48 hs de cultivo estimulados con M y Sp o no (C). Se evaluó la población T  $\gamma\Delta$  activada (CD 69+), relevante en la RI en TB. Por otra parte se estudió la apoptosis linfocitaria (Apo) inducida por M y Sp (evaluando núcleos con iodo de propidio por CF). Se estudiaron 27 pacientes asmáticos, en crisis asmática (CR) y en período intercrisis (IN), y 17 niños sanos (S). **Resultados:** media (%)  $\pm$  error estándar. CD69: IN: C  $5,0 \pm 0,5$ ; M  $15,9 \pm 1,3^*$ ; Sp  $9,6 \pm 0,8^*$ ; CR: C  $9,2 \pm 4,5$ ; M  $14,9 \pm 3,2$ ; Sp  $12,8 \pm 3,6$ ; S: C  $8,9 \pm 3,2$ ; M  $16,1 \pm 4,2$ ; Sp  $13,6 \pm 3,4$ . CD25: IN: C  $9,4 \pm 0,8$ ; M  $11,9 \pm 0,9$ ; Sp  $11,0 \pm 0,9$ ; CR: C  $12,1 \pm 2,9$ ; M  $13,0 \pm 3,0$ ; Sp  $10,0 \pm 1,3$ ; S: C  $7,4 \pm 0,9$ ; M  $11,4 \pm 2,1$ ; Sp  $10,7 \pm 0,7$ . T $\gamma\Delta$ CD69/ T $\gamma\Delta$  totales: IN: C  $12,8 \pm 1,5$ ; M  $39,3 \pm 5,0$ ; Sp  $21,9 \pm 2,1$ ; CR: C  $9,0 \pm 1,4$ ; M  $24,6 \pm 6,1$ ; Sp  $23,1 \pm 3,7$ ; S: C  $10,1 \pm 1,4$ ; M  $25,6 \pm 5,4$ ; Sp  $27,5 \pm 8,3$ . Apo: IN: C  $33,0 \pm 4,0$ ; M  $39,0 \pm 3,1$ ; Sp  $36,2 \pm 3,2$ ; CR: C  $35,6 \pm 11,2$ ; M  $46,1 \pm 10,56$ ; Sp  $38,3 \pm 9,4$ ; S: C  $17,8 \pm 2,0$ ; M  $25,9 \pm 2,1$ ; Sp  $25,1 \pm 3,6$ . \* $p < 0,0001$ . Conclusiones: se observó una mayor respuesta al M respecto del Sp en la activación temprana de células de pacientes en período intercrisis pero no en la activación tardía ni en la apoptosis linfocitaria, y un incremento en la población T $\gamma\Delta$  activada. Esta RI diferencial podría justificar la observación de una menor prevalencia aparente de tuberculosis en los pacientes con asma.

**0461. (0034) EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS EN CÉLULAS MESOTELIALES (CD45-CITOKERATINA+) AISLADAS DE DERRAMES PLEURALES TUBERCULOSOS.** P Schierloh<sup>1</sup>, VI Landoni<sup>1</sup>, N Yokobori<sup>1</sup>, M Alemán<sup>1</sup>, L Geffner<sup>1</sup>, L Balboa<sup>1</sup>, R Musella<sup>2</sup>, J

Castagnino<sup>2</sup>, M Baldini<sup>2</sup>, E Abbate<sup>2</sup>, S de la Barrera<sup>1</sup>, MC Sasiain<sup>1</sup>

1 IIHEMA. Academia Nacional de Medicina, 2 División Tisioneumonología. Hospital Muñiz

La pleura es una membrana serosa constituida por una monocapa de células mesoteliales (CM) y tejido conectivo subyacente, que rodea los pulmones (pleura visceral) y recubre internamente la caja torácica (pleura parietal). En procesos inflamatorios de la pleura (pleuritis) pueden desarrollarse exudados (derrames pleurales, DP) con alto contenido leucocitario y un número variable de CM descamadas. Estudios recientes indican que las CM podrían cumplir funciones inmunológicas como producción de citoquinas (CK), reconocimiento de patógenos y presentación antigénica. En el presente trabajo analizamos la morfología celular y la expresión de diferentes inmunoreceptores en CM aisladas a partir de DP de pacientes con tuberculosis (TB), cáncer (CNR) y falla cardíaca congestiva (CHF). La frecuencia de CM es variable dentro y entre las diferentes etiologías siendo menor en DP-TB. Morfológicamente, las CM de DP inflamatorios (TB y CNR) presentan vacuolización asociada a un fenotipo reactivo. Por citometría de flujo, definimos las CM por su alto tamaño y complejidad celular (FSC/SSC-alto), negativas para el marcador de leucocitos (CD45-) y positivas para el marcador meso-epitelial (citokeratina+). Las CM (n=10) expresan MHC-I (61±12%) e ICAM-1 (92±3%). A diferencia de CM aisladas de CHF (DP no inflamatorio), las CM de TB (n=6) expresan MHC-II (45±8%), TLR2 (31±10%), TLR4 (22±6%), DC-SIGN (19±4%) y Receptor de Manosa (16±4%) pero no CD14 o CD1a-b. Por otro lado, las CM de TB cultivadas por 1,5-2 semanas (n=3) pierden la expresión de estos receptores y la estimulación *in vitro* con *Mycobacterium tuberculosis* o CK (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) no revierte al fenotipo inicial. Estos resultados demuestran la expresión de moléculas involucradas en la estimulación del sistema inmune adaptativo y el reconocimiento innato de patógenos en las CM del sitio de infección de *Mycobacterium tuberculosis*.

**0462. (0652) CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS T QUE EXPRESAN EL RECEPTOR 1 DE LA MOLÉCULA SEMEJANTE A LA INMUNOGLOBULINA DE LEUCOCITOS (LIR-1) EN PACIENTES CRÓNICAMENTE INFECTADOS POR TRYPANOSOMA CRUZI.** R Arguello<sup>1</sup>, MG Alvarez<sup>2</sup>, D Perez<sup>1</sup>, R Viotti<sup>2</sup>, M Postan<sup>1</sup>, RL Tarleton<sup>3</sup>, SA Laucella<sup>1</sup>

1 Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén, Bs. As., Argentina, 2 Hospital Eva Perón, San Martín, Prov. Bs. As., Argentina, 3 Center for Tropical and Emerging Global Diseases, University of Georgia, Athens, USA.

En trabajos previos demostramos que los pacientes con cardiomiopatía chagásica severa presentan bajos niveles de linfocitos T de memoria periféricos específicos para *T. cruzi* asociado a una alta frecuencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> totales que expresan LIR-1. Esta molécula posee la capacidad de inhibir la activación y proliferación de linfocitos y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Con el objetivo de caracterizar el fenotipo de la población T que expresa LIR-1, se aislaron células mononucleares periféricas de 20 pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* y se realizaron inmunomarcaciones con 4 colores utilizando los marcadores CD8, LIR-1 (CD85j), CD45RA, L-Selectina (CD62L), perforina, CTLA-4 (CD152) y CD56. Las tinciones fueron posteriormente analizadas por citometría de flujo con el programa CellQuest Pro. El 57.34 ± 23.58% del total de linfocitos T CD8<sup>+</sup> LIR-1<sup>+</sup> expresaban perforina mientras que sólo el 4.63 ± 4.43 % de la población T CD8<sup>+</sup> LIR-1<sup>(+)</sup> expresaba esta molécula (p < 0.05). La expresión de LIR-1 se asoció a poblaciones linfocitarias que hayan presentado contacto con el antígeno, no observándose expresión de LIR-1 en la población T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> ("naive"). También se observó que el 45,29 ± 8.68 % de la población de linfocitos T totales LIR-1<sup>+</sup> expresaban bajos niveles de CD56 (CD56 "dim") las que presentan marcada actividad citotóxica. No se observó co-expresión entre LIR-1 y CTLA-4. Estos resultados muestran que la expresión de LIR-1 en la infección cró-

nica por *T. cruzi* se asocia a poblaciones linfocitarias diferenciadas características de las infecciones persistentes.

**0463. (0759) DESARROLLO DE UN MODELO IN VIVO DE PERITONITIS AGUDA POR FLUJO DE BACTERIAS INTES-TINALES.** G Barrera, LV Bentancor, MV Ramos, RJ Fernandez-Brando, MA Isturiz, MS Palermo, GC Fernández ILEX, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

La invasión de la cavidad peritoneal por fisura intestinal conduce a falla multiorgánica, shock séptico y muerte. **Objetivo:** Desarrollar un modelo de peritonitis aguda (PA) mediante el egreso de bacterias intestinales hacia el peritoneo. Metodología: Se inserta y fija quirúrgicamente un tubo de 18G de diámetro atravesando el ciego del ratón, dejando uno de los extremos hacia el interior del ciego y el otro hacia el peritoneo. En los animales control (sham), el tubo se fija mediante un punto a la pared del ciego pero sin atravesarlo. La sobrevida y el recuento de leucocitos periféricos son evaluados post-cirugía. Por otra parte, se realiza lavado peritoneal 24hs post-cirugía para determinar presencia de leucocitos y bacterias mediante cultivo en placas con agar Mac Conkey. **Resultados:** Los animales control presentaron una sobrevida del 100%; asimismo los ratones con PA tuvieron una sobrevida del 40% trascurridas 24 hs de la operación y del 20% trascurridas 48 hs (n=30). En el grupo control se observó leucopenia a las 24hs post-cirugía, con una posterior recuperación a las 48hs; sin embargo, en los animales con PA se observó una leucopenia sostenida (leucocitos/mm<sup>3</sup>: 24hs: Sham (n=12)=294.2±46.5, PA (n=18)=241.9±22.7#; 48hs: Sham (n=17)=572.6±70.5\*, PA (n=9)=257.8±38.6#, \*p<0.05 vs sham 24hs, #p<0.05 vs sham 48hs). Mientras que en los animales control no se observaron bacterias en peritoneo, los animales con PA presentaron gran cantidad de unidades formadoras de colonia trascurridas 24hs (n=4, UFCx106/ml=11.8±6.5). Los animales con PA presentan menor número de leucocitos peritoneales (leucocitosx106/ml a las 24hs: Sham (n=3)=4.8±0.3, PA (n=6)=1.1±0.6\*, \*p<0.05 vs sham). **Conclusión:** La presencia de bacterias peritoneales 24hs post-cirugía valida el modelo presentado de peritonitis aguda por flujo de bacterias intestinales, el cual muestra un cuadro similar al shock séptico evidenciado por la muerte temprana, la leucopenia y la falta de migración al sitio infeccioso.

**0464. (0790) TRATAMIENTO ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN AÑATUYA, SANTIAGO DEL ESTERO.** L Niborski<sup>1</sup>, A Schijman<sup>1</sup>, G Levitus<sup>1</sup>, V Grippo<sup>1</sup>, J Burgos<sup>1</sup>, M Bisio<sup>1</sup>, S Longhi<sup>1</sup>, G Levy<sup>1</sup>, V Ayala<sup>2</sup>, M Coppede<sup>2</sup>, V Herrera<sup>2</sup>, C Romano<sup>2</sup>, C López<sup>2</sup>, A Contreras<sup>2</sup>, H Mujica<sup>2</sup>, J Elean<sup>2</sup>, MJ Levin<sup>1</sup>

1 Lab de Biol Mol de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh) INGEBI-CONICET, 2 Grupo Cáritas Diocesana Añatuya

El proyecto "Vivir sin Chagas" tiene como objetivo implementar el tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas en una región de alta endemicidad y muy carenciada de nuestro país, como es la ciudad de Añatuya, Santiago del Estero. El tratamiento tripanocida con benznidazol (60 días, 5mg/kg/día) fue dirigido a pacientes infectados, cursantes de la fase indeterminada o crónica de la enfermedad, siguiendo las recomendaciones de la OMS. Los estudios serológicos (ELISA) y parasitológicos (PCR) se realizaron antes (T0), a 1 mes (T1), a 3 meses (T2), a 6 meses (T3), a 1 año (T4), a 2 años (T5) y a 3 años (T6) luego de finalizado el tratamiento. Se ha realizado el seguimiento de sueros de 99 pacientes, mostrando una disminución significativa de reactividad anti-extracto total de *T. cruzi* a partir de T3 (P<0.02) y un 5% de seroconversión (95% IC) en las colectas subsiguientes. La reactividad de 42 sueros contra el péptido sintético R13 (región C-terminal de la proteína ribosomal TcP2 $\beta$ ) disminuyó significativamente a T6 (P<0.02). Con respecto a la reactividad de los sueros contra los antígenos recombinantes JL7 (fragmento de una proteína flagelar) e IF8 (fragmento de una proteína de membrana), correlacionaron con la respuesta anti-*T. cruzi*. De 46 pacien-

tes analizados por PCR-Southern Blot, el 17.4% (95% IC) presentó una negativización parasitaria persistente en el seguimiento post tratamiento (T1, T2, T3, T4, T5 y T6). Además, se estudió el efecto funcional de las IgG de 7 pacientes anti-R13 sobre cardiomiocitos de ratas neonatas, observándose un cambio significativo en el cronotropismo celular comparando T0 y T6. Estos resultados demuestran que el tratamiento con benznidazol produce una disminución de reactividad sérica hacia el parásito en pacientes adultos cursantes de la fase indeterminada o crónica sintomática de la enfermedad.

**0465. (0816) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR INDUCIDA FRENTE A NEF DEL INTERSUBTIPO BF DE HIV-1.** AM Rodríguez<sup>1</sup>, G Turk<sup>1</sup>, F Ferrer<sup>2</sup>, F Zanetti<sup>2</sup>, MF Pascutti<sup>1</sup>, D Mónaco<sup>1</sup>, G Schulman<sup>1</sup>, G Calamante<sup>2</sup>, H Salomón<sup>1</sup>, MM Gherardi<sup>1</sup>

1 Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Dpto de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA, 2 Instituto de Biotecnología CICVyA-INTA Castelar

El uso de los poxvirus recombinantes es una de las estrategias mundialmente utilizadas en el desarrollo de vacunas para HIV, siendo efectivos para incrementar respuestas inmunes celulares inducidas por un vector heterólogo, como ADN (Prime-Boost). El objetivo de este trabajo fue evaluar la inmunogenicidad de la proteína NefBF del HIV-1, mapeando los epítopes inmunodominantes, en el modelo murino Balb/c, mediante la utilización de distintas combinaciones de vectores ADN y MVA expresando el antígeno específico. Grupos de 4 ratones de 8 semanas de edad fueron inoculados con diferentes esquemas: MVA/MVA, ADN/ADN, ADN/MVA. A los 8 días se evaluó la respuesta celular específica inducida en el bazo. Se analizó la respuesta in vitro reestimulando los esplenocitos con péptidos solapantes abarcando la totalidad de la secuencia proteica, mapeando los epítopes mediante las técnicas de ELISPOT, citometría de flujo y cuantificación de citoquinas en sobrenadante por ELISA. Los resultados obtenidos mostraron que tanto los regímenes de inmunización basados sólo en ADN como aquellos en los que se empleó la combinación de ambos vectores generaron una respuesta celular específica frente a NefBF. **Conclusión:** En este trabajo se demuestra la inmunogenicidad de NefBF, identificando diferentes epítopes a lo largo de las diferentes regiones de la proteína.

**0466. (0849) LA INFECCIÓN CRÓNICA CON TOXOPLASMA GONDII IMPIDE EL DESARROLLO DE UNA INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR.** I Fenoy, V Martín, A Goldman

CESyMA, ECyT, Universidad Nacional San Martín

Se demostró que la sensibilización con ovalbúmina (OVA) de ratones BALB/c durante la etapa aguda de la infección con T. gondii no induce el desarrollo de inflamación alérgica pulmonar y muestra una disminución en los niveles de IgE e IgG1 OVA específicos y en la producción de citoquinas de tipo Th2 por células de ganglios torácicos. El aumento de los niveles de IgG2a e INF $\gamma$  (en células de ganglio estimuladas con OVA) en los ratones infectados previamente con T. gondii sugiere que la infección aguda modula la alergia induciendo un desvío hacia Th1. En el presente trabajo analizamos la modulación de la susceptibilidad a desarrollar la inflamación pulmonar cuando los ratones son sensibilizados durante la etapa crónica de la infección. Ratones BALB/c fueron sensibilizados con OVA por vía ip. y desafiados por vía aérea (O). Un mes antes de la sensibilización el grupo experimental (O+T) fue infectado por vía oral. Evaluamos el grado de inflamación alérgica pulmonar (cortes histológicos y conteo diferencial en lavado broncoalveolar (BAL)), niveles de IgE, IgG1 e IgG2a y producción de IL-4, IL-5 e INF- $\gamma$  por células de ganglio torácicos estimuladas in vitro con OVA. Se observó (promedio $\pm$ ES), en los ratones previamente infectados, una disminución de la inflamación alérgica pulmonar (infiltrado perivascular, peribronquial y células productoras de mucus y eosinófilos en BAL 3,9 $\pm$ 1,8 (O+T) vs 42,7 $\pm$ 9,8 % (O)). Los niveles de IgE específicos para OVA (214,9 $\pm$ 71 (O+T) vs 420,9 $\pm$ 92 $\mu$ g/ml (O), p<0,05) y la producción

de IL-4 e IL-5 también resultaron disminuidos (IL-4:13 $\pm$ 1 (O+T) vs 187 $\pm$ 90 pg/ml (O); IL-5:427 $\pm$ 154 (O+T) vs 4560 $\pm$ 1278 pg/ml (O) p<0,05). Se detectó un aumento en los niveles de IgG2a (p<0,05). Sin embargo, no se observó una disminución en los niveles de IgG1 ni un aumento en la secreción de INF- $\gamma$  en células estimuladas in vitro con OVA. Se concluye que la infección crónica con T. gondii bloquea, al igual que en la etapa aguda, el desarrollo de una inflamación alérgica pulmonar.

**0467. (0075) ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS EN HÍGADO DE RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI.** MT Ronco<sup>1</sup>, DE Francés<sup>1</sup>, AR Perez<sup>2</sup>, AD Quiroga<sup>1</sup>, ML Alvarez<sup>1</sup>, JP Parody<sup>1</sup>, GB Pisani<sup>1</sup>, MC Carrillo<sup>1</sup>, SS Revelli<sup>2</sup>, CE Carnovale<sup>1</sup>

1 Instituto de Fisiología Experimental - CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR, 2 Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas. UNR

**Introducción:** Los niveles séricos de TNF- $\alpha$  se encontraron aumentados en ratones C57BL/6 infectados con Trypanosoma cruzi (Roggero, 2002); mediador que ha sido propuesto como molécula implicada en estrés oxidativo y apoptosis. **Objetivo:** Como el hígado está afectado en la infección con T. cruzi nos propusimos evaluar el estado redox celular y algunas de las proteínas involucradas en el proceso de apoptosis en hígado de ratones infectados con T. cruzi. Metodología y resultados: Ratones machos adultos C57BL/6 fueron infectados por vía subcutánea (s.c) con 100 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de T. cruzi; siendo sacrificados a los 7 (n=6) y 14 (n=6) días post-infección. El grupo control recibió solución fisiológica (s.c). Se determinaron: Parasitemias por microscopía óptica (parásitos/50 campos) T. cruzi 7d:1,0 $\pm$ 0,2; T. cruzi 14d:63,0 $\pm$ 5,0. % de glutatión oxidado (Método de Tietze): Control:3,38 $\pm$ 0,43; T. cruzi 7d:4,97 $\pm$ 0,65; T. cruzi 14d:20,19 $\pm$ 2,89\*. Niveles de lipoperoxidación (nmol MDA/mg prot): Control: 28,44 $\pm$ 3,28; T. cruzi 7d: 46,70 $\pm$ 8,43; T. cruzi 14d: 56,28 $\pm$ 4,18\*. En fracción mitocondrial se evaluó la expresión hepática de la proteína pro-apoptótica Bax (western blot, unidades arbitrarias de densitometría) (Control:320 $\pm$ 28; T. cruzi 7d:448 $\pm$ 108; T. cruzi 14d:5646 $\pm$ 232\*) y la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL (western blot, unidades arbitrarias de densitometría) (Control:465 $\pm$ 66; T. cruzi 7d:486 $\pm$ 36; T. cruzi 14d:2473 $\pm$ 290\*). La relación Bax/ Bcl-xL fue: Control:1,65 $\pm$ 0,66; T. cruzi 7d: 0,99 $\pm$ 0,20; T. cruzi 15d: 9,16 $\pm$ 2,86\*). El citocromo c fue liberado a la fracción citosólica (western blot, unidades arbitrarias de densitometría) (Control: 52,33 $\pm$ 26,42; T. cruzi 7d:141,66 $\pm$ 28,42; T. cruzi 14d:1345,33 $\pm$ 264,42\*). (\*p<0.05 vs Control). **Conclusión:** Se observa un aumento del estrés oxidativo en el hígado de los ratones infectados que produce aumento de Bax y liberación de citocromo c, sugiriendo que la infección con T. cruzi promueve apoptosis de las células hepáticas.

**0468. (0081) PERFIL DE CITOQUINAS Y PATRÓN MIGRATORIO DE LINFOCITOS T TCR BV9+ EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR UN CLON MIOTRÓPICO DE TRYPANOSOMA CRUZI.** J Vogt, GA Mirkin

Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

En los infiltrados inflamatorios de los tejidos musculares cardíaco (COR) y esquelético (MUS), de ratones C3H/HeN crónicamente infectados con un clon miotrópico K98 de Trypanosoma cruzi (T. cruzi), predominan linfocitos T (LT) que expresan la cadena BV9 del receptor de células T (TCR BV9\*). En este modelo investigamos: 1) La secreción de INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 por LT TCR BV9\* de COR, MUS y ganglios linfáticos (GL) co-cultivados con células presentadoras de antígeno (Ag) y estimulados con Ag de T. cruzi (AgTc) mediante ELISA y 2) Su patrón de migración mediante transferencia pasiva de LT marcados con carboxifluoresceína-5,6-diacetato succinimidiléster (CFSE) y citometría de flujo. LT TCR BV9\* de GL, pero no los de COR y MUS secretan INF- $\gamma$  (GL: 48,00 $\pm$ 5,20 ng/ml vs COR y MUS: <0,78 ng/ml; p<0,0001 vs GL). LT TCR BV9\* de COR y MUS, secretan niveles

mayores de IL-10 que los de GL ( $0,336 \pm 0,018$  ng/ml y  $0,188 \pm 0,040$  ng/ml vs  $0,058 \pm 0,008$  ng/ml; COR y MUS vs GL;  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  vs GL, respectivamente). Los LT TCR BV9<sup>+</sup> de GL, COR y MUS no secretan niveles detectables de IL-4 ( $< 31,25$  pg/ml). El porcentaje de LT TCR BV9<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> fue mayor en MUS y COR que en GL ( $17,73 \pm 2,73\%$  y  $9,42 \pm 0,96\%$  vs  $2,82 \pm 0,33\%$ ;  $p < 0,001$  y  $p < 0,01$  vs GL, respectivamente) y la intensidad de fluorescencia media del TCR, menor ( $254,8 \pm 72,8$  y  $359,6 \pm 68,4$  vs  $653,6 \pm 84,7$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,05$  vs GL, respectivamente). Los resultados sugieren que la incapacidad de los LT TCR BV9<sup>+</sup> para producir IFN- $\gamma$  en respuesta a antígenos de *T. cruzi* en músculos cardíaco y esquelético es consecuencia de la producción Ag-específica de IL-10 en dichos tejidos. Este mecanismo parece ser funcional *in vivo*, ya que en ratones crónicamente infectados, LT TCR BV9<sup>+</sup> representan la población mayoritaria y tienen capacidad para migrar preferentemente hacia tejidos no linfoides parasitados en los que sufren modulación del TCR, señalando su activación reciente.

## PREMIO COSSIO

**0469. (0200) INVESTIGACIÓN CLÍNICA DE LOS TRASTORNOS PSICÓTICOS EN PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL REFRACTARIA CANDIDATOS A CIRUGÍA DE LA EPILEPSIA.** L DAlessio<sup>1,3</sup>, C Papayannis<sup>1,3</sup>, S Oddo<sup>1,2</sup>, B Giagante<sup>1</sup>, P Solís<sup>1</sup>, D Consalvo<sup>1</sup>, M Kauffman<sup>1,2</sup>, JJ López-Costa<sup>2,3</sup>, VF Donnoli<sup>4</sup>, LM Zieher<sup>2</sup>, S Kochen<sup>1,2,3</sup>

1 Hospital Ramos Mejía, 2 CONICET, 3 Instituto de Robertis, Medicina, UBA., 4 Hospital Borda

**Introducción:** La asociación entre psicosis y epilepsia es controvertida. Se ha reportado una alta incidencia de psicosis en los pacientes con epilepsia del lóbulo temporal refractaria (ELTR). Se postula que las crisis podrían inducir cambios neuroplásticos favoreciendo el desarrollo de síntomas psicóticos en pacientes susceptibles. **Objetivos:** El objetivo de este trabajo es el de identificar los subtipos de psicosis y las variables clínicas de riesgo en los pacientes con ELTR candidatos a cirugía de la epilepsia. **Métodos:** Se estudiaron 63 pacientes con ELTR y antecedentes de episodios y/o síntomas psicóticos (GP) y 60 con ELTR sin psicosis (GC). El diagnóstico psiquiátrico fue realizado en base a los resultados de las SCID I y II (DSM IV). Las variables demográficas, clínicas, neuroanatómicas y neurofisiológicas fueron comparadas entre ambos grupos. 12 pacientes del GP y 38 del GC fueron operados en el período 2000-2006 y fueron evaluados durante al menos un año post-cirugía. **Resultados:** Los diagnósticos psiquiátricos del GP fueron; episodio psicótico breve 34%, esquizofrenia 17%, esquizofreniforme 13%, trastorno de la personalidad esquizo-paranoide/esquizotípico 17%, psicosis afectiva 11%, trastorno delirante 8%. Los pacientes del GP presentaron un mayor tiempo de evolución de la epilepsia y una mayor incidencia de antecedentes de estatus epilepticus y esclerosis hipocampal bilateral ( $p < 0,05$ ). La presencia de aura epiléptica fue reportada con una frecuencia significativamente mayor en el GC ( $p < 0,05$ ). Cuatro pacientes del GP y ningún paciente del GC presentaron episodios psicóticos luego de la cirugía  $p < 0,05$ . **Conclusiones:** Las variables clínicas de riesgo observadas con una frecuencia significativamente mayor en el GP, fueron aquellas vinculadas a un mayor tiempo de exposición a las crisis y a una mayor severidad de la epilepsia. El desarrollo de psicosis como complicación de la cirugía se asoció a la presencia de antecedentes previos de psicosis (GP).

**0470. (0571) REMODELAMIENTO VASCULAR Y RENAL EN ETAPAS TEMPRANAS DE POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE.** PJ Azurmendi<sup>1</sup>, AF Fraga<sup>1</sup>, FM Galan<sup>1</sup>, K Kotliar<sup>2</sup>, EE Arrizurieta<sup>1</sup>, MG Valdez<sup>1</sup>, PJ Forcada<sup>2</sup>, JS Santelha Stefan<sup>1</sup>, RS Martin<sup>1,2</sup>

1 IIM Alfredo Lanari, UBA-CONICET, 2 Centro Académico de Salud, Universidad Austral

La principal causa de morbi-mortalidad en Poliquistosis Renal Autosómica Dominante (ADPKD) es la presencia de eventos cardiovasculares, aunque existe poca información en períodos subclínicos. Hemos observado que leves incrementos en la excreción de albúmina (ACR  $> 6.8$  mg/gCr) correlacionan con los de proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), evidenciando remodelamiento renal en pacientes jóvenes con función renal normal, independientemente de la hipertensión. Es por ello que evaluamos posibles alteraciones vasculares tempranas y su asociación con marcadores de inflamación/fibrosis sistémica y remodelamiento renal en ADPKD. Estudiamos 48 pacientes ADPKD y 21 controles apareados por edad. Se determinó: espesor de la intima-media carotídea (IMT), relajación vascular endotelio-dependiente (EDVR) y velocidad de onda de pulso aórtica (Ao-PWV) como índices de alteraciones vasculares subclínicas; MCP-1 y factor transformante del crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) plasmáticos como marcadores de activación inflamatoria y fibrótica sistémica, respectivamente. IMT fue  $0.51 \pm 0.08$  mm en ADPKD y  $0.44 \pm 0.07$  en C ( $p < 0.005$ ), mostrando la misma diferencia aún en un subset de 28 ADPKD normotensos ( $p < 0.005$ ). IMT fue también superior en ADPKD con ACR mayor a C vs ADPKD con ACR no diferente a C ( $p < 0.005$ ), aún en normotensos ( $p < 0.005$ ). EDVR, Ao-PWV, MCP-1 y TGF- $\beta$  plasmáticos fueron similares en ADPKD y C, independientemente de la presión arterial y del valor de ACR. Los resultados sugieren que ADPKD temprana presenta alteraciones vasculares preclínicas asociadas al remodelamiento renal ya descrito, sin activación inflamatoria/fibrótica sistémica evidente, aún en ausencia de hipertensión arterial. Por lo tanto, la excreción de albúmina podría ser un marcador accesible y precoz de estos procesos.

## INMUNOLOGÍA VII

**0471. (0646) CORRELACION ENTRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE SLPI Y LA CAPACIDAD LINFOPROLIFERATIVA EN PACIENTES CON PATOLOGÍAS PULMONARES.** RM Reiter<sup>1</sup>, N Tateosian<sup>1</sup>, A Barro<sup>2</sup>, D Guerrieri<sup>1</sup>, N Amiano<sup>1</sup>, JA Mazzei<sup>2</sup>, HE Chuluyan<sup>1</sup>

1 3° Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA, 2 Departamento de Medicina Interna, Hospital de Clínicas "José de San Martín"

El SLPI es una proteína anti-inflamatoria de 11,7 kDa presente en altas concentraciones en epitelio pulmonar. Previamente hemos descrito un efecto inhibitor del SLPI sobre la proliferación linfocitaria. Dado que el SLPI se encuentra en el condensado de aire espirado (CAE) y en el plasma de diversas patologías pulmonares, el objetivo de este trabajo fue evaluar una posible correlación entre los niveles de SLPI (plasmático o en el CAE) con la capacidad linfoproliferativa en respuesta a la IL-2 en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), cáncer de pulmón (CA) y tabaquistas. Los niveles de SLPI se determinaron con un ensayo de ELISA y la proliferación de linfocitos en respuesta a IL-2 se evaluó *in vitro* mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-Timidina. Los resultados mostraron que el nivel plasmático de SLPI en los pacientes con CA fue mayor al encontrado en los pacientes con EPOC o tabaquistas (CA:  $3,45 \pm 1,23$   $\mu$ g/ml; EPOC  $2,14 \pm 0,45$   $\mu$ g/ml; tabaquistas  $2,6 \pm 0,7$   $\mu$ g/ml;  $p < 0,05$ ). En cambio, los niveles de SLPI en el CAE de los pacientes analizados no mostraron diferencias significativas. El análisis de la proliferación linfocitaria en estos grupos de pacientes mostró que los pacientes con cáncer de pulmón presentaban una menor capacidad linfoproliferativa comparada con la observada en tabaquistas (CA:  $1,02 \pm 0,99$ ; tabaquistas  $2,76 \pm 0,81$ ;  $p < 0,05$ ). Esta diferencia no se observó con respecto a los pacientes con EPOC. Por último, evaluamos la correlación entre los niveles de SLPI plasmáticos y la proliferación linfocitaria, observando una correlación negativa entre esos valores ( $r = -0,7706$ ;  $p = 0,0049$ ). En conjunto estos resultados sugieren que el SLPI plasmático y la proliferación linfocitaria pueden ser buenos marcadores para el CA de pulmón; y que además, la disminución de la proliferación en los pacientes

con cáncer podría estar relacionada con una mayor concentración plasmática de SLPI.

**0472. (0661) CONJUNTIVITIS ALERGICA E INFECCION BACTERIANA: ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS EN LÁGRIMAS.** ME Ferro, N Carle, E Sierralta, A Del Rivero, A Maldonado Bas

*Inmunología. Fac. Cs. Químicas. Univ. Católica de Córdoba*

La conjuntivitis alérgica se asocia a desvío local hacia inmunidad T helper 2. Para conocer la respuesta de estos pacientes frente a infección bacteriana, en adultos jóvenes sanos (controles, N) (n=80) o con diagnóstico oftalmológico de conjuntivitis alérgica aguda (CAA n=128) o crónica (CAC, n=312) se realizaron cultivos bacteriológicos de conjuntiva y dosaje de IgA(mg/dL), IgM (mg/dL), IgG(mg/dL), IgE(UI/mL) y subclases de IgG(mg/dL) en lágrimas por ELISA sándwich. Bacterias patógenas se hallaron en 36/128 CAA (28,1%) y en 214/312 CAC (68,5%). Pacientes con CAA y CAC y cultivos negativos mostraron aumento de IgE (38,9±21,7 y 57,0±36,6 respectivamente) y disminución de IgA (9,6±9,1 y 10,8±9,7) con respecto a N (IgE:3,9±3,4; IgA: 21,6±10,1) (p<0,001 en todos los casos), sin alteración en niveles de IgG e IgM. En pacientes con CAA y CAC y cultivos positivos, además del aumento de IgE (CAA: 22,8±14,0 p< 0,0001, CAC 35,5±17,7 p< 0,001) y disminución de IgA (CAA: 9,8±8,0, p<0,001; CAC: 6,0±3,8, p<0,0001), se observó aumento de IgG (CAA: 20,0±16,5 y CAC: 24,6±17,9) con respecto a N (1,02±0,73) (p<0,0005 y p<0,001, respectivamente). Sin embargo, pacientes con CAA infectados mostraron aumento de isotipos de IgG protectores (IgG1, IgG3) (7,80±2,25 y 5,76±2,02) y no protectores (IgG4) (5,10±6,23) con respecto a N (IgG1: 0,51±0,26; IgG3: 0,21±0,27 e IgG4:0,13±0,10) mientras que pacientes con CAC infectados indujeron sólo elevación de IgG4 (19,62±10,70). Leve aumento de IgM se observó en todos los pacientes. En pacientes con CAA y CAC se observó aumento de IgE y disminución de IgA en lágrimas. Frente a la infección bacteriana, pacientes con CAA inducen isotipos de IgG protectores y no protectores mientras que pacientes con CAC inducen sólo estos últimos.

**0473. (0043) PROSTATITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL: EL ROL DEL IFN-GAMA.** RD Motrich<sup>1</sup>, E Van Etten<sup>2</sup>, CM Riera<sup>1</sup>, C Mathieu<sup>2</sup>, VE Rivero<sup>1</sup>

*1 Inmunología, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina., 2 Laboratorium voor Experimentele Geneeskunde en Endocrinologie (LEGENDO), Katholieke Universiteit Leuven, Campus Gasthuisberg, Leuven, Bélgica.*

La autoinmunidad ha sido propuesta como una etiología en la Prostatitis Crónica No Bacteriana/Síndrome de Dolor Pélvico Crónico (PCNB/CPPS). Una respuesta autoinmune contra antígenos prostáticos de un perfil Th1 fue evidenciada en pacientes y en modelos experimentales de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue establecer el rol del IFN- $\gamma$  en la Prostatitis Autoinmune Experimental (PAE), mediante el estudio de su desarrollo en ratones deficientes en factores de transcripción de la cascada de señalización del IFN- $\gamma$ : IRF-1 y STAT-1. El desarrollo de la PAE fue estudiado en ratones C57BL/6, IRF1-KO y STAT1-KO como así también en la cepa NOD, clásica cepa de ratones utilizada en los modelos de PAE. La PAE fue inducida mediante la inmunización con Prostateína (PSBP) en CFA, mientras que los animales controles recibieron solución salina en CFA. Los ratones NOD inmunizados evidenciaron una severa infiltración mononuclear y lesiones en tejido prostático. En paralelo, el análisis mediante PCR en tiempo real reveló un significativo incremento en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-12, y una disminución en los niveles de IL-10 en tejido prostático. A su vez, se observó una marcada respuesta inmune celular y humoral específica hacia PSBP, con elevada secreción de IFN- $\gamma$  y de autoanticuerpos de tipo IgG2a. Por el contrario, ratones IRF1-KO y STAT1-KO inmunizados presentaron una reducida linfoproliferación específica a PSBP con niveles muy disminuidos de IFN- $\gamma$ , comparados con la cepa salvaje

(C57BL/6). La respuesta autoinmune específica humoral desarrollada por los animales deficientes se caracterizó por presentar elevados títulos de IgG1 y no de IgG2a. Finalmente, ratones IRF1-KO y STAT1-KO inmunizados evidenciaron ausente-suave inflamación en próstata, demostrando que la respuesta autoinmune desarrollada por estos animales fue incapaz de inducir las lesiones típicas de la PAE. Como conclusión, estos resultados sustentan un rol clave del IFN- $\gamma$  en la patogénesis de la PAE.

**0474. (0720) CONSECUENCIAS DE LA ACTIVACIÓN DE TOLL LIKE RECEPTOR 4 (TLR4) PRESENTE EN CÉLULAS TUMORALES, SOBRE EL DESARROLLO DE TUMORES IN VIVO.** V Andreani, G Gatti, V Rivero, M Maccioni

*Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas. UNC. CIBICI. CONICET.*

Previamente hemos demostrado que células de adenocarcinoma prostático de rata (MAT-LU) y células de melanoma murino (B16) expresan Toll Like Receptor 4 (TLR4), el receptor del lipopolisacárido (LPS) bacteriano, clásicamente presente en células de la inmunidad innata. La estimulación de células MAT-LU in vitro con LPS o Lípido A, induce la activación de NF- $\kappa$ B, así como también la expresión de distintos transcritos de quemoquinas y de algunas citoquinas. En este trabajo demostramos que las células B16, expresan constitutivamente TLR4 y CD14 y la estimulación con LPS aumenta la expresión de transcritos para varios factores proinflamatorios, como TNF $\alpha$  y la secreción de IL6 (ELISA), la cual disminuye al inhibir el TLR4 con un anticuerpo específico. Posteriormente, células B16 estimuladas con LPS o con Lípido A in vitro fueron inyectadas en ratones singénicos. Al igual que en el modelo de cáncer de próstata de rata, tumores inducidos por células estimuladas con LPS (n=10) o Lípido A (n=8) presentaron una marcada disminución en su crecimiento comparados con aquellos inducidos por células B16 no tratadas (n=10). Esta disminución es debida a la activación del TLR4 sobre la célula tumoral, ya que en ratones deficientes de TLR4 (TLR4<sup>ips-del</sup>) se observa el mismo efecto. Nuestros resultados nos permiten hipotetizar que la señalización vía TLR4 sobre células tumorales por ligandos exógenos como el LPS o el Lípido A, induce la expresión de mediadores proinflamatorios que, aún si son transitoriamente secretados, podrían dramáticamente alterar el fenotipo de células dendríticas presentes en el sitio de inoculación y cambiar el tipo de respuesta inmune inducida contra el tumor.

**0475. (0736) CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA EN CHICOS CON HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO I: ANÁLISIS DE LA SUBUNIDAD  $\beta$ 1 DEL RECEPTOR DE IL-12 Y LA SUBUNIDAD  $\alpha$  DEL RECEPTOR DE IL-18 EN CÉLULAS T DE MEMORIA CD4+ Y CD8+.** NE Ferreyra Solari<sup>1</sup>, M Cuarterolo<sup>2</sup>, S Lopez<sup>2</sup>, C Galoppo<sup>3</sup>, MC Cañero-Velasco<sup>4</sup>, M Barboza<sup>1</sup>, AC Cherñavsky<sup>1</sup>

*1 Hospital de Clínicas "José de San Martín", 2 Hospital de pediatría "Dr. J.P. Garrahan", 3 Hospital de niños "Dr. Ricardo Gutiérrez", 4 Hospital de niños San Justo*

**Introducción:** La hepatitis autoinmune Tipo I (HAI-I) es una enfermedad inflamatoria severa de etiología desconocida y curso fluctuante con evolución progresiva a fibrosis, cirrosis y falla hepática. La frecuencia de linfocitos antígeno - específicos es mayor en células de memoria que vírgenes. La presencia de LT de memoria en el hígado crónicamente afectado depende del sostenido aporte desde periferia ya que los LT efectoros poseen corta vida media. La adquisición del fenotipo efector Th1 por los LT ingresantes requiere la presencia de IL-12 e IL-18, citoquinas de elevado nivel de expresión local (hepática) en HAI-I. **Objetivo:** Analizar subpoblaciones de LT (CD4+ o CD8+) de memoria y la expresión de receptores para IL-12 (IL-12R $\beta$ 1) e IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) en compartimento periférico **Métodos:** células mononucleares de sangre periférica (CMSP) obtenidas por gradiente de Ficoll-Hipaque a partir 10 ml de sangre heparinizada de 13 pacientes HAI-I y 10 controles fueron marcados con anticuerpos anti- CD4

y -CD8 PercP, anti-CD45RO FITC y anti IL-12R $\beta$ 1 e IL-18R $\alpha$ PE, analizados por citometría de flujo y los análisis estadísticos realizados mediante el test de Mann Whitney. **Resultados:** La subpoblación CD45RO+CD4+ está disminuida en HAI-I (38.14  $\pm$  1.48 vs. 46.89  $\pm$  1.14,  $p=0.0015$ , vs. Co). Los pacientes HAI-I presentan mayor frecuencia para ambos receptores en las subpoblaciones de memoria CD4 y CD8. Para IL-12R $\beta$ 1: 32.88  $\pm$  2.66 vs. 20.34  $\pm$  1.44,  $p=0.0019$  en CD4+CD45RO+ y 53.10  $\pm$  5.60 vs. 40.73  $\pm$  1.40,  $p=0.0317$  en CD8+CD45RO+. Para IL-18R $\alpha$ : 49.92  $\pm$  3.06 vs. 35.14  $\pm$  2.80,  $p=0.0103$  para CD4+CD45RO+ y 51.98  $\pm$  2.17 vs. 36.14  $\pm$  1.39,  $p=0.0003$  para CD8+CD45RO+. **Conclusión:** Existiría compartimentalización selectiva de células de memoria CD4+ (y no CD8+) hacia el hígado. Confirmamos la participación de IL-12 e IL-18 en el desarrollo / mantenimiento de la injuria hepática en HAI-I ya que ambas subpoblaciones son reservorio periférico de receptores para dichas citoquinas.

**0476. (0335) POLIMORFISMO MOLECULAR DEL SISTEMA DUFFY: IMPLICANCIA COMO MARCADOR GENÉTICO.** C Cotorruelo<sup>1</sup>, S Fiori<sup>2</sup>, S García Borrás<sup>2</sup>, L Racca<sup>2</sup>, C Biondi<sup>2</sup>, A Racca<sup>3</sup>

*1 Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CONICET, 2 Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR., 3 Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. CIUNR.*

Los antígenos del sistema eritrocitario Duffy producen anticuerpos específicos responsables de algunas anemias hemolíticas inmunes. Los alelos de este sistema se distribuyen con diferentes frecuencias en distintos grupos étnicos. En trabajos anteriores hemos demostrado un aumento de la frecuencia de algunos marcadores genéticos eritrocitarios característicos de africanos, en la población de Rosario. El objetivo de este trabajo fue determinar la distribución de las frecuencias alélicas del sistema Duffy en nuestra población. Se estudiaron 206 muestras de individuos no relacionados mediante técnicas de ASA-PCR y PCR-RFLP. Se obtuvieron las siguientes frecuencias alélicas: FYA=50.73%, FYB=45.63% y FYBnull=3.64%. Estos valores difirieron significativamente de los reportados para la población caucásica (FYA=39.11%, FYB=60.06% y FYBnull=0.83%,  $p<0.005$ ). Se observó un aumento significativo del alelo FYA, de alta frecuencia en amerindios y del alelo FYBnull, característico de la población africana ( $p<0.005$ ). Posteriormente se analizó en la muestra la presencia de marcadores genéticos africanos del sistema Rh: alelo RHes y haplotipo Dce. Se demostró la asociación del alelo FYBnull con el alelo RHes ( $p<0.05$ , RO=7,7) y con el haplotipo Dce ( $p<0.05$ , RO=6,4). El porcentaje de hibridización con la etnia negra fue 3.37%. La permanencia de diferentes alelos africanos en pocos individuos de la población indica que el mestizaje entre descendientes de africanos y europeos ocurrió en las dos o tres generaciones anteriores. Por otro lado, el aumento en la frecuencia del alelo FYA reflejaría el aporte de etnias amerindias. El estudio del sistema Duffy contribuye a estimar el grado de variabilidad genética de la población analizada.

**0477. (0326) ROL DE CÉLULAS T REGULATORIAS EN LA INFECCIÓN DURANTE LA RECCIÓN DEL VIRUS DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO.** G Cabrera, D Burzyn, J Mundiñano, G Camicia, D Lorenzo, AF Maglioco, HL Costa, I Nepomnaschy, I Piazzon

*ILEX-CONICET. División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina de Argentina*

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es un retrovirus que se transmite durante la lactancia y utiliza al sistema inmune para establecer la infección. En las placas de Peyer (PP), la presentación de un Sag viral por células dendríticas (CDs) y células B infectadas a células T portadores de un receptor V $\beta$  que reconoce al Sag es un evento crítico para la amplificación del reservorio viral. Previamente mostramos que la infección con

MMTV induce incrementos en células T regulatorias (Treg) V $\beta$ 6+CD4+Foxp3+ específicas para el Sag viral que poseen actividad inmunosupresora en cultivos mixtos linfocitarios (MRLs). En este estudio se muestra que la supresión tiene un alto grado de especificidad. Se realizaron MLRs utilizando células respondedoras de ganglio BALB/c, células presentadoras de ratones AKR/J (Mtv-7+) y C3H/HeN (Mtv-7-), agregando células CD4+CD25+ purificadas por MACS de PP ratones infectados y se observó que estas células inhiben preferencialmente la proliferación de linfocitos T reactivos al Sag. A) Presentadoras AKR/J: 90% $\pm$ 5,2; B) Presentadoras C3H/HeN: 40% $\pm$ 10,3  $p<0,01$  (media del % de inhibición  $\pm$ DS, n=4). Además, utilizando transwells se observó que la supresión es dependiente de contacto. Por otra parte, ensayos de PCR radioactiva mostraron que la depleción de células CD25+ antes del inicio de la infección determina mayores niveles de infección, hecho que correlaciona con resultados previos que indican que en estas condiciones se produce una mayor respuesta al Sag. En cambio, cuando la depleción se realizó al día 6, se observaron menores niveles de infección viral. Estos resultados indican que las células Treg inducidas por el MMTV poseen capacidad supresora con un alto grado de especificidad. Además, los datos sugieren que en etapas tempranas de la infección las Treg podrían beneficiar al huésped controlando la respuesta al Sag. Por el contrario, en etapas más tardías podrían beneficiar al MMTV inhibiendo la respuesta citotóxica contra éste.

**0478. (0583) QUIMIOTAXIS DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA DE CÉLULAS B (LLC) EN RESPUESTA AL STROMAL CELL DERIVED FACTOR-1 (SDF-1): SU ASOCIACIÓN CON LOS FACTORES DE MAL PRONÓSTICO ZAP-70 Y CD38.** M Borge<sup>1</sup>, PR Nannini<sup>1</sup>, C Cañones<sup>1</sup>, P Morande<sup>1</sup>, RF Bezares<sup>2</sup>, J Sánchez Ávalos<sup>3</sup>, M Giordano<sup>1</sup>, R Gamberale<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Inmunología Oncológica, Instituto de Investigaciones Hematológicas (IIHema), Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina., 2 Policlínico Bancario y Hospital General de Agudos Dr. T. Alvarez, Buenos Aires, Argentina., 3 Hospital de Clínicas José de San Martín, Universidad de Buenos Aires, Argentina.*

La LLC se caracteriza por la acumulación de linfocitos B clonales. Los pacientes LLC cuyas células leucémicas expresan ZAP-70 y/o CD38, presentan una enfermedad agresiva (grupo de mal pronóstico, mp), mientras que la ausencia de ambos marcadores es característica de los pacientes con una enfermedad indolente (grupo de buen pronóstico, bp). Las células LLC proliferan en médula ósea, ganglios y bazo en contacto con células estromales y linfocitos T. Las células estromales producen SDF-1, una quemoquina que favorece la sobrevida y migración de las LLC, mientras que los linfocitos T brindan señales de sobrevida y proliferación al clon leucémico. Dado que los linfocitos T expresan el receptor para SDF-1, el CXCR4, el objetivo de este trabajo fue evaluar comparativamente la respuesta de los linfocitos T de ambos grupos de pacientes a dicha quemoquina. Realizamos ensayos de quimiotaxis en ausencia (control) o presencia de SDF-1 utilizando linfocitos T purificados con anticuerpos y perlas magnéticas a partir de células mononucleares totales de sangre periférica de pacientes LLC. Encontramos que los linfocitos T de los pacientes de bp (Tbp) migran significativamente menos que los linfocitos T de mp (Tmp) (%migración respecto al control, 203 $\pm$ 60 y 1450 $\pm$ 208 para Tbp y Tmp, n=5,  $p<0.05$ ), a pesar de poseer una expresión comparable de CXCR4 (MIF de CXCR4: 173 $\pm$ 32 y 180 $\pm$ 39, para Tbp y Tmp, n=5) evaluada por citometría de flujo. Asimismo, observamos que los linfocitos Tbp, pero no los Tmp, presentan una falla en la normal internalización del CXCR4 luego del tratamiento con SDF-1 (n=6,  $p<0.05$ ). En conclusión, nuestros resultados demuestran que los linfocitos Tbp poseen una menor capacidad de respuesta al SDF-1 en comparación a los linfocitos Tmp. Esto podría limitar la migración de los Tbp hacia ganglios, médula ósea y bazo, favoreciendo que las células LLC reciban menos señales de sobrevida y proliferación en comparación a los de mp.

## PREMIO CHERNY

- 0479. (0363) LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE MEMBRANA VACUOLAR 1 (VMP1) PROMUEVE LA FORMACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS Y PARTICIPA EN LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LA PANCREATITIS EXPERIMENTAL.** A Ropolo, D Grasso, R Pardo, ML Sacchetti, A Lo Re, LE Fabiano, MI Vaccaro

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

En trabajos previos caracterizamos a una nueva proteína de membrana (VMP1) cuya expresión induce la formación de vacuolas y es fuertemente activada en pancreatitis aguda, una enfermedad que presenta cambios morfológicos característicos de autofagia. El objetivo de este trabajo fue demostrar que la expresión de VMP1 promueve el proceso autofágico. Se construyeron plásmidos de expresión para VMP1-V5 y VMP1-EGFP, y un siRNA específico para VMP1. Los estudios se realizaron sobre las líneas celulares HeLa y 293T. Los resultados mostraron que la proteína de fusión fluorescente VMP1-EGFP se encuentra en la membrana de vacuolas inducidas por su expresión. La microscopía electrónica mostró que estas vacuolas tienen características ultraestructurales de autofagia. Por otro lado, el tratamiento con 3-MA, un inhibidor de autofagia, inhibió la formación de vacuolas inducida por la expresión de VMP1. Las células sometidas a ayuno o tratadas con rapamicina, tratamientos utilizados para inducir autofagia, activaron la expresión de VMP1. Los estudios mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal confirmaron que VMP1 está localizada en vacuolas autofágicas y colocaliza con LC3, un marcador específico de membrana de autofagosomas. En otra serie de experimentos en que la expresión de VMP1 fue silenciada mediante la estrategia siRNA, se comprobó que ni el ayuno ni el tratamiento con rapamicina indujeron autofagia, demostrando que la expresión de VMP1 es requerida para el proceso autofágico. Por último, estudios *in vivo* permitieron comprobar que VMP1 esta ubicada en la membrana del autofagosoma en la célula acinar durante la pancreatitis aguda experimental. En conclusión, la expresión de VMP1 induce la formación de autofagosomas, y es necesaria para la autofagia inducida por estímulos extracelulares. El hecho de que esta proteína esté implicada en la fisiopatología de la pancreatitis permitirá futuros estudios sobre el rol de la autofagia como respuesta celular a la enfermedad.

- 0480. (0383) ACIL-COA SINTETASA 4, UNA ENZIMA DEL METABOLISMO LIPÍDICO: ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE SU EXPRESIÓN Y DE SU IMPLICANCIA EN CÉLULAS TUMORALES.** P Maloberti, A Duarte, C Karles, I Neuman, J Mild, A Solano, F Cornejo Maciel, C Paz, EJ Podesta

*Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Metabólicas, Neurodegenerativas y Oncológicas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Previamente describimos una nueva vía de liberación de ácido araquidónico (AA) donde actúa la enzima acil-CoA sintetasa 4 (ACS4). En este trabajo estudiamos el rol de ACS4 en la proliferación, migración e invasión celular en líneas tumorales de cáncer de mama humano y la regulación transcripcional de esta enzima en células MA-10. Previamente demostramos que los niveles de ACS4 se incrementan en una línea de cáncer agresiva e invasiva. Aquí demostramos que en células MDA-MB-231, donde ACS4 se expresa en mayor medida, el AA intramitocondrial, medido por TLC, se encuentra aumentado comparado con la línea MCF7 de menor agresividad e invasividad. Se observó un incremento significativo en la proliferación celular, en células transfectadas con un vector conteniendo el ADNc de ACS4. Se midió la migración e invasión en células MCF7 transfectadas con ACS4 y en células controles. En los ensayos de heridas en placas, las células transfectadas con ACS4 presentan mayor porcentaje de

cierre de heridas y se observó que las células que sobre-expresan ACS4 invaden en mayor proporción la matriz de matrigel. Se estudiaron los niveles de mensajero de ACS4 observándose un incremento en presencia de 8Br-AMPC a partir de 3 hs en células MA-10. El promotor de ACS4 fue clonado en el vector pGL3-Basic. La medición de actividad de luciferasa determinó una significativa actividad basal del promotor que se incrementó en presencia de AMPc. Se observó mediante el estudio de la actividad del promotor con distintas delecciones, que la secuencia mínima que mantiene la actividad basal y la inducida por AMPc está contenida a partir de la base -150, que contiene los factores de transcripción CREB y Sp1. La desregulación de los niveles de ACS4 en células tumorales, junto con otros factores, favorecería la capacidad proliferativa e invasiva de las células. La sobreexpresión de esta enzima en distintos tipos tumorales con distinta agresividad apoyaría la validación de ACS4 como marcador tumoral temprano.

- 0481. (0388) LA INTERACCIÓN DE PKA, MEK Y ERK EN MITOCONDRIAS REGULA EL TRANSPORTE DE COLESTEROL PARA LA BIOSÍNTESIS DE ESTEROIDES.** C Poderoso<sup>1</sup>, DP Converso<sup>2</sup>, P Maloberti<sup>1</sup>, A Duarte<sup>1</sup>, I Neuman<sup>1</sup>, S Galli<sup>2</sup>, F Cornejo Maciel<sup>1</sup>, C Paz<sup>1</sup>, MC Carreras<sup>2</sup>, JJ Poderoso<sup>2</sup>, EJ Podesta<sup>1</sup>

*1 Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 2 Laboratorio del Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.*

ERK1/2 participan en la esteroidogénesis, aunque se desconoce su mecanismo no genómico de acción. Hormona/AMPC/PKA o EGF activan ERK; sin embargo, la máxima esteroidogénesis se consigue sólo en el primer caso. Demostramos la activación temporo-espacial diferencial de ERK1/2 por AMPc y EGF en células de Leydig murinas, MA-10. ERK activa, pero no mutada interactúa con la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory) para estimular el transporte de colesterol en mitocondrias. Únicamente en presencia de colesterol ERK1 fosforila a StAR en Serina232. La mutación de Serina (por Alanina, S232A) inhibe la fosforilación y la producción de progesterona, P4 (control: 6.5±1; AMPc: 32±4; AMPc+S232A: 14.8±2 ng P4/mgr de proteína, \*p<0,05). Mostramos por primera vez que ERK fosforila a StAR formando un complejo mitocondrial regulando el transporte de colesterol. Resaltamos el rol y la importancia de las MAPKs en mitocondrias en la esteroidogénesis y en otras funciones vinculadas a la utilización de colesterol.

- 0482. (0621) RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP) Y DE ESTRÓGENOS (RE) DE MEMBRANA EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS.** MC Bottino, P Rojas, RC Soldati, C Mondillo, S Giulianelli, OP Pignataro, JC Calvo, I Lüthy, C Lanari

*Instituto de Biología y Medicina Experimental*

Los progestágenos y los estrógenos ejercen su acción a través de receptores clásicos que actúan como factores de transcripción (acción genómica) y también inducen respuestas rápidas no genómicas, por receptores cuya naturaleza es controversial. Actualmente se han descrito diversos receptores de esteroides en la membrana celular. Nuestro grupo ha observado la presencia de ambas isoformas de RP clásicos en la membrana de carcinomas mamarios murinos que crecen con acetato de medroxiprogesterona (MPA) y que regresionan con RU 486, y además los RP no clásicos (alfa, beta y gama). También hemos descrito acciones rápidas, no genómicas como activación de MAPK, mediadas tanto por MPA como por RU 486. El objetivo de este trabajo fue a) evaluar la expresión de receptores de estrógenos alfa clásicos (REa) en la membrana de estos carcinomas mamarios b) confirmar la expresión de RP clásicos en membrana con anticuerpos anti pSer190RP y c) investigar si concentraciones subgenómicas de RU486 podrían actuar como agonistas en la proliferación celular mediada por MPA. En extractos de membrana tumorales purificados, además de ambas isoformas de RP, detectamos ERA

por Western Blot. Estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal demostraron localización de REa y pSer118 REa en membrana. El RU 486 aumentó la proliferación celular evaluada por incorporación de timidina tritiada a concentraciones menores de 1 nM, subgenómicas, y potenció la estimulación inducida por MPA ( $p < 0.05$ ) mientras que a mayores concentraciones, genómicas, resultó inhibitorio ( $p < 0.001$ ). Dado que los RP no clásicos de membrana no unen RU 486, proponemos que los RP clásicos ubicados en la membrana celular son los desencadenantes de los efectos agonistas de MPA y RU 486 generando efectos no genómicos. A concentraciones mayores, la activación de estas vías sensibilizaría a las células frente a señales posteriores que finalmente determinarían la proliferación o la inhibición del crecimiento.

**0483. (0687) EL RECLUTAMIENTO DIFERENCIAL DE INMUNOFILINAS AL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES DETERMINA SU RETROTRANSPORTE DEPENDIENTE DE HSP90, SU DISTRIBUCIÓN NUCLEAR Y LA POTENCIA DE SU ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL.** LI Gallo<sup>1</sup>, AA Ghini<sup>2</sup>, G Piwien Pilipuk<sup>1</sup>, MD Galigniana<sup>1</sup>

*1 Fundación Instituto Leloir, 2 Depto. de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA/ UMYMFOR-CONICET*

El receptor de mineralocorticoides (MR) existe como un oligómero con hsp90, hsp70, p23 y una inmunofilina de alto PM (IMM). Las IMMs se unen a hsp90 vía sus dominios TPR, existiendo un sitio TPR por dímero de hsp90. Ésto implica que hay sólo una IMM (FKBP52, FKBP51 o PP5) por molécula de MR. Las IMMs también poseen un dominio que une dineína. La función biológica de las IMMs asociadas a MR es desconocida. Aquí demostramos que MR recluta a FKBP52 y dineína cuando une aldosterona (Aldo). Mientras que PP5 no se afecta en el complejo, FKBP51 es disociada. La unión del agonista sintético 11,19-óxido progesterona (11-OP) también recluta FKBP52 y dineína pero en menor cuantía, se recluta PP5 y queda cierta cantidad de FKBP51. Es decir, la cantidad y naturaleza de las IMMs asociadas a MR depende del esteroide unido. La proteólisis controlada de MR demostró que ambos agonistas inducen cambios conformacionales diferenciales, lo que se traduce en interacciones proteína-proteína diferentes. FKBP51 no une dineína y mostró efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional de MR. Ello explica su disociación de MR cuando éste se activa. Como consecuencia del ying-yang de IMMs, la velocidad de translocación al núcleo de 11-OP-MR es menor que para Aldo-MR. En ambos casos, el movimiento hacia el núcleo es inhibido por el inhibidor de hsp90 geldanamicina, lo que demuestra la dependencia de MR con el sistema hsp90•IMM•dineína. Por microscopía confocal se vió que FKBP52 colocaliza con MR en el núcleo, lo que no es tan evidente para FKBP51 a menos que se sobreexpresa. En conclusión, el retrotransporte de MR ocurre vía hsp90•FKBP52•dineína. Las IMMs también actúan como reguladoras de MR a nivel transcripcional. Contrariamente a lo aceptado durante años, nuestro modelo implica que hsp90 no debería disociarse de MR cuando éste se activa en el citoplasma con la hormona

## INMUNOLOGÍA VIII

**0484. (0134) ANTICUERPOS CONTRA RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN PACIENTES PORTADORES DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS HUMANOS.** MC Middonna<sup>1</sup>, G Fiszman<sup>1</sup>, ME Azar<sup>1</sup>, M Cresta<sup>1</sup>, E de la Torre<sup>2</sup>, A Español<sup>2</sup>, MP Negroni<sup>2</sup>, ME Sales<sup>2</sup>

*1 Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Facultad de Medicina. UBA, 2 CEFYBO-CONICET*

En nuestro laboratorio describimos la presencia de autoanticuerpos contra receptores muscarínicos (RM) en portadores de tumores mamarios murinos que estimulan la proliferación celular y la angiogénesis. En otras patologías como el síndrome de

Sjögren y el SIDA, se ha demostrado que estos receptores pueden ser blancos de la respuesta inmune humoral. Previamente observamos que el tejido tumoral de mama humana expresa RM funcionales, ausentes en tejido mamario normal. El agonista muscarínico carbacol (CARB) ( $10^{-9}$ M) estimula en un 48% ( $p < 0,05$ ;  $n=8$ ) la proliferación de células MCF-7 derivadas de un adenocarcinoma mamario humano, por activación de receptores del subtipo  $M_3$ . En este trabajo investigamos el efecto de la IgG purificada de pacientes con adenocarcinomas mamarios en estadios I y II en comparación con IgG normal o de pacientes con fibroadenoma benigno de mama (FAB) como controles, sobre la proliferación de células MCF-7 por el método colorimétrico de reducción de MTS a formazán. La IgG purificada del suero en estadio I (T1N0Mx) sin metástasis ganglionares, produce un potente efecto estimulante, aproximadamente del 50% ( $p < 0,05$ ;  $n=3$ ) comparable a la dosis efectiva máxima del agonista CARB. El 75% del efecto se revierte en presencia del antagonista muscarínico atropina (AT) ( $10^{-5}$ M). La IgG de pacientes en estadio II (T2N0Mx) incrementó significativamente la proliferación de células MCF-7 (40%;  $p < 0,05$ ;  $n=3$ ) pero su efecto no se redujo con AT lo que implica que los RM no participan en el efecto observado. La IgG de FAB no produjo un efecto significativo sobre la proliferación de células MCF-7 y la IgG normal estimuló un 30% ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) la proliferación y la AT redujo sólo en un 50% el efecto observado. Concluimos que existe una fracción de anticuerpos con actividad muscarínica en pacientes con adenocarcinomas mamarios humanos en estadios tempranos que promovería la progresión tumoral.

**0485. (0281) INTERACCION ENTRE PMN Y CÉLULAS LP07. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS QUE REGULAN LA RESPUESTA INFLAMATORIA.** R Karas, G Peluffo, SM Klein, MJ Diamant

*Área Investigación, Instituto de Oncología Ángel H Roffo, UBA*

Los PMN estimulan el crecimiento del tumor LP07 y sus metástasis. Tratamientos in vivo con un antiinflamatorio, Indometacina (Indo, 10 ug/mL) y un agonista de PPARgamma, Rosiglitazona (Rosi, 18.2 ug/mL), modificaron la progresión del tumor LP07. Estudiamos la interacción de PMNs con células LP07 (cLP07), y el efecto de los tratamientos sobre la actividad de los PMNs en portadores de LP07 (PLP07). Ratones BALB/c inoculados con  $3 \times 10^5$  cLP07 sc se trataron desde el día 0 con: A: Indo, B: Rosi, C: vehículo, D: ratón normal. Al día 20 se obtuvieron PMN de cavidad peritoneal. **Resultados:** El coinóculo iv. de PMN y cLP07 (10:1 y 50:1) mostró un incremento del número de metástasis respecto de cLP07 solas ( $n^\circ$  de veces): 10:1 A: 0, B: 1,75 ( $p=0.04$ ), C: 1,8, D: 3,15 ( $p=0.002$ ). 50:1: A: 4,5; B: 11; C: 6,4; D: 8 (B, C, D, A:  $p < 0.01$ ). El mismo efecto favorecedor de las metástasis experimentales, se observó con el coinóculo de PMN-C y D con células LM3 (tumor de mama) (50:1 y 10:1). El medio condicionado (MC) de cLP07 aumentó la viabilidad de los PMN-D (92%,  $p < 0.001$ ) y A (39%,  $p < 0.01$ ) respecto a PMN solos. En cámaras Transwell PMN-C y B promovieron una mayor invasión de cLP07 ( $13 \pm 2$  células/campo) (vs. Control  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ). Se observó una mayor adherencia al plástico en PMN-D (vs. A, B, C  $p < 0.05$ ). El estímulo con PMA sólo disminuyó la adhesión en A (vs D  $p < 0.001$ ). La actividad de MPO mostró un pico máximo con PMN-D y uno menor con PMN-A. La concentración de PGE2 en MC-PMN fue similar en todos los grupos. **Conclusión:** Los PMN estimulan el desarrollo de metástasis artificiales. Los tratamientos con Rosi o Indo modulan la actividad de los PMNs de PLP07, observado por el número de metástasis. Varían la capacidad de inducir invasión de las cLP07 en cámaras Transwell, su adhesión al plástico, actividad de MPO y sobrevivida cuando son tratados in vitro con MC-cLP07. Los PMNs participan en la regulación del desarrollo tumoral que puede ser modificada por los tratamientos descritos.

**0486. (0493) EL SUPERANTÍGENO B PLP ES CAPAZ DE ACTIVAR CÉLULAS NEOPLÁSICAS B Y DE PRODUCIR UN**

**AUMENTO EN LOS NIVELES DE APOPTOSIS TANTO IN VITRO COMO IN VIVO.** D Lorenzo, J Mundiñano, G Camicia, AF Maglioco, I Nepomnaschy, I Piazzon

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

Los superantígenos B (Sags) son proteínas de origen viral o bacteriano que a diferencia de los antígenos convencionales estimulan a un alto número de linfocitos B (LB) debido a que interactúan con sitios constantes de las regiones variables del receptor B (BCR). Los Sags activan LB normales, producen una disminución en los niveles de expresión del BCR e inducen la depleción apoptótica de las células reactivas. La proteína L (Plp) de *Peptostreptococcus magnus*, un Sag B, interactúa con los LB cuyo receptor de superficie expresa la cadena liviana k. Nuestro objetivo fue investigar los efectos que produce Plp sobre células neoplásicas B k+. Para esto utilizamos la línea celular A20 y un linfoma B (LBK) surgido espontáneamente en un ratón BALB/c. Luego de una hora de cultivo de estos linfomas con Plp observamos por FACS una disminución significativa en la media de intensidad de fluorescencia (MFI) de k con respecto al control (MFI±SD(n): A20+Plp 221,26±46,2(3), A20+PBS 319,3±3,77(3), p<0,05; LBK+Plp 206,13±3,16(3), LBK+PBS 1617,07±149,4(3), p<0,0001). Utilizando ioduro de propidio se observaron aumentos significativos en el % de células hipodiploides luego de 72 hs de cultivo (%±SD(n): A20+ Plp 30,4±1,36(3), A20+ PBS 24,31±3,83(3), p<0,05; LBK+ Plp 23,78±1,02(3), LBK+ PBS 17,94±0,63(3), p<0,002). Se realizaron estudios in vivo inoculando células A20 marcadas con el colorante CFSE junto con Plp en la almohadilla plantar. Se extrajeron los ganglios poplíteos drenantes 24 hs después de la inoculación del Sag y se realizó la marcación de las células con Anexina-7AAD. Se observó un aumento significativo en los niveles de apoptosis en las células CFSE+ (%anexina±SD(n): A20+Plp 54,8±2,82(3), A20+PBS 39,2±1,074(3), p<0,05). Estos resultados sugieren que -al igual que ocurre con células B normales- Plp es capaz de estimular a las células neoplásicas B produciendo una disminución en los niveles de expresión del BCR y posteriormente aumentando los niveles de apoptosis.

**0487. (0578) PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA ALTERACIÓN DE LA INMUNIDAD INDUCIDA POR LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO RESTRICTIVO, Y SU PAPEL EN EL CRECIMIENTO TUMORAL.** LR Frick, AM Genaro, GA Cremaschi

*CEFYO-UBA-CONICET*

La exposición crónica al estrés produce desregulaciones de los ejes neuroendócrinos y alteraciones de la respuesta inmune. Las hormonas del estrés son por excelencia los glucocorticoides (GC) y las catecolaminas (CA), que a su vez participan en el control del sistema inmune. Las hormonas tiroideas (HT) también modulan la respuesta inmune, pero no han sido tan estudiadas en relación al estrés. Aquí analizamos la participación de estas hormonas en las alteraciones en la inmunidad antitumoral inducidas por el estrés. Se utilizó un modelo de linfoma T singeico en ratones BALB/c sometidos o no a estrés crónico restrictivo (CRS). Se observó un aumento del volumen tumoral en animales CRS (150% al día 10, p<0,01). Además, se observó una reducción del 51% (p<0,01) de la proliferación T inducida por mitógenos en ratones CRS, evaluada por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Los niveles plasmáticos de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> evaluados por RIA estaban reducidos en los animales CRS comparado con los controles (19% y 28%; p<0,05 y p<0,01 respectivamente). No se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de corticosterona en animales CRS (67,75 ± 10,82 ng/ml) y control (74,33 ± 11,45 ng/ml) medidos por HPLC. Tampoco se observó cambio alguno en los niveles de noradrenalina medidos por ensayos fluorométricos en bazo de animales CRS (71,33 ± 6,39 ng/g tejido) y control (73,97 ± 6,98 ng/g tejido). Finalmente, evaluamos si la terapia de reemplazo con HT en animales CRS es capaz de revertir el deterioro en la proliferación de células T. La administra-

ción de T<sub>4</sub> normalizó los valores de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> (p<0,05 y p<0,01 respectivamente). Este tratamiento también restituyó los niveles normales de proliferación linfocitaria de células T y el crecimiento tumoral. Estos resultados indican que el estrés crónico deteriora la inmunidad antitumoral mediada por células T; y que las HT, pero no los GC ni las CA, son los principales reguladores neuroendócrinos de estos efectos.

**0488. (0412) SUPERANTÍGENOS Y LINFOMAS T. II. REVERSIÓN DE LA MODULACIÓN NEGATIVA DE FAS POR EL TRATAMIENTO CON SUPERANTÍGENOS EN LINFOMAS T MURINOS.** J Mundiñano, D Lorenzo, G Cabrera, HL Costa, I Nepomnaschy, I Piazzon

*ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina*

Los superantígenos (Sag) inducen la apoptosis de linfocitos T (LT) que expresan determinadas cadenas Vβ del receptor T (TCR). La principal vía en la apoptosis de los LT normales involucra la interacción Fas-FasL. Hemos demostrado que el tratamiento in vitro de timomas espontáneos (T) de ratones AKR/J con Sags que interactúan específicamente con la cadena Vβ del TCR induce la apoptosis de los mismos por la vía Fas-FasL. La pérdida de expresión de Fas o de su funcionalidad ha sido reportada en células neoplásicas como mecanismo de escape a la vigilancia inmunológica. El objetivo de este trabajo fue investigar si el tratamiento in vivo con Sags induce alteraciones en los niveles de expresión de Fas y FasL en estos timomas. En primer lugar investigamos la expresión de Fas en los timomas. Observamos por FACS una disminución en los niveles de expresión de Fas en los T tanto con respecto a timocitos de ratones menores de 5 meses (TJ) como a mayores de 7 meses (TV) (Tabla; \*\*p<0,01, \*p<0,05). Para investigar si los Sags pueden modular in vivo los niveles de expresión de Fas y FasL en los T, inoculamos por vía ip células neoplásicas T8 (Vβ8+) marcadas con CFSE y el Sag SEB en ratones normales. Observamos un aumento significativo en los niveles de expresión de Fas (Media de intensidad de fluorescencia (MFI)±SD) por el tratamiento con SEB (67±16 vs 13.1±5, p<0,05) y en el porcentaje de células FasL+. Estos resultados correlacionan con aumentos en la apoptosis. **Resultados.** similares fueron observados en otros T. Los resultados demuestran que aun cuando los timomas presentan disminuida la expresión de Fas, los Sags son capaces de inducir aumentos en la misma y sugieren que la vía de Fas-FasL estaría involucrada en la apoptosis in vivo de neoplasias T murinas inducida por Sags. Tabla: Nivel de expresión de Fas en poblaciones CD4 y/o CD8 (MFI±SD)

	CD4+CD8+	CD4+	CD8+
TJ	205,9±62**	112,89±32**	100,8±47**
TV	226,2±74**	63,02±48*	78,61±7,8*
T	11,1±15	28,5±18	3,56±0,3

**0489. (0318) RESPUESTA AL SUPERANTÍGENO Y CÉLULAS T REGULATORIAS EN LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO.** G Cabrera<sup>1</sup>, D Burzyn<sup>1</sup>, C Courreges<sup>2</sup>, J Mundiñano<sup>1</sup>, S Ross<sup>2</sup>, I Nepomnaschy<sup>1</sup>, I Piazzon<sup>1</sup>

*1 ILEX-CONICET. División Medicina Experimental, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina de Argentina, 2 Department of Microbiology and Abramson Family Cancer Center, University of Pennsylvania*

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es un retrovirus que se transmite durante la lactancia y se beneficia del sistema inmune para establecer la infección. En las placas de Peyer (PP), la presentación de un Sag viral por células dendríticas (CDs) y células B infectadas a células T con un receptor Vβ que reconoce al Sag es un evento crítico para la amplificación viral. Habíamos determinado que en las (PP) de ratones neonatos se produ-

ce un aumento de células Treg CD25+CD4+Foxp3+ durante la primera semana de infección. En este trabajo demostramos por citometría de flujo que durante el mismo período se producen incrementos significativos en el número de células Treg que responden al Sag viral Vβ6+CD4+Foxp3+ P.ej. día 6: infectados (A): 2,83±0,3; no infectados (B): 0,19±0,08; p<0,005; (media del número absoluto/PP x10-3±DS, n=4). No se encontraron diferencias en el número de células que no responden al Sag. Los incrementos en células Treg son dependientes de la presencia de células T reactivas al Sag, ya que en ratones Vβ6- no se producen incrementos en el número de células Treg CD25+CD4+Foxp3+. Utilizando ratones transgénicos en los cuales puede inducirse la ablación transiente de CDs, mostramos que en ausencia de CDs no se producen incrementos en células Treg. Por último, experimentos de depleción de células CD25+ indican que la ausencia de estas células antes de la infección permite una mayor respuesta al Sag. Así, al día 6 de infección se observó un incremento en el número de células efectoras Vβ6+CD4+Foxp3-: A) infectados no depletados 21,9 ±4,5; B) infectados depletados 57,9±18,2; p<0,05 (media del número absoluto/PP x10-3±DS, n=4). Nuestros resultados indican que la infección con MMTV induce incrementos en células Treg específicas para el Sag viral. Dichos incrementos no solo dependen de la presencia de células T reactivas al Sag sino también de CDs. Las células Treg podrían ser importantes en el inicio de la infección controlando la respuesta la Sag.

**0490. (0413) SUPERANTÍGENOS Y LINFOMAS T. I. EL TRATAMIENTO CON SUPERANTÍGENOS ES CAPAZ DE INDUCIR LA APOPTOSIS IN VIVO DE NEOPLASIAS T MURINAS.** J Mundiñano, D Lorenzo, G Cabrera, I Nepomnaschy, I Piazzon

*ILEX-CONICET, División Medicina Experimental, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina*

Los superantígenos (Sag) inducen la proliferación y apoptosis de linfocitos T que poseen determinadas cadenas Vβ del receptor T (TCR). Hemos demostrado que diferentes Sags bacterianos como SEB (reconocido por la cadena Vβ8) o SEI (reconocido por la cadena Vβ5) y Sags codificados por los Virus del Tumor Mamario Murino son capaces de inducir específicamente la proliferación y apoptosis in vitro de linfomas T murinos. Para investigar la capacidad de los Sags de inducir la proliferación y apoptosis in vivo de linfomas T, inoculamos por vía ip células neoplásicas T8 (Vβ8+) marcadas con CFSE en ratones singeneicos. A diferentes días post tratamiento se recuperaron las células neoplásicas. Observamos por FACS una disminución significativa en la media de intensidad de fluorescencia (MFI) de las células CFSE+ recuperadas de animales tratados con SEB indicando un aumento en la proliferación (MFI ±SD: T8+SEB 36.15±1.6\*, T8+SEI 58.1±1.8, T8+PBS 61.3±2.67, \*p<0,05). Paralelamente encontramos un aumento significativo en la apoptosis (% células anexina±SD) (T8+SEB 18,3±2,8\*; T8+SEI 9,1±0,6; T8 +PBS 9,2±0,6; \*p<0,05). **Resultados** similares fueron observados cuando el linfoma T5 (Vβ5+) se trató con SEI. Adicionalmente cuando células neoplásicas T fueron inoculadas en la almohadilla plantar junto con Sags específicos observamos un aumento en la apoptosis tanto por FACS –utilizando yoduro de propidio– como por la técnica de TUNEL realizada sobre cortes histológicos de los ganglios poplíteos drenantes. Por otro lado, observamos en estos cortes teñidos con hematoxilina & eosina un menor infiltrado de células neoplásicas y conservación de la arquitectura normal del ganglio en los animales tratados con Sags específicos respecto a los controles. Los resultados obtenidos muestran que los Sags son capaces de inducir específicamente la proliferación y apoptosis de neoplasias T in vivo.

**0491. (0414) VARIACIONES EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS CARBOHIDRATOS Y MUCINAS EN EL CÁNCER DE MAMA.** M Crespo<sup>1</sup>, SO Demichelis<sup>1</sup>, MT Isla Larrain<sup>1</sup>, A Barbera<sup>2</sup>, A Cretón<sup>2</sup>, F Terrier<sup>2</sup>, N Giacomí<sup>2</sup>, A Segal-Eiras<sup>1</sup>, MV Croce<sup>1</sup>. <sup>1</sup> Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. La

Plata, Buenos Aires, Argentina, 2 Fundación Breast, Clínica de la mama, La Plata

Las mucinas epiteliales son glicoproteínas identificadas como antígenos asociados a tumor, caracterizadas por alteraciones en la glicosilación con la aparición de nuevos epitopes involucrados en la diseminación tumoral. **Objetivos:** comparar la expresión de epitopes carbohidratos y mucinas en el cáncer de mama. **Materiales:** 50 muestras de carcinoma ductal infiltrante, 20 neoplasias benignas y 18 normales. Anticuerpos (Ac) utilizados: anti-MUC1 (C595, HFMG2, SM3 y CT33), MUC2 (PMH1); MUC4, Tn, siaiil Lewis x, (sLe x, KM93), Lewis x, (Le x, KM380) y Lewis y (Le y, C14). **Métodos:** Inmunohistoquímica estándar con recuperación antigénica; se analizó el porcentaje, la intensidad (negativo, positivo débil, medio y fuerte) de reacción y el patrón: de membrana, citoplásmico, mixto, apical y no apical. Los datos estandarizados fueron analizados estadísticamente mediante análisis multivariado con componente principal (PCA). **Resultados:** MUC1 fue positivo en 96% de los carcinomas, 100% de las neoplasias benignas y 94% en normales con un patrón de expresión no apical y citoplásmico en el cáncer y principalmente apical y de membrana en muestras benignas y normales; MUC4, 46%, 20% y 55%, respectivamente, con un patrón citoplásmico y no apical; MUC2, 56%, 80% y 0%, siendo más intenso y citoplásmico en las muestras de tumores malignos. Tn reaccionó 28%, 15% y 33%, respectivamente con un patrón variado mientras que sLe x fue positivo en el 34%, 15% y 27%; Le x, 36%, 85% y el 77% y Le y, 33%, 21% y 26%, respectivamente. En estos tres últimos epitopes, la expresión fue principalmente citoplásmica y no apical en cáncer y de membrana y apical en las muestras no malignas. Por PCA, considerando la expresión porcentual y patrón apical para cada Ac, se diferenciaron dos grupos: a) cáncer de mama, b) benignas y normales, (resolviendo el 52% de los datos). Conclusiones: La aparición de una neoplasia cambia el patrón de expresión de los antígenos seleccionados en la glándula mamaria.

**0492. (0420) OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPOS QUE RECONOCEN AL ANTÍGENO DE THOMSEN-FRIEDENREICH E INHIBEN LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE TUMORES EPITELIALES.** VG Sendra, FJ Irazoqui

*CIQUIBIC-CONICET/Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.*

Las cadenas de O-glicanos del tipo mucinas se encuentran frecuentemente sobre-expresadas y aberrantemente glicosiladas en células de tumores epiteliales. La estructura core 1 (Galbeta1-3GalNAcalpha-O-Ser/Thr) de O-glicanos, conocido como antígeno de Thomsen-Friedenreich (antígeno T), es un residuo normalmente críptico que se expone en células tumorales debido a una trunca expresión de glicanos. La lectina de *Agaricus bisporus* (ABL), es una proteína que reconoce principalmente al antígeno T, y posee además la característica de ser un inhibidor de la proliferación de células de tumores epiteliales. En el presente trabajo se desarrollaron anticuerpos anti-idiotipos con el propósito de obtener anticuerpos con una especificidad de reconocimiento glucídico similar a ABL. Aquí se realizó una purificación de ABL por cromatografía de afinidad, la que se utilizó como primer molde en la generación de anticuerpos. Se inmunizaron conejos con ABL, lo que produjo altos títulos de anticuerpos que fueron cuantificados por ELISA. Luego se purificaron IgGs de conejo no inmune y anti-ABL mediante la utilización de proteína G-sepharosa. La fracción de IgG total anti-ABL fue ofrecida a una columna cromatográfica de ABL-sepharosa para purificar la fracción específica de IgG anti-ABL. Estas IgGs fueron conjugadas a KLH succiniladas y utilizadas como inmunógenos en ratones, a los que se les estudió la respuesta inmune humoral. Los anticuerpos así obtenidos (IgG e IgM) fueron capaces de reconocer antígenos asociados a tumores como antígenos T y Tn. Dicha interacción fue inhibida por estructuras glucídicas relacionadas a los antígenos tumorales. Estos anticuerpos también mostraron capacidad de reconocer células tumorales (MCF7 y HT29), interacción que fue parcialmente inhibida por moléculas relacionadas al antígeno T.

Los anticuerpos anti-idiotipos aquí generados mostraron un definido efecto inhibitorio en la proliferación de líneas de tumores epiteliales como HT29 y MCF7.

**0493. (0072) EFECTO DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-CSF) SOBRE LA PROGRESIÓN DE UN TUMOR MAMARIO MURINO.** VJ Marino<sup>1</sup>, E Zotta<sup>2</sup>, LP Roguin<sup>1</sup>

*1 IQUIFIB (UBA-CONICET). Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina, 2 Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina, Buenos Aires, Argentina*

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) es una citoquina, comúnmente utilizada en pacientes con neutropenia, que estimula la proliferación y diferenciación de precursores mieloides. Estudios recientes han sugerido que el G-CSF podría ejercer un efecto antitumoral, aunque su mecanismo de acción no ha sido aún esclarecido. Con el propósito de evaluar su efecto *in vivo*, se inocularon ratones BALB/c, por vía subcutánea, con  $3 \times 10^5$  células LM3 derivadas de un tumor mamario. A partir del día 7, se administraron diariamente durante 3 semanas, 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de G-CSF por vía subcutánea en las proximidades del tumor. El tamaño de los tumores y el número de leucocitos en sangre se evaluaron a lo largo del tratamiento. Al finalizar el mismo, los tumores fueron medidos, pesados y analizados histológicamente. Los resultados mostraron que la administración de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de G-CSF redujo en un 70% ( $p < 0.01$ ) el volumen tumoral, sin modificar los valores sanguíneos de leucocitos. Asimismo, el examen histológico reveló la presencia de infiltrado inflamatorio en el frente de crecimiento de tumores tratados. Cuando se estudió el perfil de secreción de 22 citoquinas en lisados de células tumorales (Cytokine Array) se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de IL-12, IL-13 y TNF- $\alpha$  en muestras provenientes de animales tratados. Por otro lado, ensayos *in vitro* revelaron que aunque las células LM3 expresan receptores para G-CSF, el agregado de citoquina no modificó el crecimiento celular. En conclusión, el G-CSF inhibió el crecimiento tumoral *in vivo*, aunque no afectó la proliferación *in vitro* de células LM3. Estos resultados, junto con la presencia de infiltrado inflamatorio y el incremento en los niveles de expresión de algunas citoquinas, sugieren la inducción de una respuesta inmune antitumoral. Experimentos adicionales ayudarán a dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la acción citotóxica inducida por el G-CSF.

**0494. (0561) MODELO TEÓRICO DE LA INTERACCIÓN DEL LINFOMA L-TACB EN PROGRESIÓN CON EL SISTEMA INMUNE Y EL EFECTO DE UNA DOSIS BAJA DE CICLOFOSFAMIDA.** MJ Rico<sup>1</sup>, MF Zacarías Fluck<sup>1</sup>, P Mar-  
tar<sup>1</sup>, GA Rabinovich<sup>2</sup>, OG Scharovsky<sup>1,3</sup>

*1 Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R., Rosario, 2 Laboratorio de Inmunopatología, IBYME-CONICET, Buenos Aires, 3 Consejo de Investigaciones U.N.R.*

El objetivo del presente trabajo fue construir un modelo teórico que explique el crecimiento del L-TACB en huéspedes inmunocompetentes en base a resultados obtenidos previamente. Los mismos se obtuvieron desafiando ratas e con L-TACB s.c. Los animales se dividieron en: tratados con ciclofosfamida (Cy) y testigos. Se extirparon tumor 1ario, bazo y metástasis. Se cuantificó IL-10 (ELISA) y el receptor de IL-10 (IL-10R) [CELISA, Western Blot (WB) y RT-PCR]. Se determinó la expresión de Galectina-1 (Gal-1) y de Bcl-2 (WB) y los linfocitos T reguladores (Treg) (citometría de flujo). Se midió la concentración de IL-2, IFN- $\gamma$  IL-10, TGF- $\beta$  (ELISA). Los animales portadores de L-TACB presentaron un perfil de citocinas TH2. Durante el crecimiento tumoral se detectó incremento de los niveles de IL-10 y TGF- $\alpha$ , bajos niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$ , aumento en la población de las Treg naturales e inducidas, e inhibición de la proliferación linfocitaria. Aumentó la expresión tumoral de Gal-1 y ésta indujo la muerte de linfocitos T activados, con mayor detrimento de la respuesta inmune (RI). La

RI deprimida permitió el crecimiento del tumor y de células metastásicas que expresaban IL-10 e IL-10R, existiendo estimulación auto- y paracrina de las mismas, no así del tumor. El tratamiento con una dosis baja y única de Cy, cambió el perfil de citocinas a TH1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y disminuyó las poblaciones Treg, lo que restauró la linfoproliferación. La disminución de IL-10 e IL-10R inhibió la estimulación auto- y paracrina de células metastásicas. La expresión tumoral de Gal-1 y de Bcl-2 fue regulada negativamente, disminuyendo la apoptosis de las células inmunes. La restauración de la RI específica y el efecto citotóxico directo de IFN- $\gamma$  inhibieron el crecimiento metastásico. Este modelo teórico, si bien incompleto, permite comprender algunos de los mecanismos por los cuales tumor y metástasis crecen aún en presencia de una respuesta inmune, así como el mecanismo de acción antitumoral de Cy.

**0495. (0795) INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS (IDP) Y PATOLOGÍA ONCOLÓGICA.** MP Portnoy<sup>1</sup>, N Basile<sup>1</sup>, M Oleastro<sup>1</sup>, SD Rosenzweig<sup>1</sup>, G Chantada<sup>2</sup>, P Zubizarreta<sup>2</sup>, MT Dávila<sup>3</sup>, M Zelazko<sup>1</sup>

*1 Servicio de Inmunología Hospital de Pediatría SAMIC J P Garrahan, 2 Servicio de Oncología Hospital de Pediatría SAMIC J P Garrahan, 3 Servicio de Anatomía Patológica Hospital de Pediatría SAMIC J P Garrahan*

**Introducción:** Es conocido el mayor riesgo a padecer neoplasias en pacientes (p) con IDP, condicionado por factores como infecciones, estimulación antigénica crónica, inestabilidad cromosómica y alteración en mecanismos de vigilancia inmunológica. **Objetivos:** Describir la experiencia en patología oncológica en p pediátricos con IDP en nuestra institución. **Materiales y Métodos:** Se analizaron retrospectivamente historias clínicas de p con diagnóstico (dg) de neoplasia e IDP (Agosto/1987–Agosto/2007). **Resultados:** Sobre 484p con IDP registrados, 12 (2,47%) presentaron enfermedad maligna a una edad media de 8.85 años (rango 1.07-16.63). El dg tumoral se realizó en 2p antes del de IDP y en 1p post-mortem. En 9 casos (75%) la patología oncológica correspondió a Linfoma B: 2p con Déficit de PNP, 4p con Ataxia Telangiectasia (AT), 1p con Inmunodeficiencia Común Variable, 1p con Síndrome Linfoproliferativo ligado al X y 1p con Hipoplasia Cartílago Pelo. El resto correspondió a Linfoma de Hodgkin (LH) en 1p con Agamaglobulinemia no caracterizada, hepatocarcinoma en 1p con AT y hepatoblastoma en 1p con Agamaglobulinemia ligada al X. Las localizaciones primarias de los linfomas B fueron cavum (2p), ganglios abdominales (3p) y cervicales (4p), y hepática en el LH. Seis p (50%) fallecieron: 1p inmediatamente luego del dg tumoral sin posibilidad terapéutica, 1p sin dg conocido de cáncer y 4p intra-tratamiento oncológico. Los restantes 6 casos recibieron tratamiento adecuado adaptado a la patología de base, obteniéndose remisión completa (60% de p tratados). **Conclusiones:** La incidencia tumoral maligna es mayor en IDP asociada a inestabilidad cromosómica (AT), coincidiendo con los datos publicados. En nuestra serie los linfomas B son las neoplasias más frecuentes considerando las IDP en conjunto y a la AT en particular a diferencia de registros internacionales. Es alentadora la respuesta al tratamiento modificado individualmente, tendiente a lograr la remisión reduciendo efectos tóxicos.

**0496. (0820) PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS DE MAPK Y NFkB EN LOS MECANISMOS DE SOBREVIDA DE LÍNEAS TUMORALES PANCREÁTICAS HUMANAS RESISTENTES A IFN DE TIPO I.** D Papademetrio, V Cavaliere, J Alicino, G Blanco, E Alvarez

*Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IDEHU – CONICET. e-mail: dpapademetrio@ffybu.uba.ar*

Varios tumores presentan resistencia al tratamiento con IFN-I. La supervida tumoral está asociada al desbalance de las señales proliferativas por la activación constitutiva de NF $\kappa$ B y MAPK, entre otros. Los objetivos fueron analizar si las vías MAPK y NF $\kappa$ B están involucradas en la supervida de las líneas tumorales pancreáticas PANC-1 (P1) y MIAPaCa-2 (M2), y evaluar efectos

sinérgicos de los IFN-I con inhibidores de las vías. Por WB se evaluó la modulación de ERK por IFN-I y su efecto en la sobrevida celular. Se halló un aumento de ERK-P al min. de tratamiento con IFN  $\alpha$ 2b (1000UI/ml) y por una inhibición del crecimiento de P1 de (45 $\pm$ 17)% para IFN- $\alpha$  y (53 $\pm$ 3)% para IFN- $\beta$  ( $p < 0,001$ ) por ensayos de 3H-T (48hs). M2 mostró una inhibición de (55 $\pm$ 17)% para IFN- $\alpha$  y (68 $\pm$ 2)% para IFN- $\beta$  ( $p < 0,001$ ), valores que no aumentaron a dosis mayores. El estudio de la sensibilidad frente a UO126, inhibidor de MEK1/2, mostró una inhibición máxima de (61 $\pm$ 3)% a 48hs [16 $\mu$ M] sobre P1 y (98 $\pm$ 1)% para M2 tratadas [8  $\mu$ M], ( $p < 0,001$ ). El tratamiento con CAPE, inhibidor de NF $\kappa$ B, mostró una inhibición del (65 $\pm$ 7)% y (85 $\pm$ 5)% sobre P1 y M2 resp. con 90  $\mu$ M ( $p < 0,001$ ). Finalmente, estudiamos el efecto de IFN [1000UI/ml] junto a dosis variables de UO o CAPE (24hs). Hallamos que UO [10  $\mu$ M] + IFN- $\alpha$  incrementó la inhibición del crecimiento en un 24%, alcanzándose un valor de (75 $\pm$ 9)% para P1 ( $p < 0,001$ ). La inhibición máx. sobre M2 se alcanza con 2  $\mu$ M de UO e IFN- $\beta$ , obteniéndose un (83 $\pm$ 6)% de inhibición, un 20% más, respecto a las drogas solas ( $p < 0,001$ ). CAPE + IFN $\alpha/\beta$  aumentaron la inhibición del crecimiento en un 20% para ambos tipos celulares, con valores máximos de (65 $\pm$ 3)% con 45  $\mu$ M de CAPE + IFN $\alpha/\beta$ , para P1 y (75 $\pm$ 3)% para M2 ( $p < 0,001$ ). Concluimos que MAPK y NF $\kappa$ B participan de la sobrevida de estas líneas tumorales. PANC-1 y MIAPaCa-2 presentan niveles de resistencia al tratamiento con IFN-I, efecto que disminuye al usar combinatorias con los inhibidores de vías MAPK y NF $\kappa$ B.

**0497. (0417) IDENTIFICACIÓN DEL DOMINIO CITOPLÁSMICO DE MUC1 EN GATO (FELIS CATTUS).** E Lacunza, M Abba, A Segal-Eiras, MV Croce

*Centro de Investigaciones Básicas y Aplicadas (CINIBA), Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata, Argentina.*

La mucina MUC1 es una glicoproteína de membrana expresada en la superficie apical de la mayoría de los epitelios; posee dos subunidades, la mayor constituye gran parte del dominio extracelular mientras que la subunidad menor comprende una pequeña porción del dominio extracelular, el dominio transmembrana y una cola citoplasmática (MUC1CT) de 72 aminoácidos rica en serinas y treoninas. Esta última está involucrada en la transducción de señales y se encuentra altamente conservada en los mamíferos. Con el objetivo de identificar el dominio citoplasmático de MUC1 en gato, se analizaron tejidos epiteliales de esófago, estómago, glándula salival, páncreas, hígado, glándula mamaria lactante, tráquea, pulmón, intestino delgado, colon y vejiga. Se utilizó el anticuerpo policlonal CT33 reactivo contra los últimos 17 aminoácidos de la MUC1CT humana. **Métodos:** inmunohistoquímica (IHQ), Westernblot (WB) y PCR-RT. Se aisló el ARN total de páncreas de gato, se sintetizó ADNc mediante la utilización de oligonucleótidos (dT) como cebadores y la enzima transcriptasa reversa M-MLV. Se utilizó la secuencia de ADN de la MUC1 humana para diseñar los cebadores de oligonucleótidos flanqueantes de la región terminal de la CT: MUC1F, 5'-ACA CCC ATG GGC GCT ATG T; MUC1R1, 5'-CTG CCA CTG CTG GGT TTG T. Mediante IHQ, se observó reacción en estómago, glándula salival, páncreas, hígado, glándula mamaria lactante, tráquea, pulmón, intestino delgado, colon y vejiga. Con WB, se observó una banda de reacción de 35KDa en estómago, páncreas, glándula mamaria y tráquea. Mediante RT-PCR se obtuvo un amplificado de 113pb correspondiente a la región terminal del dominio citoplasmático de MUC1 de gato. Este estudio permitió identificar y localizar por primera vez el dominio citoplasmático de MUC1 en gato; al igual que en otras especies de mamíferos descritas hasta el momento, el elevado grado de conservación sugiere un importante carácter funcional de este dominio.

**0498. (0415) EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO LEWIS Y (LE Y) EN EL CÁNCER DE MAMA Y SU ROL COMO POSIBLE INDUCTOR DE RESPUESTA INMUNE HUMORAL.** M Isla Larrain<sup>1</sup>, M Crespo<sup>1</sup>, A Cretón<sup>2</sup>, A Barbera<sup>2</sup>, F Terrier<sup>2</sup>, A Segal-Eiras<sup>1</sup>, MV Croce<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones Inmunológicas Básicas y Aplicadas (CINIBA). Facultad de Ciencias Médicas. UNLP. La Plata, Buenos Aires, Argentina., 2 Fundación Breast, Clínica de la Mama. La Plata.*

La alteración en la glicosilación de las mucinas asociadas a tumores malignos puede provocar la aparición de nuevos epitopes carbohidratos. Tal es el caso de los antígenos Lewis que han sido involucrados en procesos de diseminación y metástasis. **Objetivos:** 1- Estudiar la expresión tumoral de Le y; 2- Analizar la mucina 1 (MUC1) como posible carrier de este carbohidrato y 3- Investigar la respuesta inmune humoral anti-Le y mediante la detección de complejos inmunes circulantes, Le y/CIC IgG e IgM. **Materiales:** 42 muestras tumorales y séricas de pacientes con cáncer de mama, 32 muestras controles (patologías benignas y normales) y 40 séricas de mujeres sanas. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales (AcMo): HMFG2, anti-MUC1 y C14, anti-Le y. **Métodos:** Inmunohistoquímica (IHQ), inmunoprecipitación (IP) sérica con HMFG2, SDS/PAGE y Western Blot (WB). Se desarrolló un ELISA para Le y/CIC IgG e IgM con C14 como AcMo de captura. **Resultados:** Por IHQ, se detectó Le y en las muestras de cáncer, en las benignas y normales siendo la principal diferencia el patrón de expresión; en las de carcinoma fue principalmente citoplásmico y no apical, mientras que en las benignas y normales estuvo restringido a la membrana apical. En los IP se halló Le y; el análisis por WB mostró una banda de 200kD con el AcMo C14. Los valores de Le y/CIC IgM fueron de  $x=0.935$  en normales,  $x=1.065$  en benignas y  $0.515$  en cáncer, con una diferencia estadísticamente significativa de las dos primeras con respecto a cáncer de mama ( $p < 0.0001$ ). Los valores de Le y/CIC IgG fueron de  $x=0.502$  en normales,  $x=0.481$  en benignas y  $0.388$  en cáncer. **Conclusiones:** 1- Le y se expresa más en las muestras normales y benignas que en las malignas; 2- MUC1 sérica posee Le y en su constitución; 3- Existe una diferencia altamente significativa en los valores de Le y/CIC IgM, siendo mayores en las muestras normales y benignas.

**0499. (0731) EFECTO DEL BENZNIDAZOL SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL HELA.** G Campodonico<sup>1</sup>, N Noguera<sup>4,5</sup>, E Serra<sup>2</sup>, S Revelli<sup>1</sup>, MF Pascutti<sup>3</sup>, F García<sup>1,5</sup>

*1 Instituto de Inmunología Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario (UNR), 2 Instituto de Biología Rosario (CONICET-UNR), 3 Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 4 Área Hematología. Departamento Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR, 5 CONICET*

El Benznidazol (BZL) es un derivado imidazólico que se ha utilizado por más de 30 años para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. Investigaciones previas utilizando la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 mostraron que el BZL es capaz de inhibir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios a través de la inhibición de la activación del factor NF- $\kappa$ B (Revelli et al, 1999; Piaggio et al, 2001). El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción del BZL sobre la proliferación de una línea celular tumoral. Para ello, células HeLa (adenocarcinoma de cérvix humano) se incubaron en presencia de BZL en concentraciones 0,1 (BZL 0,1) y 1 mM (BZL 1). A distintos tiempos (0, 24 y 48 hs) se realizó el recuento de células viables con Azul Tripán, observándose durante la fase exponencial del crecimiento (48 hs) una cantidad de células viables significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en BZL 1 respecto a los grupos controles. Este efecto inhibitorio en el crecimiento fue reversible, recuperando la capacidad de proliferación al retirarse la droga. En BZL 1, se observó: - un aumento del porcentaje de células en fase G0/G1, medido por citometría de flujo con iodo de propidio a las 24 hs y - una disminución de la actividad metabólica de aproximadamente un 75%, medida por la reducción de MTT a las 48 hs. Para investigar si la división celular estaba acompañada de necrosis, se dosó la actividad de la enzima LDH obteniéndose valores bajos y similares para todos los grupos. El BZL en altas concentraciones detiene el crecimiento

de la línea HeLa, sin inducir necrosis. Esta inhibición se evidencia claramente a las 48 hs, siendo a las 24 hs cuantitativamente menor. Este efecto fue observado también sobre otras líneas celulares (líneas de leucemia como THP-1, Jurkat y K562), por lo que los resultados obtenidos podrían explicar algunos de los efectos secundarios del tratamiento con esta droga (agranulocitosis iniciada por neutropenia con reducción en el número de plaquetas y aplasia medular).

**0500. (0591) EFECTO DE PROLACTINA SOBRE LOS LINFOCITOS B EN RATAS CON LACTANCIA DEFICIENTE (OFA HR/HR), EN DIFERENTES ESTADIOS REPRODUCTIVOS.** SR Valdez<sup>1</sup>, LM Vargas Roig<sup>1</sup>, A Gonzalez<sup>2</sup>, C Marin<sup>2</sup>, IA Gimenez<sup>3</sup>, GA Jahn<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza, 2 Servicio de Inmunología, Hospital Central, Mendoza, 3 Laboratorio Central, Complejo Sanitario San Luis, San Luis.*

La prolactina (PRL) afecta profundamente la función del sistema inmune. Es interesante evaluar las interacciones bidireccionales entre el sistema inmunológico y endocrino en situaciones de hipo e hiperprolactinemia inducidas por gestación y lactancia. Las ratas OFA hr/hr (OFA) presentan hipoprolactinemia en la lactancia. Para evaluar si los niveles de PRL de las ratas OFA afectan las poblaciones de linfocitos B y T se realizó citometría de flujo utilizando anticuerpos contra CD3 para caracterizar linfocitos T y CD 45 RAB para linfocitos B. Se realizó la fórmula leucocitaria y se midieron los niveles plasmáticos de PRL y hormona de crecimiento (GH) por RIA. Se obtuvo sangre en diferentes estadios reproductivos (vírgenes en estro, final de gestación y lactancia) en ratas OFA y como controles de lactancia normal se utilizaron ratas Wistar (Wi) y Sprague Dawley (SD). Los valores de PRL en ratas OFA vírgenes y en lactancia son más bajos que en su cepa de origen SD (Vírgenes: OFA 7.5 ± 1.4, SD: 18.7 ± 8.5; Lactancia: OFA 8.0 ± 1.3, SD 66.9 ± 14.1 ng/mL, p<0.05). Las ratas vírgenes SD y OFA tienen valores más elevados de GH que las Wi, diferencias que desaparecen al final de la gestación. El número de leucocitos/mm<sup>3</sup> es mayor en las ratas OFA que SD, sin diferencias respecto a las Wi (Vírgenes: OFA: 14270 ± 890, SD 11854 ± 525 p<0.05, Wi 12110 ± 689; Lactancia: OFA: 17806 ± 1095, SD 12881 ± 933 p<0.005, Wi 13780 ± 2448). El número de linfocitos totales no se ve afectado en ratas SD y OFA vírgenes y lactando (Vírgenes: OFA 8142 ± 280, SD 7785 ± 510; Lactancia: OFA 8337 ± 681, SD 6644 ± 605). Los linfocitos B/mm<sup>3</sup> están aumentados en las ratas OFA comparadas con las SD (Vírgenes: OFA 1237 ± 170, SD 855 ± 81 p<0.05; Lactancia: OFA 1672 ± 255, SD 688 ± 106 p<0.005). Los linfocitos T/mm<sup>3</sup> no varían entre cepas. En conclusión, las variaciones de las concentraciones de PRL de las ratas OFA en rangos fisiológicos parecen modular específicamente la población de linfocitos B.

**0501. (0706) ALTERACIONES TÍMICAS Y RESPUESTA AL ESTRÉS DURANTE EL PERÍODO DE REHABILITACIÓN NUTRICIONAL DE RATAS DESNUTRIDAS DURANTE LA LACTANCIA.** CA Feledi<sup>1</sup>, S Rumille<sup>2</sup>, L Matkovic<sup>2</sup>, EJ Massouh<sup>1</sup>

*1 Lab. de Inmunoquímica, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA., 2 Lab. de Esteroides, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA.*

Las ratas desnutridas durante la lactancia por duplicación de camada son inmunodeficientes. El timo es el órgano linfoide más afectado, pero también se describe un pan-hipopituitarismo asociado. El aumento de la secreción de glucocorticoides es un mecanismo de adaptación a situaciones de estrés, como la desnutrición. El objetivo de este trabajo es describir el comportamiento de la población de timocitos CD4+CD8 (sensible a los glucocorticoides en los roedores), y a la vez evaluar la respuesta al estrés durante la rehabilitación nutricional. Ratas Normales (N) y Desnutridas (D) sangradas bajo anestesia con éter (condiciones de

estrés), se estudiaron entre los 21 y 120 días de edad. La corticosterona sérica se determinó por Radioinmunoensayo, y la proporción de CD4+CD8b+ (DP) se estudió por citometría de flujo en timocitos. La Corticosterona sérica en respuesta a la sangría no se diferencia de la normal en las ratas D al destete (N21=337±151 vs D21=554.2±107 ng/ml, p=ns), pero éstas no manifiestan subsiguientes variaciones de respuesta. Por el contrario, los animales N responden cada vez con mayor secreción hormonal, máxima alrededor de los 50 días (N50=1353±780 vs D50=643.4±245 ng/ml, p=0.0005). El porcentaje de TIMOCITOS DP está disminuido al destete: N21=82±1.4 vs D21=71±11 %, p=0.01, y también su número: # N21=162±3 vs # D21=39.6±6 x106, p=0.011, situación que se prolonga a los 50 días de edad a pesar de la recuperación ponderal: #N50=458 vs #D50=360 x106 (p=0.01). Está afectada la población predominante, CD4+hiCD8b+hi, indicando que los timocitos son incapaces de establecer una relación productiva con las células seleccionadoras, epiteliales y dendríticas tímicas. También se acumulan los intermediarios CD4+hiCD8+lo: #N50=22.7 vs #D50=39.5 x106 (p=0.005), que no serían eliminados normalmente. Por otra parte, los niveles constantes de corticosterona indican una incapacidad crónica de respuesta al estrés, que no se revierte durante el periodo estudiado.

**0502. (0270) HOMEOSTASIS DE LAS CÉLULAS T REGULADORIAS: DIFERENCIAS CUANTITATIVAS Y FUNCIONALES EN MUJERES FÉRTILES Y EN MUJERES CON FALLAS REPRODUCTIVAS.** L Arruivo, N Paladino, AC Flores, L Fainboim

*Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín" y Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina*

En estudios previos demostramos el rol de las hormonas sexuales sobre las células T regulatorias (Treg) durante el ciclo menstrual. Muestras de sangre periférica de mujeres fértiles mostraron que los niveles de estrógenos están asociados con el nivel de expresión de las Treg, evidenciándose una expansión a lo largo de la fase folicular, seguida de una caída en la fase lutea. Mujeres que padecen abortos recurrentes espontáneos (ARE) mostraron similar número de Treg en ambas fases del ciclo menstrual y una capacidad supresora disminuida en comparación con los controles. Aquí, investigamos la capacidad de las Treg de mujeres fértiles y de mujeres con ARE de expandirse en respuesta a IL-2, usando un modelo de expansión *in vitro* previamente reportado por nosotros. Observamos que después de 11 días de cultivo, la expresión en sangre periférica evaluada por citometría de flujo de células CD4+CD25+FOXP3+ en mujeres fértiles (n=10) expandieron desde una frecuencia basal 6.07%±0.7% a 20.24%±2%; p<0.0001. Las mujeres con ARE mostraron una limitada capacidad de expansión de 4.48%±1% a 7.02%±1.18%; p=0.04 (n=11). Se determinaron diferentes citocinas en los sobrenadantes de cultivos por ELISA y no se hallaron niveles significativos de TNF-α e IL-10, observándose una diferencia no significativa en los niveles de IL-6 entre mujeres fértiles y pacientes. Por el contrario, existió una supresión de la secreción de IFN-γ en las células activadas de mujeres fértiles respecto de las mujeres con ARE (p<0.02). Desde el punto de vista funcional, ambos grupos mostraron una fuerte capacidad supresora observada en un cultivo mixto linfocitario. Para abrogar este efecto supresor, se adicionó IL-6 al modelo, 2 días previos al ensayo de supresión, y determinamos la existencia de un efecto diferencial en ambos grupos. Concluimos que el déficit evidenciado en la expansión de las Treg en mujeres con ARE, podría estar modulado por una alteración a nivel de la cascada de señales de IL-2.

**0503. (0690) PARTICIPACIÓN DE RANTES EN EL DIÁLOGO MATERNO-FETAL Y SU CAPACIDAD DE INDUCIR TOLERANCIA.** J Alfieri<sup>1</sup>, L Fracaroli<sup>1</sup>, L Larocca<sup>1</sup>, M Calafat<sup>1</sup>, R Ramhorst<sup>1,2</sup>

1 Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, 2 Laboratorio de Inmunogenética, Facultad de Medicina, UBA

La implantación embrionaria en humanos involucra la generación de un proceso inflamatorio y su posterior control. Dado que RANTES (Regulated on activated normal T cells expressed and secreted) promueve respuestas tipo Th1, investigamos su efecto sobre células trofoblásticas y en el diálogo materno-fetal. Células trofoblásticas inmortalizadas de primer trimestre (línea celular Swan 71) se cultivaron con células mononucleares (MNT) de sangre periférica de mujeres fértiles o con Abortos Recurrentes Espontáneos (ARE) y se evaluó la producción de RANTES por citometría de flujo. Las células Swan-71 producen RANTES (30%) y esta aumenta significativamente en presencia de MNT de mujeres fértiles o con ARE (49 y 45% respectivamente  $p < 0.05$  t-test). Sin embargo presentaron distinta cinética observándose un retraso temporal en presencia de MNT de pacientes con ARE. El pico de producción de RANTES detectado a las 24hs en los cocultivos de mujeres fértiles fue acompañado por bajos niveles de IFN $\gamma$ , altos de IL-12 p70 y TNF $\alpha$  (cuantificados por ELISA), incremento en la expresión de LIF e iNOS (por Western Blot) y bajos niveles de Nitritos (técnica de Greiss). Asimismo, estos cocultivos presentaron un aumento significativo de células CD3+Anexina V+ asociado con un bajo porcentaje de células trofoblásticas apoptóticas (18 y 2% respect), sin embargo en presencia de MNT de pacientes con ARE el efecto fue opuesto (11 y 43% respect,  $p < 0.05$  t-test). En ambos casos los niveles de apoptosis fueron revertidos en presencia del Ac anti RANTES neutralizante. Finalmente, RANTES suprime significativamente la respuesta proliferativa en cocultivos de células trofoblásticas y MNT de mujeres fértiles y este efecto es más pronunciado en presencia de progesterona ( $p < 0.05$  t test). Los presentes resultados sugieren un rol importante de RANTES durante la implantación promoviendo la tolerancia materna permitiendo el desarrollo de células trofoblásticas en un microambiente pro-inflamatorio adecuado.

## REPRODUCCIÓN IV

- 0504. (0442) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN NEONATAL A XENOESTRÓGENOS SOBRE LA REGULACIÓN HORMONAL DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL ÚTERO DE LA RATA ADULTA.** VL Bosquiazzo, J Varayoud, M Muñoz-de-Toro, JG Ramos, EH Luque

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral

La angiogénesis es un proceso hormonodependiente asociado a la preparación del útero para la implantación. El aumento en los niveles de progesterona (Pg) y estrógenos durante la preñez temprana están temporalmente asociados con la proliferación de las células endoteliales endometriales. Nos propusimos estudiar si la exposición neonatal a dos xenoestrógenos, Bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES), afecta la regulación hormonodependiente de la angiogénesis uterina en la rata adulta. Ratas hembras (Wistar) se inyectaron vía sc con BPA (0,05mg/kg), DES (0,2 $\mu$ g/kg) o vehículo (control) desde el día posterior al nacimiento hasta el día 7. A los 80 días de edad, los animales fueron ovariectomizados y 10 días después inyectados con Pg y 17 $\beta$ -estradiol, en dosis que simulan el período pre-implantatorio. Cuatro horas antes del sacrificio se inyectó bromodeoxiuridina (BrdU) para cuantificar la proliferación endotelial. Como parámetros de angiogénesis determinamos la proliferación endotelial y la expresión de VEGF, a nivel ARNm y proteína (mediante PCR en tiempo real e inmunohistoquímica (IHQ), respectivamente). Además evaluamos la expresión del receptor de Pg (RP) y del represor SMRT (mediador del silenciamiento del receptor de ácido retinoico y tiroideos) por IHQ. Los animales expuestos a BPA y DES presentaron una menor proliferación endotelial ( $p < 0.05$ ) asociada a una disminución en la expresión del VEGF (ARNm y proteína) en

relación a los controles. Sólo las ratas expuestas a DES mostraron menor expresión del RP ( $p < 0.05$ ) mientras que las expuestas a BPA aumentaron la expresión del represor SMRT ( $p < 0.05$ ). Estos resultados demuestran que la exposición neonatal a DES y BPA disminuye la proliferación hormonodependiente de las células endoteliales uterinas y sugieren que este efecto sería mediado por una regulación diferencial de la transcripción del VEGF. Estas alteraciones en la angiogénesis podrían conducir a fallas en la implantación del embrión causando infertilidad.

- 0505. (0828) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN, LOCALIZACIÓN Y PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP) Y ESTRADIOL TIPO BETA (REb) EN LA DECIDUALIZACIÓN DE ENDOMETRIO DE RATA.** G Vallejo<sup>1</sup>, R Grummer<sup>2</sup>, E Winterhager<sup>2</sup>, P Saragueta<sup>1</sup>

1 IByME, 2 Departamento de Anatomía, Universidad de Essen

Demostramos que el RP y el REb participan conjuntamente en la proliferación progesterina-dependiente en células endometriales de rata in vitro. Nos proponemos estudiar la interacción entre el RP y REb durante la proliferación y decidualización in vivo. Analizamos la expresión de RP y REb en sitios de implantación (4,6 y 8dpc) (western blot). El incremento en la expresión del RP A y B fue máximo a los 8dpc (RPA:7,8 $\pm$ 0,3; RPB:6,9 $\pm$ 1,7 veces de aumento vs 4dpc). No observamos cambios en la expresión de REb. Estudiamos la localización de RP y REb en sitios de implantación de 8dpc (microscopía confocal). En el antimesometrio (AM), el 20% de las células positivas para RP posee señal nuclear, y en el 90% de las células deciduales primarias positivas la señal es citoplasmática. RP y ERb colocalizan en el núcleo en el estroma indiferenciado adyacente al miometrio. En el mesometrio (M) no se observó tinción para REb y la señal para RP es baja. Estudiamos el efecto del antagonista de RP (ONA), de RE (ICI), o ambos (inyección 6 y 7dpc); en la expresión y/o localización de los receptores. El tratamiento con ONA abolió la expresión de ambos receptores en M y AM. El de ICI abolió la expresión del RP, y redireccionó al REb hacia el núcleo en el M. La administración conjunta de resultó en un patrón similar al de ICI. La morfología de los sitios de implantación en presencia ONA resultó en: a) contracción en la zona de unión entre M y AM, b) incremento de células indiferenciadas en AM. La presencia de ICI resultó en una reducción de la decidua. El tratamiento combinado resultó en una morfología similar a la observada para ICI, y una leve constricción en la zona de unión entre M y AM. Estos resultados muestran que: a) RP y REb colocalizan sólo en las células estromales indiferenciadas, sugiriendo que la interacción entre estos receptores sería necesaria en células con capacidad proliferativa; y b) el bloqueo del receptor de estradiol resulta en una inhibición del proceso de diferenciación.

- 0506. (0532) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA 1 Y 3 EN CÉLULAS DE SERTOLI.** MN Galardo, MF Riera, EH Pellizzari, M Venara, H Chemes, SB Cigorraga, SB Meroni

Centro de Investigaciones Endocrinológicas-CONICET

El transporte de glucosa a través de la membrana plasmática es mediado por una familia de glucoproteínas (GLUTs), que poseen distribución tejido específica. En ciertos tipos celulares el patrón de expresión de GLUTs cambia con la diferenciación celular. Anteriormente se demostró que FSH, IL1 $\beta$  y bFGF estimulan la incorporación de glucosa en la célula de Sertoli (CS) de 20 días de edad. El objetivo del presente trabajo fue analizar si existe un cambio en el patrón de expresión de GLUT1 y 3 con la diferenciación de CS y si existen cambios en la expresión de GLUT1 y 3 por las hormonas mencionadas anteriormente. Se cultivaron CS de ratas de 8 (células inmaduras) y 20 (células en proceso de diferenciación terminal) días de edad. Por inmunohistoquímica se detectó presencia de GLUT1 y 3. Las células fueron estimuladas con FSH (100ng/ml), IL1 $\beta$  (50ng/ml) o bFGF (30 ng/ml) por 12, 24 y 48 horas. Se analizó la expresión de GLUT1 y GLUT3

por Northern blot. Se observó que FSH, IL1 $\beta$  y bFGF son capaces de aumentar los niveles de expresión de GLUT1 en CS de 8 y 20 días. Los resultados obtenidos en el momento de máxima estimulación que fue variable para las distintas hormonas fueron: CS8: FSH24h: 3.4 $\pm$ 1, IL1 $\beta$ 12h: 4.3 $\pm$ 1.3 y bFGF24h: 4.9 $\pm$ 1.4; CS20: FSH24h: 2.9 $\pm$ 1.1, IL1 $\beta$ 12h: 2.5 $\pm$ 0.7, bFGF24h: 3.8 $\pm$ 1.2 (veces de estímulo con respecto al basal, X $\pm$ DS, n=3). Los niveles de ARNm de GLUT3 no se modificaron por hormonas en las edades analizadas. Por último, los niveles de ARNm de GLUT1 y GLUT3 en CS fueron semejantes a los 8 y 20 días de edad. Estos resultados demuestran que mientras el GLUT3 es constitutivo el GLUT1 se regula hormonalmente y sugieren que, a diferencia de lo que ocurre en otros tejidos, no existe expresión diferencial de estos transportadores con la diferenciación de CS. (PIP 5479, CONICET; PICT 25365, ANPCYT).

**0507. (0725) EFECTO DEL GRADO DE SIALIZACIÓN Y COMPLEJIDAD DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE FSH SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INHIBINAS EN CÉLULAS DE LA GRANULOSA EN CULTIVO.** N Loreti<sup>1</sup>, L Andreone<sup>1</sup>, R Trigo<sup>1</sup>, U Bussmann<sup>2</sup>, V Ambao<sup>1</sup>, S Campo<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) CONICET, 2 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) CONICET*

La producción de inhibinas A y B en células de la granulosa está diferencialmente regulada por FSH, activina A, estradiol y factores producidos por el oocito. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las diferencias en el grado de sialización y complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH recombinante humana (FSHrh) sobre la producción de inhibinas en células de granulosa (CG) Mediante isoelectroenfoque preparativo se aislaron análogos de carga de FSHrh en un rango de pH 2.6-7.5. Se obtuvieron dos preparaciones combinando fracciones con pH 3-4 (ácidica, AC) y 5-7 (básica, BA). Cromatografía en ConA fue utilizada para aislar isoformas con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos: complejos (NR y DR) y de tipo híbrido (FR). Cultivos de CG de ratas prepúberes tratadas con DES fueron estimulados con FSHrh entera o isoformas (0.5-16 ng/ml) por 72 hs. Se determinaron los niveles de inhibina A (inhA) y B (inhB) por ELISAs. La producción basal de inhA e inhB fue 933 $\pm$ 138 y 134 $\pm$ 44 pg/ml respectivamente (x $\pm$ EEM). FSHrh estimuló predominantemente la producción de inhA en forma dosis-dependiente. Se observó una mayor sensibilidad de respuesta de la inhB frente a análogos de carga AC respecto de BA: 8.8 $\pm$ 1.5 vs 1.5 $\pm$ 0.2; en cambio la producción de inhA se vió favorecida por BA: 7.1 $\pm$ 1.1 vs 2.0 $\pm$ 0.3 (los resultados se expresan como veces de estímulo respecto del basal x $\pm$ EEM). Las isoformas con oligosacáridos complejos, NR y DR, resultaron un estímulo más potente para la producción de inhB respecto de inhA (9.3 $\pm$ 2.6 vs 3.5 $\pm$ 0.3) en cambio las FR en el rango 0.5-2 ng/ml resultaron inhibitorias para la producción de inhB (0.5 $\pm$ 0.1) estimulando ambos dímeros a la mayor dosis estudiada. Estos resultados sugieren que diferencias en el grado de sialización y de complejidad de los oligosacáridos presentes en la FSH son factores adicionales que modulan en forma diferencial la producción de inhibinas diméricas en CG en cultivo.

**0508. (0528) ROL DE LOS IGFs EN EL TESTÍCULO HUMANO DURANTE LA ACTIVACIÓN POSTNATAL: DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE LEYDIG.** EB Berenshtein<sup>1</sup>, MS Baquedano<sup>1</sup>, M Sciarra<sup>1</sup>, N Saraco<sup>1</sup>, CM Pepe<sup>1</sup>, R Ponzio<sup>1</sup>, MA Rivarola<sup>1</sup>, A Belgorosky<sup>1</sup>

*1 Servicio de Endocrinología. Hospital de Pediatría H.P.Garrahan, 2 Instituto de investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

Los factores de crecimiento símil-insulina (IGFs), a través de un receptor específico (IGFR1) modulan la proliferación y la apoptosis en tejidos blanco. En roedores, los IGFs estimulan la diferenciación de células de Leydig. Estudios previos de la

inmunoexpresión de sistema GH/IGFs en tejidos testiculares humanos prepúberes (SAIC 2006) evidenciaron que el IGF1 era apenas detectable mientras que el IGF2 se expresó intensamente en células de Leydig tanto en neonatos como en el periodo de activación postnatal (APN). También se observó una expresión moderada del IGFR1 y del GHR y muy intensa del receptor de insulina en células de Leydig en APN. El presente objetivo fue analizar el efecto de rhIGF1 (50 ng/ml) en los cultivos primarios de células testiculares humanas prepúberes. El índice apoptótico, estudiado por TUNEL, disminuyó significativamente bajo IGF1 (43.8  $\pm$  4.66% del basal, n = 15, p = 0.021, test de t). La proliferación celular, evaluada por Ki67, aumentó significativamente bajo IGF1 (203  $\pm$  11.0% del basal, n = 4, p = 0.007). En presencia de IGF1, la inmunoexpresión de la enzima P450scc (% de células positivas) aumentó significativamente (1440  $\pm$  405% del basal, n = 4, p = 0.049), así como también la secreción de testosterona en el medio condicionado (400  $\pm$  58.9% del basal, n = 23, p = 0.011). Estos estudios in vitro demuestran que los IGFs regulan la proliferación y la apoptosis de células inmaduras en el testículo humano inmaduro, así como también estimulan la esteroidogénesis. Se propone que durante la activación testicular de la infancia, el eje GH/IGFs podría ejercer un rol relevante en la preservación de la masa celular y en la regulación de la diferenciación de las células precursoras de células de Leydig.

**0509. (0596) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A DIETILESTILBES-TROL (DES) Y BISFENOL A (BPA) ALTERA EL DESARROLLO FOLICULAR DE LA RATA.** HA Rodríguez, N Santambrosio, M Muñoz-de-Toro, EH Luque

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

En la rata, el ensamblado folicular y la transición de foliculo primordial (FP) a primario (FPri) ocurren en la etapa posnatal temprana y son críticos para establecer el número de FP (lo que representa el potencial reproductivo de la hembra). Nuestra hipótesis propone que ambos procesos son sensibles a los perturbadores endocrinos (PE). Para demostrarla evaluamos los efectos de la exposición neonatal a BPA y DES sobre el desarrollo folicular. Se expusieron ratas hembras Wistar por vía sc desde el día posnatal 1 (DPN1) hasta DPN7 con: DES 20  $\mu$ g/kg (DES20), DES 0.2  $\mu$ g/kg (DES0.2), BPA 20 mg/kg (BPA20), BPA 0.05 mg/kg (BPA0.05), vehículo (aceite de maíz). Se obtuvieron los ovarios en DPN8. En cortes seriados del centro del ovario teñidos con Picrosirius-hematoxilina se determinó el porcentaje de folículos no ensamblados (FNE), FP, folículos primarios tempranos (FPriT), FPri, folículos de transición (FTr), folículos preantrales (FPre), folículos antrales (FA) y folículos poliovulares (FPO). Por inmunohistoquímica se evaluó la expresión de receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ) y beta (RE $\beta$ ) para cada población folicular. En DES20 se observó una disminución de FP y FPre junto a un incremento de FPriT y FPO (p<0.05). En BPA20 hubo una disminución de FP y FA asociada con un aumento de FPriT (p<0.05). En BPA0.05 observamos un aumento de FPriT (p<0.01) y una disminución de FPri (p<0.05). La expresión del RE $\alpha$  se incrementó en ratas expuestas a DES0.2, BPA20 y BPA0.05 en la población de FP y FPriT (p<0.01); mientras que con BPA0.05 se incrementó en los FPri (p<0.05). En DES20 hubo una menor expresión de RE $\beta$  en los FP (p<0.05) y FPriT (p<0.01). Estos resultados demuestran que la exposición a DES o BPA altera la dinámica folicular del período posnatal temprano y sugieren que ambos PE afectarían la vía estrogénica que regula el número de FP.

**0510. (0774) EFECTO DEL 25OH-COLESTEROL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INHIBINAS EN FOLÍCULOS ANTRALES TEMPRANOS EN CULTIVO.** L Andreone<sup>1</sup>, F Parborell<sup>2</sup>, V Ambao<sup>1</sup>, N Loreti<sup>1</sup>, M Tesone<sup>2</sup>, S Campo<sup>1</sup>

*1 Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE) CONICET, 2 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) CONICET*

Hemos analizado previamente la regulación hormonal de la actividad endocrina de folículos antrales tempranos (FAT) en cultivo. La FSH y el 25OH-colesterol (25OH-col) estimularon la producción de inhibinas. El objetivo del presente trabajo fue determinar el posible mecanismo por el cual el 25OH-col incrementa la producción de inhibinas en FAT. Folículos de ratas prepúberes tratadas con DES se aislaron por microdissección y se cultivaron durante 6 o 24 hs en condiciones basales y en presencia de 25OH-col (10µg/ml), FSHrh (50 ng/ml) y aminoglutetimida (AMG, 50µg/ml). Se determinaron los niveles de activina A (actA), Pro-αC, inhibina A (inhA) e inhibina B (inhB) por ELISAs específicos y los niveles de los ARNm de las subunidades de inhibina/activina por RT-PCR semicuantitativa. Los resultados se expresan como veces respecto del basal. En tratamientos de 6 hs, el 25OH-col estimuló la producción de Pro-αC, inhA e inhB: 1.5, 1.6 y 1.7, respectivamente ( $p < 0.05$ ). El agregado de AMG no modificó este efecto. La FSHrh estimuló los niveles de los ARNm de las subunidades de inhibina/activina: subunidad  $\alpha$ :  $1.7 \pm 0.1$ ;  $\beta$ A:  $2.4 \pm 0.2$  y  $\beta$ B:  $1.7 \pm 0.4$  (media  $\pm$  EEM,  $n=3$ ). La expresión de los ARNm de las tres subunidades aumentaron con 25OH-col: subunidad  $\alpha$ :  $2.0 \pm 0.5$ ;  $\beta$ A:  $2.4 \pm 0.2$  y  $\beta$ B:  $2.1 \pm 0.4$  ( $n=3$ ). El agregado de FSHrh al 25OH-col potenció este efecto solamente en la expresión del ARNm de la subunidad  $\alpha$ :  $1.4 \pm 0.1$  veces con respecto al 25OH-col ( $n=3$ ). El tratamiento por 24 hs con 25OH-col inhibió la producción de actA: 0.6,  $p < 0.05$ . El efecto inhibitorio del 25OH-col sobre la producción de actA y estimulador sobre la producción de inhibinas no se modificó con el agregado de AMG. El efecto estimulador del 25OH-col sobre la producción de inhibinas se ejercería sobre la expresión génica de las subunidades y posiblemente también directa o indirectamente favoreciendo la heterodimerización, independientemente del entorno esteroideo.

**0511. (0359) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A XENOESTRÓGENOS MODIFICA EN EL ADULTO LA EXPRESIÓN UTERINA DE GENES ASOCIADOS CON LA IMPLANTACIÓN.** J Varayoud, JG Ramos, VL Bosquiazzo, M Lower, M Muñoz-de-Toro, EH Luque

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

Previamente observamos que hembras neonatalmente expuestas a los xenoestrógenos bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES) presentan una menor fertilidad evidenciada por un menor número de embriones implantados y mayor número de sitios de reabsorción. En base a estos resultados y con el objetivo de determinar las posibles vías de señalización afectadas, evaluamos la expresión de genes uterinos claves para la implantación del embrión. Determinamos la expresión uterina de genes homeóticos (Hoxa10 y 11), morfógenos (Wnt-5a y Wnt-7a) y receptores hormonales (receptor de estrógenos alfa y de progesterona). Crías de rata (Wistar) recibieron por vía sc aceite de maíz (control), DES (0.2 µg/kg), BPA0.05 (0.05 mg/kg) o BPA20 (20 mg/kg), desde el día posterior al nacimiento (DPN1) hasta el DPN7. Durante la vida adulta (a partir del DPN80) las hembras fueron preñadas y en el día 5 (período peri-implantatorio) se les extrajo el útero para realizar determinaciones por RT-PCR en tiempo real e inmunohistoquímica. Los animales expuestos a DES y BPA0.05 mostraron una disminución en la expresión de los genes homeóticos y morfógenos, mientras que en el grupo BPA20 sólo disminuyó la expresión de Hoxa10 ( $p < 0.05$ ). Los animales expuestos a DES presentaron una menor expresión del ARNm de ERalfa y PR, y una menor expresión de ambas proteínas en el estroma subepitelial. Por su parte, los animales expuestos a ambas dosis de BPA presentaron una menor expresión de ERalfa (a nivel ARNm y proteína), y una menor expresión de PR a nivel ARNm. Los resultados nos permiten sugerir que, la disminución de la fertilidad de la hembra por la exposición postnatal temprana a DES y BPA, podría estar asociada a una desregulación en la expresión de genes uterinos claves para la implantación del embrión.

**0512. (0385) TRATAMIENTOS APLICADOS EN LA INFANCIA CAPACES DE MODIFICAR LA CONDUCTA MATERNA EN RATAS ADULTAS.** A González Jatuff, M Torrecilla, M Quercetti, A García, E Rodríguez Echandia

*IMBECU, CONICET - Facultad de Ciencias Médicas, U.N.Cuyo.*

Las dos primeras semanas de vida representan para la rata un período crítico evolutivo con marcada influencia sobre la expresión comportamental en la vida adulta. En trabajos previos, mediante manipulaciones a las crías y/o a sus madres durante las dos primeras semanas de vida, hemos observado cambios en la respuesta a estrés, motivación, ansiedad, conducta sexual y social, y sensibilidad a fármacos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la influencia de estas manipulaciones sobre la respuesta materna adulta. Sujetos: Hembras adultas primíparas expuestas en su infancia a uno de los siguientes tratamientos: I. Control (C,  $n=12$ ); II. Estrés Neonatal (SN,  $n=9$ ). III. Estrés Materno (SM,  $n=13$ ); IV SN+SM ( $n=11$ ). Se registraron parámetros de conducta materna (acarreo, aseo, amamantamiento y score total) en condiciones basales y posterior a 3 hs. de separación (días 6 y 7 postnatales). En el día 6 se obtuvieron registros en fase de luz y de oscuridad. En el día 7 se registró la leche ingerida en los 40 minutos de lactancia posteriores a la separación, mediante diferencia de peso de la camada (test de lactancia). En condiciones basales los grupos con madres estresadas en la infancia presentaron un menor score de conducta materna (DUNN,  $p < 0.05$ ). El estrés neonatal atenuó este efecto (grupo SM+SN). La conducta más afectada fue el amamantamiento. En condiciones de separación (día 7), las hembras SN presentaron mejores scores en general; en este caso, este incremento fue contrarrestado por efecto del estrés materno (grupo SN+SM). La leche ingerida fue mayor en los grupos SN ( $2.12 \pm 0.95$  g) y SM ( $2.60 \pm 0.77$  g) ( $C = 0.45 \pm 0.43$  g), pero no en SN+SM ( $0.56 \pm 0.61$ ). Conclusiones: El estrés materno induce conductas maternas deficitarias en las crías adultas, que pueden ser atenuadas mediante estimulación neonatal. El estrés neonatal favorece en la adultez la expresión de conductas maternas en casos de mayor exigencia; este efecto estaría mediado por la madre.

## NEUROCIENCIAS IV

**0513. (0800) ACTIVIDAD AUTONÓMICA CARDÍACA Y DESEMPEÑO EN PRUEBAS DE APTITUD COGNITIVA.** DE Vigo<sup>1</sup>, J Solernó<sup>1</sup>, D Pérez Chada<sup>1</sup>, A Hedderwick<sup>1</sup>, D Cardinali<sup>1,2</sup>

*1 Laboratorio de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 2 CONICET*

**Introducción:** Los cambios en la actividad atencional de un individuo se asocian a modificaciones autonómicas que predicen la capacidad del sujeto para responder a estímulos externos. Sin embargo, no se ha estudiado si los cambios autonómicos a su vez se asocian con el desempeño en pruebas de aptitud cognitiva. **Métodos:** Se evaluaron aptitudes cognitivas en 21 sujetos jóvenes sanos a través del test DAT (Test de Aptitudes Diferenciales): procesos propios del hemisferio dominante mediante el test "razonamiento verbal" (RV), procesos del hemisferio no dominante mediante el test "relaciones espaciales" (RE), desempeño global (RV+RE) y lateralidad (RV-RE). Se evaluó la función autonómica mediante el cálculo de indicadores de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC): frecuencia cardíaca media (RRm); VFC global (SDNN); VFC de baja frecuencia, determinada por influencias simpáticas y parasimpáticas (LF, LF%); VFC de alta frecuencia, determinada por influencias parasimpáticas (RMSSD, HF, HF%). Se utilizó el test no paramétrico de Spearman para analizar correlaciones entre VFC en reposo y los resultados de las pruebas cognitivas. **Resultados:** Se observaron correlaciones significativas entre RV vs LF% ( $\rho = 0.573$ ,  $p = 0.007$ ); RE vs HF ( $\rho = -0.439$ ,  $p = 0.047$ ); RV+RE vs RMSSD ( $\rho = -0.554$ ,  $p = 0.009$ );

RV-RE vs SDNN ( $\rho = 0.459$ ,  $p = 0.036$ ); RV-RE vs LF ( $\rho = 0.545$ ,  $p = 0.011$ ). Conclusiones: El mejor desempeño en pruebas de aptitudes cognitivas se asoció con un patrón de VFC compatible con activación simpática (aumento de LF%, disminución de HF y RMSSD). El mejor desempeño relativo en procesos propios del hemisferio no dominante se asoció a una menor actividad simpática (disminución de LF). En conjunto, estas observaciones evidencian el papel de la actividad autonómica como marcador de la eficiencia y especialización de las funciones hemisféricas.

**0514. (0515) EVALUACIÓN CONDUCTUAL DE DISCINECIAS INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE L-DOPA EN RATAS DENERVADAS UNILATERALMENTE CON 6-OHDA EN LA SUSTANCIA NIGRA.** E Tenca, M Merello, V Heyd, G Sevlever

FLENI

**Introducción:** En este trabajo estudiamos las discinecias inducidas por L-DOPA y presentamos los resultados obtenidos en treinta ratas con lesión unilateral de la sustancia Nigra (pars reticulata) con 6-hidroxidopamina (8µgr) previo administración de reserpina y tratamiento crónico con L-DOPA metil-éster (10 mgs/kg de peso i.p) durante 30 días. **Metodos:** Los movimientos estudiados fueron agrupados en discinesias locomotoras, orolinguales, distonias axiales y movimientos discinéticos de las extremidades, según la escala de discinecias de Cenci. Los movimientos tenían las características de ser inducidos por la L-DOPA, contralaterales al sitio de la lesión sin propósito definido. Se evaluó además a los animales por su conducta de giro espontáneo, inducido por Apomorfina y en Test de Open-Field. Se calificaron con una escala de: 0= no se presenta, 1= ocasional, 2= frecuente, 3= continuo pero interrumpible, 4= severo. Se observaron por periodos de 3 minutos cada 20 minutos durante 2 horas después de haberse administrado L-DOPA, por 30 días. **Resultados:** La administración de L-DOPA produjo conducta de giro contralateral al sitio de la lesión, la cual se desarrolló gradualmente, llegando a su máximo a los 10 días y manteniéndose hasta el final del tratamiento. De los movimientos estudiados todos tuvieron un desarrollo gradual similar al de la conducta de giro, a excepción de la postura distónica (distonia-axial), la cual se presentó siete días después de iniciada la administración de la droga. Se identificaron 2 grupos de respuesta, en base al puntaje obtenido en las escalas de discinecias. **Conclusión:** Estos datos de estudio preliminar sugieren una respuesta diferencial entre los animales a la terapia con L-DOPA en cuanto al desarrollo de discinecias.

**0515. (0192) ACTIVACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN LIPÍDICA POR ESTRÉS OXIDATIVO EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.** RM Uranga, MV Mateos, NM Giusto, GA Salvador

*Instituto de Investigaciones de Bahía Blanca. UNS-CONICET*

Los metales de transición, son considerados agentes neurotóxicos ya que producen peroxidación lipídica daños en el funcionamiento mitocondrial y disminución de la actividad de los transportadores de glucosa y glutamato. Estos efectos se asemejan al daño que sufren las neuronas expuestas al péptido  $\beta$ -amiloide en la enfermedad de Alzheimer. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de vías de señalización lipídica en los mecanismos de injuria oxidativa en terminales sinápticas de corteza cerebral expuestas a FeSO<sub>4</sub> (50 µM). Usando sinaptosomas preincubados en condiciones control y en presencia de Fe<sup>2+</sup> se determinó la actividad de la fosfolipasa D (PLD), de la fosfolipasa C (PLC) y de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). La actividad de la PLD y de la PLC se evaluó usando [<sup>14</sup>C]fosfatidilcolina (PC) exógena como sustrato. La actividad de la PI3K se midió en sistema entero y en inmunoprecipitados utilizando [<sup>32</sup>P]ATP. A los 5 min de exposición al insulto oxidativo se observó una disminución en la actividad mitocondrial con respecto a las condiciones control; dicha disfunción se acentuó a mayores tiempos de incubación (30 y 60 min). La generación de diacilglicerol (DAG) a

partir de PC se incrementó a los 5, 30 y 60 min de exposición al Fe<sup>2+</sup>. Tanto la generación de DAG en presencia de etanol como la de fosfatidiletanol, marcador de la actividad PLD, estuvieron estimuladas por efecto del ión metálico. Además la actividad de la PI3K y de su quinasa efectora, Akt, fueron estimuladas a los 5 min de exposición a la injuria oxidativa. Ensayos realizados con LY294002, inhibidor de PI3K, no afectaron el incremento de los niveles de DAG generados por el Fe<sup>2+</sup>. Nuestros resultados indican que las vías de transducción lipídica que generan DAG a partir de PC y fosfatidilinositol 3' fosfatos se encuentran activadas durante la injuria oxidativa en terminales sinápticas de corteza cerebral de rata.

**0516. (0331) METABOLIZACIÓN DE ENDOCANABINOIDES POR MONOACILGLICÉRIDO LIPASA EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.** VL Gaveglio, SJ Pasquaré, NM Giusto

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca*

El "sistema canabinoide" representa un nuevo mecanismo de comunicación celular. Está formado por tres tipos de elementos: 1) ligandos endógenos, 2) receptores de membranas, y 3) mecanismos para la inactivación de la señal. Los ligandos, 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y araquidoniletanolamina (AEA), son moléculas lipofílicas que actúan como neuroprotectores en enfermedades neurodegenerativas. El 2-AG es degradado enzimáticamente por la monoacilglucérido lipasa (MAGL). El propósito de este trabajo fue caracterizar la actividad de MAGL en SNC de ratas adultas. Para ello se trabajó con sinaptosomas provenientes de corteza cerebral (CC) y con fracción de membrana y soluble de cerebro y cerebelo. La actividad enzimática se ensayó empleando como sustrato monoacil-[<sup>3</sup>H]glicerol (MAG). El sustrato presenta una elevada proporción de ácidos grasos saturados siendo los mayoritarios ácido esteárico (43,5%) y palmítico (26,1%). El ácido graso monoenoico 18:1 representa el 13% del contenido total de acilos. El MAG se presentó solubilizado en buffer de ensayo, DMSO, Tritón X-100 o BSA. La transformación del sustrato por la MAGL fue del 85%. Cuando el MAG es agregado en BSA se evidencia un estímulo del 24% en la actividad de MAGL. Por otro lado el Tritón X-100 inhibió la actividad enzimática en un 27%. Comparando la actividad enzimática empleando el sustrato sin sonicar o sonicado, sólo se observa un aumento significativo (51%) en la actividad de MAGL cuando MAG es sonicado en DMSO. Al igual que en sinaptosomas la mayor actividad enzimática en fracción de membrana de cerebro y cerebelo se observó en presencia de BSA. Los resultados hallados indican un activo metabolismo de MAG mediado por MAGL en SNC.

**0517. (0805) CONTAMINACIÓN CON BAJAS DOSIS DE PLOMO: MODIFICACIONES DE LA CONDUCTA EXPLORATORIA Y LA ANSIEDAD EN RATAS.** PM Vargas, MK Cruz, LN Fracchia

*Cátedra de Metodología de la Investigación. Facultad de Medicina UNT*

Una investigación estudió a niños de una escuela pública con bajo coeficiente intelectual, hiperactividad, problemas de atención, agresión, ansiedad, depresión y conductas delictivas. Al analizar los factores que podrían producir esas alteraciones y al encontrar en este grupo concentraciones altas de plomo en hueso, destacaron la importancia de evaluar este tóxico como otro factor que contribuye a desencadenarlas. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la conducta exploratoria y alteraciones basales de ansiedad en un modelo experimental. Se trabajó con ratas Wistar machos, de tres meses de edad, divididas en un grupo control que recibió agua potable, y un grupo tratado con 50 ppm de acetato de plomo en el agua de bebida, el tratamiento se inició al destete y se prolongó durante tres meses. Se evaluó conducta en Campo Abierto y Laberinto en Cruz Elevado (LCE). Se empleó el Test de Mann Whitney, considerándose significativo  $p < 0,05$ . Se encontró en los animales experimentales un aumento significativo de la actividad locomotora, y de la frecuencia de exploración subterránea y aérea. Estos animales también mostraron una disminución

significativa de los niveles basales de ansiedad puesta de manifiesto en una mayor frecuencia de entrada y tiempo de permanencia en los brazos abiertos del LCE. Estos resultados permitirían investigar las posibles vías neuroquímicas involucradas en el desarrollo de las alteraciones conductuales observadas, estando este grupo investigando actualmente el rol de serotonina. Proyecto financiado por el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CUINT).

**0518. (0632) EL COTRATAMIENTO CON PROGESTERONA (PROG) Y 17 $\beta$ -ESTRADIOL (E2) ATENUA EL DESARROLLO DE ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE), MODELO MURINO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE.** LI Garay<sup>1,2</sup>, MC González Deniselle<sup>1,2</sup>, L Gierman<sup>1</sup>, M Meyer<sup>1</sup>, A Lima<sup>1</sup>, P Roig<sup>1</sup>, AF De Nicola<sup>1,2</sup>

1 Instituto de Biología y Medicina Experimental, 2 Depto. de Bioquímica Humana, UBA

Las mujeres embarazadas con EM remiten la enfermedad en el 3° trimestre, debido a los altos niveles de esteroides sexuales. Previamente describimos acciones beneficiosas de PROG en la EAE, mientras que el objetivo actual fue cotratamiento con PROG y E2. Un grupo (EAE+PROG+E2) recibió pellets de PROG (100mg) y E2 (2.5mg) una semana antes de la inducción de la EAE mientras que otro (EAE) permaneció sin tratamiento. Clínicamente, el grupo tratado no desarrolló signos de EAE. A nivel de la médula espinal se evaluó: 1-el % de desmielinización de la sustancia blanca, 2-el % de infiltración monocitaria por inmunohistoquímica (IHQ) para F4/80, 3-reactividad astrogliar por IHQ para la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP), 4-el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) neuronal por hibridización in situ e IHQ. El grupo EAE+PROG+E2 presentó respecto a EAE: a) marcado descenso de desmielinización cuantificada por Luxol Fast Blue, IHQ para la proteína básica de la mielina y proteína proteolipídica (EAE:10.8%, 8.4% y 8.2% vs. EAE+PROG+E2:2.22%, 1.02% y 1.18% respectivamente,  $p < 0.01$ ). b-menor infiltración macrófaga (EAE:14% vs. EAE+PROG+E2:0.9%;  $p < 0.05$ ). c- disminución de astrocitos GFAP+/mm<sup>2</sup> ( $p < 0.001$ ). En cuanto a BDNF, se encontró un mayor n° de neuronas inmunoreactivas en asta anterior luego del tratamiento hormonal acompañado de mayor expresión del ARNm (EAE:0.222 $\pm$ 0.009 granos/ $\mu$ m<sup>2</sup> vs. EAE+PROG+E2: 0.314 $\pm$  0.002;  $p < 0.0001$ ). **Conclusión:** El tratamiento con PROG y E2 resultó más efectivo que la monoterapia con PROG previniendo el desarrollo de signos clínicos y la desmielinización en la EAE. Los mecanismos intervinientes incluyen: neuroprotección y promielinización de la médula espinal, además de supresión de la respuesta inmune.

**0519. (0844) SEGUIMIENTO LONGITUDINAL DE NIVELES DE PROLACTINA EN LA ESQUIZOFRENIA CRÓNICA TRATADA CON ZIPRAZIDONA (BLOQUEANTE D2-5HTA2).** NM Zelaschi<sup>1</sup>, G Queipo<sup>1</sup>, F Archuby<sup>1</sup>, S Gaitan<sup>1</sup>, J Rodríguez<sup>1</sup>, LM Zieher<sup>2</sup>

1 Hospital Alejandro Korn, Melchor Romero, 2 CONICET

**Objetivos:** presentar evidencia complementaria de las modificaciones de los niveles de PRL (ng/ml) en pacientes esquizofrénicos de sexo femenino, hospitalizadas y tratadas con el antipsicótico atípico (AA) Ziprasidona (ZIP). **Método:** los resultados se expresan  $x \pm 1DS$ . a) Se empleó el criterio diagnóstico internacional DSM IV para trastornos esquizofrénicos; b) Pacientes estudiados: -grupo experimental- (GE: n = 7) c) Grupo de Control (GC); n = 11; PRL = 8.37  $\pm$  4.11) d) Rango de dosis: 60-80 mg/d, e) Número de dosajes. Se realizaron siete extracciones, una cada 10 días en ayunas (8 hs. AM) con el método ELISA, con un seguimiento de 9 semanas. **Resultados:** no se encontraron diferencias significativas de edades entre el GC:  $x = 50 \pm 9.74$  años y el GE:  $x = 44 \pm 11.34$  años; prueba de la U de Mann-Whitney: U = 57,  $p < 0.05$ . Para evaluar la hipótesis de que la ZIP aumenta los niveles de PRL se utilizó el test de ANOVA paramétrico luego de transformar los datos en log. naturales, que es un método robusto para pequeñas desviaciones de sus supues-

tos. Cada uno de los pacientes fue comparado al GC; una vez hallada las diferencias significativas se emplearon el método de comparaciones de Dunnet de una cola. a) Comparaciones entre pacientes (ANOVA); F = 8.8308,  $p = 0.0000$ ; b) Comparaciones múltiples contra el GC (Dunnet de una cola); b.1. NS en dos pacientes (2:7) (PRL = 14.26  $\pm$  4.57 y 12.31  $\pm$  10.60); b.2. significativa en cinco pacientes ( 5: 7) ,  $p = 0.0000$  ( rango de valores  $x$  de PRL, mínimo: 54.19  $\pm$  50.78 y máximo : 87.71  $\pm$  49.03). **Conclusiones:** El AA (ZIP) puede generar hiperprolactinemia en algunos pacientes de GE durante el tratamiento farmacológico de la esquizofrenia.

**0520. (0227) ACTIVACIÓN DE LA DIACILGLICEROL QUINASA MEDIADA POR INSULINA, EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATAS ADULTAS Y SENILES.** SE Zulian, MG Ilincheta de Boschero, NM Giusto

Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca

La Insulina y el receptor de Insulina (IRs) han sido identificados en SNC participando en vías de transducción de señales en procesos cognitivos. El deterioro de las vías de señalización mediadas por Insulina se ha relacionado con cambios neurodegenerativos en áreas de alta actividad sináptica, como el hipocampo (H). Estas alteraciones ocurren en el envejecimiento y en algunas enfermedades, como la de Alzheimer. La diacilglicerol quinasa (DGK), es una enzima que participa en la regulación de dos importantes mensajeros lipídicos: el ácido fosfatídico (PA) y el diacilglicerol (DAG). **Objetivos:** Evaluar la actividad de DGK mediada por Insulina en sinaptosomas de corteza cerebral (CC) e hipocampo de ratas adultas y seniles, comparando las actividades en presencia de DAGs endógenos y exógenos de diferente composición. La Insulina aumentó significativamente la actividad DGK en sinaptosomas de H, tanto con DAGs endógenos como exógenos. El efecto estimulatorio fue similar cuando se empleó DAG di-16:0 en ambas preparaciones (CC ó H). Utilizando DAG 18:0-20:4 como sustrato el incremento fue superior en H (175%) que en CC (64%) respecto al valor basal. Además, la selectividad del estímulo de Insulina en H respecto a CC, sobre la utilización de DAG 18:0-20:4, fue superior en animales seniles. En ausencia de Insulina, no se observaron diferencias en la actividad DGK, en los sinaptosomas de CC de ratas seniles con respecto a adultas cuando se emplearon DAGs endógenos o DAGs di-16:0 exógenos. Por el contrario la actividad en presencia de DAG 18:0-20:4 fue inhibida significativamente. En base a nuestros resultados y debido a que de las 10 isoformas descriptas para la DGK, sólo la DGK epsilon muestra selectividad por el sustrato DAG que contiene ácido araquidónico en posición 2, se sugiere que la DGK epsilon participaría en la modulación de las vías de señalización activadas por Insulina en H y que la actividad de ésta isoforma se encontraría modificada en animales seniles.

## ONCOLOGÍA VI

**0521. (0351) APLICACIÓN BIOLÓGICA DE NANOFIBRAS DE POLIANILINA EN TERAPIA FOTOTÉRMICA CONTRA EL CÁNCER.** El Yslas<sup>1</sup>, RE Vocos<sup>1</sup>, D Peralta<sup>2</sup>, C Barbero<sup>2</sup>, VA Rivarola<sup>1</sup>

1 Dpto Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto, 2 Dpto Química, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto

La terapia fototérmica (TFT) se basa en que las células cancerosas debidas a su reducido flujo sanguíneo no son capaces de sobrevivir a temperaturas superiores a 41 °C. Cuando ciertos nanomateriales son irradiados con luz en la región del infrarrojo cercano (NIR) estos absorben la radiación y la liberan como calor provocando la muerte celular. **Objetivos:** Síntesis de polianilina (PANI) nanoestructurada. Estudio de la internalización de las NFDAPVPD (nanofibras dansiladas dispersadas con polivinilpirro-

lidona (PVPD)). Estudio de su toxicidad en oscuridad en la línea celular PAM (Queratinocitos transformados). La PANI presenta una banda de absorción óptica con un máximo a 800nm. Cabe destacar que los tejidos vivos son transparentes entre los 700-1200nm, por lo tanto, la radiación podría penetrar y ser absorbida por la PANI, lo cual nos posibilita aplicar la TFT en tumores masivos. Las nanofibras (NF) fueron sintetizadas por polimerización interfacial. Aunque las NF forman una suspensión estable en medio ácido, debido a la repulsión de cargas sobre su superficie, a pH fisiológico la ausencia de carga hace que precipiten. Para mantenerlas dispersas se las solubilizó por interacción no covalente con PVPD. Con el objetivo de seguir la captación de las NF por las células se realizó el marcado fluorescente de la superficie de éstas por reacción con Dansilo. Los estudios sobre la internalización de las NF muestra un patrón granular en la región citoplasmática (Mic. fluorescencia). Los ensayos de viabilidad celular en oscuridad (MTT) permitieron determinar que, en un rango entre 20-120  $\mu$ l de PADAPVPD/ml de medio de cultivo, no se observaron cambios. Por otra parte para corroborar que las nanofibras no son tóxicas se realizaron estudios morfológicos (Hö) en los cuales no se observaron cambios de las células tratadas con respecto a las células control. **Conclusión:** La NFDAPVPD es un interesante nanomaterial por ser biocompatible para su posterior aplicación en TFT.

**0522. (0347) ACTIVIDAD DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE PORTADORES DE CÁNCER DE VEJIGA MURINO EN UN MODELO DE CICATRIZACIÓN IN VIVO. ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO.** A Guionet, C Lodillinsky, A Casabé, AM Eiján

*Instituto de Oncología "Angel H Roffo" - UBA*

El Bacilo Calmette Guerin (BCG) es el tratamiento estándar para prevenir recidivas y progresión de cáncer vejiga (CaV) superficial de alto grado histológico, pero el mecanismo de acción no es completamente conocido. Anteriormente observamos que BCG inhibe el crecimiento de tumores generados por inoculación sc de la línea de CaV MB49, generando depósito de colágeno; mecanismo similar a la cicatrización de heridas. Este efecto es potenciado por la administración de L-NAME, inhibidor de la producción de óxido nítrico (NO). Los macrófagos (MAC) son una de las células centrales en la respuesta a BCG y en la cicatrización, por eso evaluamos el rol de MAC peritoneales de ratones C57BL/J6 portadores de tumor MB49 tratados o no con BCG (2mg/ml) (MAC-P-BCG o MAC-P) sobre un modelo in vivo de cicatrización. Se determina la producción de NO midiendo nitrito con el reactivo de Griess. A ratones C57BL/J6 previamente anestesiado se les realiza una herida circular de 3mm, donde se colocan 10E6 MAC de los diferentes grupos con o sin L-NAME (2mM). A tiempo cero (t0) y diariamente se fotografían las heridas para medir su superficie. Los resultados se informan como % promedio de superficie no reparada respecto a t0, n=5 error < 10%, estadística ANOVA-Tukey. La herida sin tratamiento se repara completamente en 7 días, siendo del 120, 90, 60, 50 y 24 % a las 24, 48, 72, 96 y 120h respectivamente. Los MAC aceleran la reparación (MAC: 71%; MAC-P 50% y MAC-P-BCG 65%, (p<0.001 para todos los grupos vs sin tratamiento) y p<0.05 entre MAC-P y MAC-P-BCG. La producción de NO está incrementada en MAC-P-BCG (31± 3 nmol/10E6 MAC) vs MAC-P (5 ± 1 nmol/10E6 MAC) p< 0.001. El agregado de L-NAME junto con MAC-P y MAC-P-BCG aceleró la cicatrización en un 10%. Nuestros resultados muestran una participación de los MAC del portador de tumor en la reparación que es contrarrestado por NO, sugiriendo que su inhibición podría mejorar la respuesta a BCG.

**0523. (0508) VALOR PRONÓSTICO DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN NEURAL NCAM EN TUMORES DE PULMÓN DE CÉLULAS NO PEQUEÑAS (NSCLC).** L Mauro<sup>1</sup>, ML Dalurzo<sup>2</sup>, D Smith<sup>2</sup>, J Lastiri<sup>2</sup>, B Vasallo<sup>2</sup>, F Roca<sup>1</sup>, G Pallota<sup>2</sup>, E Bal de Kier Joffé<sup>1</sup>, L Puricelli<sup>1</sup>

*1 Área Investigación. Instituto de Oncología Angel H Roffo, 2 Hospital Italiano de Buenos Aires*

La molécula de adhesión neural NCAM se expresa en sistema nervioso y en algunos tumores de origen neuroectodérmico, como el cáncer de pulmón a células pequeñas, donde tiene utilidad como marcador de diagnóstico. Si bien los métodos diagnósticos más sensibles han llevado a la detección del cáncer pulmonar en estadios más tempranos, el pronóstico de estos pacientes sigue siendo incierto. El objetivo de este trabajo fue estudiar, mediante inmunohistoquímica, la expresión de la molécula NCAM en 55 cortes histológicos de tumores NSCLC de pacientes de estadio EI (n=45) y EII (n=10) y comprobar si esta expresión está asociada al pronóstico del paciente. Encontramos que el 40,0% (22/55) de las muestras tumorales fueron completamente negativas para el marcador. Por otro lado, el 21,8% (12/55) de los tumores expresaron NCAM en sus membranas plasmáticas, mientras que el 38,2% (21/55) presentó una pobre expresión (< 10% de células positivas). No observamos asociación estadísticamente significativa entre la expresión de NCAM y el sexo, la edad, el tipo histológico, el estadio, el hábito de fumar o la presencia de células tumorales en el lavado pleural (test de Chi cuadrado y análisis de correlación). La curva de Kaplan-Meier mostró que la presencia de NCAM se asocia con menor supervivencia global (Log Rank test: 4,07, p<0,05). Así, mientras sólo el 5% de los pacientes con tumor NCAM negativo muere, casi el 30% de los pacientes con tumores positivos lo hace. El análisis multivariado de Cox indicó que ni las características clínicas del paciente al momento del diagnóstico ni la histología tumoral, influyen en esta asociación. Concluimos que los tumores NSCLC son heterogéneos para la presencia de NCAM. La expresión de esta molécula se asoció a peor pronóstico indicando su posible utilidad como marcador. Así, los pacientes con tumores NSCLC positivos para NCAM podrían ser considerados para el tratamiento con terapia adyuvante, aún siendo de estadios bajos.

**0524. (0564) CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO MDR EN CÉLULAS LEUCÉMICAS HUMANAS K562.** Y Assef<sup>1</sup>, MF Rubio<sup>2</sup>, G Coló<sup>2</sup>, S del Mónaco<sup>1</sup>, MA Costas<sup>2</sup>, BA Kotsias<sup>1</sup>

*1 Lab. Neurofisiología, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari (IDIM-CONICET), 2 Lab. Biología Molecular y Apoptosis, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari (IDIM-CONICET)*

La resistencia simultánea a diferentes agentes antineoplásicos, conocida como multidroga resistencia (MDR), se correlaciona con la sobreexpresión de P-glicoproteína (P-gp) en las células tumorales y es una de las razones del fracaso de la quimioterapia. En el presente trabajo caracterizamos el fenotipo MDR en la línea celular leucémica humana K562 y su derivada resistente a vincristina (K-Vinc). La citotoxicidad a vincristina fue evaluada mediante el método de MTT siendo las IC50 de 0.5±0.5 y 400.6±219.8  $\mu$ M para las células K562 y K-Vinc, respectivamente (p<0.01, n=8). La expresión de P-gp fue detectada por western blot como una banda a ~170 kDa, sólo en las células K-Vinc. Los estudios de funcionalidad de P-gp en términos de acumulación de la sonda Fluo-3 utilizando la citometría de flujo corroboraron estos resultados (p<0.01, n=3). Para evaluar si las células seleccionadas con vincristina son multidroga resistentes analizamos la viabilidad celular (con MTT) en presencia de drogas estructuralmente no relacionadas en ambos tipos celulares. Los índices de resistencia definidos como IC50 K-Vinc/IC50 K562 para imatinib, colchicina y doxorubicina fueron: 8.0±0.3, 44.8±8.8 y 2.8±0.4, respectivamente (n=5). Previamente, determinamos por EMSA que ambos tipos celulares presentaron actividad constitutiva de NF- $\kappa$ B, siendo menor en las células resistentes. Estudios preliminares muestran que el inhibidor de NF- $\kappa$ B, BAY 11-7082 (2,5  $\mu$ M) incrementa la toxicidad al imatinib en las células K-Vinc pero no en K562. Las IC50 para imatinib e imatinib +BAY en K562 fueron 0.16±0.14 y 0.11±0.01  $\mu$ M, respectivamente (p=0.25, n=7) y de 1.52±0.50 y 0.58±0.67  $\mu$ M, respectivamente, en K-Vinc (p<0.01, n=5). Nuestros resultados permiten concluir que las células K562 seleccionadas con vincristina (K-Vinc) son multidroga resistentes. Además, el BAY 11-7082 incrementa la toxicidad al imatinib en estas células, que presentan una menor actividad constitutiva de NF- $\kappa$ B.

**0525. (0630) CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA Y EXPRESIÓN DE MARCADORES DE PROGRESIÓN TUMORAL EN ADENOCARCINOMAS DE MAMA INDUCIDOS EN EL RATÓN POR EL VIRUS POLIOMA.** S Símula, E Goldschmidt, N Sanjuan

*Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, U.B.A.*

El objetivo de este trabajo fue caracterizar histológicamente las neoplasias de mama inducidas por el virus Polioma y correlacionarlas con la expresión de los marcadores de progresión tumoral PCNA, Her 2-Neu, MMP-2 y p-53 junto con la expresión de antígenos virales y la presencia de virus infectivos. Se inocularon ratones neonatos C3H BiDa con la cepa A2 del virus. A los 70 días post-infección (pi) las neoplasias fueron estudiadas histológicamente y se detectaron los antígenos mencionados arriba con la técnica de inmunoperoxidasa (PAP). En homogenatos de los tumores se detectó por Western Blot la expresión de los antígenos LT y mT y de la proteína tardía VP-1, así como la presencia de virus infectivos por adsorción sobre monocapas de células NIH-3T3 y posterior Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) contra VP-1. Se estudiaron 19 tumores, 9 de ellos desarrollados en hembras y 10 en machos. Como los resultados observados en animales de ambos sexos no mostraron diferencias, se los describe en conjunto. En todos los casos los tumores expresaron VP-1, mT y LT (deleciónado), pero no pudo aislarse virus infectivos. Todas las neoplasias eran adenocarcinomas intraductales (comedocarcinomas), con áreas de proliferación papilar y con grado de diferenciación nuclear 3 y ningún tumor invadía los tejidos adyacentes. En 14/19 casos se observó inmunomarcación intranuclear positiva para PCNA y en todos ellos marcación para Her-2 Neu. En ningún caso pudo detectarse la expresión de MMP-2 ni de p-53 intranuclear. Se concluye que Polioma induce neoplasias de mama con un alto índice de proliferación y con un eventual mal pronóstico, pero que ellas no son ni infiltrativas ni con potencial metastático. Asociando estos datos con los descriptos en la expresión de antígenos virales, se postula que estos tumores están compuestos por diferentes subpoblaciones celulares en las que, probablemente, el genoma viral se encuentra en distintas formas físicas en el núcleo celular.

**0526. (0424) EFECTO DEL CRECIMIENTO DEL FIBROSARCOMA MURINO MCC SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO DEL PORTADOR. II. RESPUESTA INMUNE FRENTE A UN ANTÍGENO NO TUMORAL.** AF Maglioco, GV Camerano, J Mundiñano, D Lorenzo, HL Costa, G Cabrera, RA Ruggiero, GI Dran

*ILEX CONICET*

Las APCs de piel sirven como modelo para estudiar la función de las CDs en los tejidos. En un trabajo previo observamos que el desarrollo del MCC induce alteraciones sobre las células inmunes presentes en los ganglios, según el estadio de desarrollo tumoral y la localización de aquellos. Dado que las CDs son una de las principales células afectadas, investigamos el efecto del tumor sobre la capacidad de las APCs de captar un antígeno en piel (FITC), migrar al ganglio y desencadenar una respuesta primaria T. Se topicó con FITC cerca y lejos del tumor a lo largo de su desarrollo (NP, INM y AV), y 24 hs después se analizó presencia y fenotipo de células FITC+ y otras en los ganglios correspondientes. En individuos sin tumor, la topicación induce una agrandamiento del ganglio local debido en parte al incremento (~220%) del N° total de CDs, dentro de las cuales el 25,1±3,7% son FITC+. Cuando la topicación se realizó en portadores de tumor, tanto sobre el ganglio drenante del tumor (GT) como sobre el distal (GD), la proporción de CDs/FITC+ fue siempre menor (7,4±4\*~10,5±5\*). Sin embargo esta disminución sólo fue atribuible a inhibición de la actividad de las APCs en las fases NPGT y AVGD. En INM y AVGT, los aumentos del N° CDs FITC+ y FITC- (\*\*\*) y de linfocitos TCD4+ (N°CD4+×106: 7,14±0,7\*\*\*, 8,1±0,6\*\*\*, 7,6±0,5\*\* y 3,2±0,9, para INMGT, INMGD, AVGT y ct) indicaron exacerbación de la respuesta. Además en INM y AV, un alto N°

de CD11c+/FITC+ expresaron CD19+ (\*\*), marcador de fenotipo tolerizante. El tumor indujo además un aumento del N° de linfocitos CD19+ marcados con FITC, sugiriendo que las células B podrían captar el antígeno ante un posible impedimento en la actividad de las CDs. Los datos sugieren que en NP la respuesta a FITC está inhibida en lo referente a las CDs. Si bien en INM y AV la reacción fue aparentemente mayor, la alta cantidad de CDs CD19+ podría estar jugando un rol inhibitorio. Dicho análisis requiere realizar estudios funcionales. (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

**0527. (0513) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON RETINOIDES (ATRA, RETINOL) EN LA LÍNEA TUMORAL MAMARIA MURINA MIXTA LM38-LP COMUESTA POR POBLACIONES LUMINAL Y MIOEPITELIAL.** PB Campodonico<sup>1</sup>, LB Todaro<sup>1</sup>, LI Puricelli<sup>1</sup>, E Farias<sup>2</sup>, ED Bal de Kier Joffé<sup>1</sup>

*1 Area Investigacion del Instituto de Oncologia Angel H. Roffo, 2 Mount Sinai School of Medicine, Division of Oncology. NY. USA.*

El sistema retinoideo regula proliferación, diferenciación, apoptosis y puede interferir con la oncogénesis inhibiendo crecimiento y progresión tumoral. **Objetivo:** analizar los mecanismos involucrados en el efecto de los retinoides sobre la interacción entre células luminales (LEP) y mioepiteliales (MEP) de la línea LM38-LP. Antes determinamos que LM38-LP expresa los receptores retinoides RARα y RARβ2. En este trabajo observamos que ATRA aumenta la expresión de RARβ2 (RT-PCR) confirmando la funcionalidad del sistema. El tratamiento por 96hs con ATRA induce arresto del ciclo celular en G1 (cels G1: 37%ctl vs 51%ATRA, p<0.05). El uso del antagonista Ro415253 da cuenta de que este efecto involucra al receptor RARα (cels G1: 39%). Asociado a este evento se detectó un incremento del inhibidor del ciclo celular p27 y una inhibición de las ciclinas D1 y B1 (WB). Además observamos aumento de la apoptosis asociada a la expresión aumentada de caspasa-3 activada (WB). Mediante IF y microscopía confocal observamos, en monocapas confluentes, que células MEP se marcan para p27 e islotes LEP para PpRB (marcador de proliferación). El tratamiento con ATRA, Retinol y AM580 (agonista RAR) muestra aumento de la proporción de células MEP arrestadas y disminución de PpRB en el centro de los islotes LEP, mientras que las células (aprox 4%) que bordean a los mismos y contactan con las MEP permanecen positivas para PpRB. Mediante un ensayo de clonogenicidad, sembrando las células a muy baja densidad, determinamos que el tratamiento prolongado con retinoides no afecta la capacidad clonogénica (3,8±0,2 ctl vs 4,9±0,9 ATRA) de la línea LM38-LP. En conclusión los retinoides ejercen efectos pro-apoptóticos y citostáticos diferenciales sobre las subpoblaciones LEP y MEP que constituyen la línea tumoral mamaria LM38-LP. Asimismo los resultados sugieren la existencia de una tercera población con capacidad clonogénica y resistente a los retinoides.

**0528. (0201) ESTADO DE LA VÍA WNT/β-CATENINA EN LA PRENEOPLASIA HEPÁTICA EN LA RATA.** JP Parody<sup>1</sup>, ML Alvarez<sup>1</sup>, AD Quiroga<sup>1</sup>, MT Ronco<sup>1</sup>, DE Francés<sup>1</sup>, GB Pisani<sup>2</sup>, CE Carnovale<sup>1</sup>, MC Carrillo<sup>1,2</sup>

*1 Instituto de Fisiología Experimental - CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario., 2 Area Morfología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.*

La vía Wnt/β-catenina participa en diversos procesos biológicos tales como en el desarrollo embrionario y en la carcinogénesis. β-catenina, proteína asociada a E-caderina, interviene en la adhesión célula-célula a nivel de la unión adherente. β-catenina libre es regulada por un complejo multiproteico que la fosforila marcándola para proteólisis. Cuando las proteínas Wnt se unen a receptores Frizzled (Fzd), se activa la vía canónica estabilizando β-catenina, que migra al núcleo y activa la transcripción de diversos genes. Previamente demostramos que el interferón alfa-2b (IFN) reduce el número y volumen de los focos hepáticos altera-

dos (FHA) mediante la inducción de apoptosis. Nuestro objetivo fue estudiar el estado de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la preneoplasia hepática y el posible efecto del IFN sobre esta vía. Utilizamos 4 grupos de ratas: a) C (controles), b) C+IFN; c) IP (iniciadas-promovidas) y d) IP+IFN. Mediante inmunohistoquímica evaluamos la localización subcelular de  $\beta$ -catenina. Los hígados de ratas C presentaron localización normal en la membrana plasmática. Los FHA de ratas IP y IP+IFN mostraron tinción significativamente reducida en membrana comparada con tejido adyacente o con ratas C. Mediante Western blot confirmamos en fracción de membrana plasmática de ratas IP y IP+IFN una disminución de un 75%\* y un 80%\* en los niveles de  $\beta$ -catenina, respectivamente (\* $p < 0,05$  con respecto a C). Por otro lado, el receptor Fzd7 aumentó 30\* veces en ratas IP comparado con C, mientras que en IP+IFN aumentó sólo 15\* veces con respecto a C indicando un posible efecto beneficioso del IFN (\* $p < 0,05$ ). Estas alteraciones vistas en ciertos componentes de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina pueden considerarse indicios del desarrollo de un fenotipo metastásico en los hepatocitos. Al evidenciarse en una fase temprana de preneoplasia hepática pueden ser posibles blancos terapéuticos para el tratamiento y prevención de hepatocarcinomas.

**0529. (0614) EFECTO DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO (MMTV) DE RATONES CBI+ EN EL DESARROLLO DE TUMORES DE MAMA EN RATONES BALB/C/S. C Bosch<sup>1</sup>, C Suárez<sup>1</sup>, I Piazzon<sup>2</sup>, L Hinrichsen<sup>1,3</sup>**

*1 Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, 2 División Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina, 3 CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario*

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es una causa común de desarrollo de tumores de mama en ratones con genotipo susceptible. Las hembras de la línea CBI+ (colonia CBI-IGE.) desarrollan tumor antes de los 360 días de edad (mediana: 243) con una incidencia muy alta (99.9%), y poseen una variante del MMTV exógeno que produce delección del clon  $\nu\beta 14+$  de células T que reconocen Sag, en ratones Balb/c amantados por CBI+. El objetivo de este estudio fue determinar la capacidad carcinogénica del MMTV exógeno detectado en la línea CBI+ sobre el desarrollo de tumores mamarios en ratones hembras Balb/c libres de MMTV exógeno. El desarrollo de tumores se estudió en hembras Balb/c/s (colonia Div. Medicina Experimental, ANM) amantados por CBI+ (Balb/c/+; n=7) o amantados por madres de su propia línea (Balb/c/s; n=12); las hembras de ambos grupos tuvieron un ciclo reproductivo completo (parición y lactancia). La aparición de tumores de mama se detectó por palpación; su tamaño y el estado general de salud de las hembras se controlaron semanalmente. Los animales se sacrificaron cuando el tumor alcanzó el tamaño máximo permitido, cuando se observaron signos de deterioro físico o cuando alcanzaron los 600 días de edad. La curva de edad de detección del tumor (latencia de inducción del tumor) se analizó con el método de Kaplan-Meier. Las diferencias en la proporción de animales con tumor se analizaron con la prueba de Fisher. Ambos grupos difirieron significativamente en la curva de latencia ( $p < 0.0001$ ). La proporción de animales con tumor fue 71% en los Balb/c/+ mientras que los Balb/c/s no desarrollaron tumor de mama ( $p = 0.0018$ ). La mediana de edad de detección del tumor de los ratones Balb/c/+ fue de 397 días, y los Balb/c/s se sacrificaron al final del experimento (560-600 días de edad ( $p = 0.0012$ )). Estos resultados sugieren que las hembras CBI+ tienen una alta viremia y/o un nuevo virus recombinante entre las variantes exógena y endógena, de gran capacidad tumorigénica.

**0530. (0142) EFECTO CITOTÓXICO DE DEHIDROLEUCODINA SOBRE LÍNEAS CELULARES MAMARIAS HUMANAS TUMORIGÉNICAS Y NO-TUMORIGÉNICA. MM Montt Guevara<sup>1</sup>, AB Penissi<sup>2</sup>, RW Carón<sup>1</sup>, SB Nadin<sup>1</sup>, FA Bruna<sup>1</sup>, LM Vargas Roig<sup>1</sup>**

*1 IMBECU-CONICET, 2 IHEM-CONICET*

Dehidroleucodina (DhL), una lactona sesquiterpénica (LS), es el principio activo de Artemisia douglasiana Besser, conocida popularmente como "matico". Varias LS poseen efectos antitumorales pero no se ha estudiado si DhL tiene esta propiedad. En estudios preliminares observamos que DhL causó un elevado efecto citotóxico en células MDA-MB-231 (receptor de estrógeno negativo) sin afectar la viabilidad de linfocitos humanos. **Objetivo:** Establecer si DhL afecta la viabilidad de células tumorígenicas MDA-MB-231 y MCF-7 (receptor de estrógeno positivo) y no-tumorígenicas (MCF-10A). **Metodología:** Se cultivaron las células MDA-MB-231 y MCF-7 en DMEM y MCF-10A en DMEM-F12 con hidrocortisona, insulina y rhEGF, todos los medios fueron suplementados con 10% de SFB. Linfocitos de sangre periférica humana de 4 dadores se cultivaron en RPMI-1640. Las células fueron expuestas a DhL (disuelta en DMSF) durante 15 o 60 minutos a distintas concentraciones (control, DMSF, 5  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  y 100  $\mu\text{g/ml}$  DhL). Se evaluó la viabilidad celular por azul tripán después de la adición de DhL a distintos tiempos (0, 4, 8 y 24 horas). Los ensayos se realizaron por triplicado. **Resultados:** La viabilidad celular de MDA-MB-231 disminuyó significativamente con 25  $\mu\text{g/ml}$  y 50  $\mu\text{g/ml}$  de DhL a partir de las 8 horas ( $p < 0.05$  y  $p < 0.001$  respectivamente) con 15 o 60 minutos de exposición. La viabilidad celular de MCF-7 y MCF-10A disminuyó significativamente con 25  $\mu\text{g/ml}$  y 50  $\mu\text{g/ml}$  de DhL a partir de las 4 horas con 15 o 60 minutos de exposición ( $p < 0.001$ ). La viabilidad de las tres líneas celulares mamarias disminuyó con 100  $\mu\text{g/ml}$  de DhL desde el tiempo 0 con 15 o 60 minutos de exposición ( $p < 0.001$ ). Interesantemente la viabilidad de los linfocitos expuestos a DhL durante 15 o 60 minutos no se modificó significativamente. **Conclusión:** Estos datos demuestran que DhL presenta efecto citotóxico en células tumorígenicas y no-tumorígenicas mamarias, pero no afecta la viabilidad de linfocitos normales.

**0531. (0521) P53 Y P300 SON RECLUTADOS EN AGRESOMAS DE ADENOCARCINOMAS MAMARIOS MURINOS PERO ESTÁN AUSENTES DE ESTAS INCLUSIONES YUXTANUCLEARES EN LA GLÁNDULA MAMARIA NORMAL. ME Fermento, CA Lang, NA Gandini, L Fiore, MM Facchinetti, AC Curino**

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca, INIBIBB, CONICET*

El p300 participa en numerosos procesos tales como proliferación, apoptosis, respuestas celulares al daño en el ADN y funciona como co-factor transcripcional de varias proteínas nucleares, entre ellas el p53. Evidencia reciente sugiere que los niveles de expresión de p300 están alterados en distintos tipos de cáncer. También está involucrado en la regulación de los niveles de p53 modulando su degradación. La degradación proteica proteosomal involucra ubiquitinización y degradación en los proteosomas. Cuando la actividad de estos últimos se inhibe, se forman inclusiones yuxtancleares llamadas agresomas, caracterizadas por la presencia de ubiquitina, vimentina, HDAC6, etc, que frecuentemente inducen sobrevida celular. En este trabajo se utilizaron cultivos primarios obtenidos de un modelo murino transgénico de cáncer de mama para estudiar los efectos del tratamiento con un inhibidor proteosomal (MG132) sobre el reclutamiento de p300 y p53 a los agresomas resultantes, comparando los adenocarcinomas con las glándulas mamarias normales. Se observó expresión de p300 y p53 tanto en células de mama normal como neoplásicas, siendo los niveles de p53 mucho más elevados en las células tumorales. En células normales tratadas con el inhibidor, el p53 aumenta, es reclutado en el núcleo, y los agresomas no contienen ni p53 ni p300. Contrariamente, en las células provenientes del tumor tratadas de igual modo, los agresomas sí reclutan tanto p53 como p300. La presencia de p53 y p300 en los tumores mamarios y glándulas mamarias de los animales fue confirmada mediante inmunohistoquímica y western blot. Estos resultados demuestran que existe una formación diferencial de agresomas conteniendo p53 y p300 entre las células neoplásicas y las de mama normal y abren la posibilidad de que los agresomas se constituyan en blancos de estrategias terapéuticas.

**0532. (0443) EL HUÉSPED RESPONDE A UN TUMOR COMO ANTE A UN FENÓMENO INJURIANTE-REPARATIVO. L Speroni<sup>1</sup>, J Gasparri<sup>1</sup>, S Alonso<sup>1</sup>, RP Meiss<sup>2</sup>**

*1 Universidad Nacional de Quilmes, 2 Centro de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina*

El propósito de este trabajo fue demostrar que la respuesta del huésped ante un tumor sería similar a la de una injuria que le genera una respuesta inflamatoria, reparativa-regenerativa. Se estudió la respuesta en el ganglio drenante ante la inoculación de: MC-C (fibrosarcoma murino de alto contenido necrótico); células necróticas de MC-C; fibroblastos viables y en vías de degeneración y ante la generación de una ulcera cutánea. Luego de 72 hs se extrajo el ganglio popliteo y se determinaron por RT-PCR los niveles de expresión de TGF- $\beta$  e IL-10. Ante la inoculación de tumor, necrosis tumoral, fibroblastos viables y en vías de degeneración, no se encontraron diferencias en la expresión de TGF- $\beta$ ; sin embargo se observó, con respecto al control, un aumento similar en los niveles de IL-10. En cambio en el caso de la ulcera en reparación la diferencia no fue significativa. Paralelamente se inició el estudio por citometría de flujo de la respuesta en el ganglio popliteo ante la inoculación de MC-C y necrosis de MC-C. Los resultados en número absoluto  $\times 10^6 \pm$  SD fueron:

	MC-C	Necrosis de MC-C	Control
CD11c+	0.82 $\pm$ 0.23	0.35 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.03
B220+	4.07 $\pm$ 0.24	2.43 $\pm$ 0.50	0.60 $\pm$ 0.19
CD4+	3.5 $\pm$ 0.32	2.31 $\pm$ 0.42	1.36 $\pm$ 0.44
CD8+	1.6 $\pm$ 0.15	1.06 $\pm$ 0.1	0.50 $\pm$ 0.15
CD4+CD25+	0.43 $\pm$ 0.03	0.38 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02

Los datos muestran un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de estos parámetros tanto ante la inoculación de tumor como de necrosis con respecto al control. De acuerdo a la expresión de citoquinas, la necrosis tumoral, fibroblastos en vía de degeneración y una ulcera cutánea en reparación generan en el huésped cambios inmunológicos similares a los generados por un tumor. Los datos obtenidos por citometría de flujo sugieren que la respuesta que origina el tumor en el huésped estaría dirigida principalmente por su contenido necrótico. En conclusión el huésped responde al tumor en forma no diferente a la que lo hace ante fenómenos que involucran injuria, reparación-regeneración.

**0533. (0218) POLIMORFISMOS DE LOS GENES CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTT1, GSTP1 Y P53 Y SU RELACION CON EL DESARROLLO DE CÁNCER DE MAMA FAMILIAR EN UNA POBLACION COLOMBIANA. A Orłowski<sup>1</sup>, NE Rangel<sup>2</sup>, YY Pinto<sup>2</sup>, SR Ramirez<sup>2</sup>, SM Richard<sup>1</sup>**

*1 Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC-CONICET, La Plata., 2 Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Básicas, Facultad Medicina. Universidad del Rosario. Bogota, Colombia.*

En Colombia, el cáncer de mama es la tercera causa de muerte por cáncer. Entre el 10-15% son de origen familiar, de los cuales el 5% se asocian con mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2. Dado que el 10% restante podría ser explicado por variantes genéticas de baja penetrancia, el objetivo del presente trabajo fue describir la frecuencia de los polimorfismos de los genes CYP1B1 (Val432Leu, Asn453Ser), CYP1A1 (T6235C, Thr461Asn, Ile462Val), GSTM1, GSTT1, GSTP1 (Ile105Val) y p53 (Arg72Pro, Intron3, Intron6) en un grupo de individuos colombianos con cáncer de mama familiar (120) con respecto a un grupo control (240), mediante PCR y RFLPs. Encontramos diferencias en la distribución de las frecuencias genotípicas entre casos y controles para los polimorfismos GSTM1 ( $P=0.000$ ) e Intron3 ( $P=0.000$ ) de p53. Así mismo, riesgo asociado al desarrollo de cáncer de mama hereditario familiar fue encontrado para los genotipos Ile/Ile de Ile462Val (OR ajustado 1.78 IC95% 1.04-3.05), Arg/Arg de Arg72Pro (OR ajustado 1.88 IC95% 1.10-3.21) y m/w Intron3 de p53 (OR ajustado 18.00 IC95% 2.20-147.19). Por otro lado una disminución significativa del riesgo a desarrollar cáncer de mama se asoció con

los genotipos GSTM1\*1 (OR ajustado 0.37 IC95% 0.22-0.63), Asn/Asn de Asn453Ser (OR ajustado 0.59 IC95% 0.35-0.99) y w/w Intron3 de p53 (OR ajustado 0.08 IC95% 0.01-0.38). El análisis de las características clínicas y hábitos alimenticios entre casos y controles evidenció una asociación significativa entre fumar, edad de la menarca, edad del primer hijo, uso de terapia hormonal, consumo de embutidos, enlatados y carnes asadas ( $P=0.05$ ) con el desarrollo del cáncer de mama heredo familiar. Concluimos que existen variantes genéticas relacionadas con el riesgo a desarrollar el cáncer de seno en el grupo de pacientes estudiadas, los datos son la base para la realización de estudios poblacionales que incluyan un mayor número de casos, diferentes poblaciones y el probable estudio de polimorfismos en otros genes.

**0534. (0235) MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA CELULAR A LA LIPOFECCIÓN DEL GEN DE INTERFERÓN-B. MS Villaverde<sup>1</sup>, L Krawiec<sup>2</sup>, ML Gil Cardeza<sup>1</sup>, GC Glikin<sup>1</sup>, LME Finocchiaro<sup>1</sup>**

*1 Unidad de Transferencia Genética, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, 2 Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA). CONICET*

El tratamiento por transfección del gen del interferón beta humano (hIFN $\beta$ ) complejado con liposomas catiónicos (lipofección), proporciona una novedosa estrategia terapéutica para el sarcoma de Ewing. En una línea derivada de este tumor (EW7) investigamos los efectos citotóxicos de la lipofección del gen hIFN $\beta$  mediados por: a) la producción de especies oxidantes (método colorimétrico y luminómetro) b) los niveles citosólicos de un inhibidor de peroxidasas: inositol fosfoglicano (IPG) (método enzimático), y su posible correlación con: a) el mecanismo de apoptosis/necrosis (citometría de flujo, tinción con naranja de acridina/bromuro de etidio), b) la expresión del gen oncosupresor p53 (inmunofluorescencia y western blot) y c) la inducción de senescencia (reacción citoquímica). El análisis por citometría de flujo mostró una compleja respuesta a la lipofección con el gen hIFN $\beta$ : mientras que al día 2 se observa acumulación de células en la región hiperploide sugiriendo una re-entrada en fase S sin división celular, al día 5, el 87% se acumula en la región apoptótica sub-G1, sugiriendo apoptosis luego de un prolongado bloqueo mitótico. A los 7 días post lipofección las células tratadas superaron el 50% de senescencia (control < 8%). La relación de células apoptóticas/necróticas fue >1 a tiempos cortos de tratamiento y <1 a tiempos prolongados. Por otro lado, la lipofección del hIFN $\beta$  aumentó la actividad inhibitoria de peroxidasas (40%,  $p < 0.02$ ), y, en consecuencia los niveles de hidropéroxidos (2,3 veces;  $p < 0.02$ ) y otras especies oxidantes (2,5 veces;  $p < 0.05$ ). El agregado exógeno de IPG al control mimetizo estos efectos. La proteína oncosupresora p53 aumentó tanto en citoplasma como en núcleo. Los resultados muestran que el tratamiento con el gen hIFN $\beta$  promueve un aumento de especies oxidantes y del p53. Esto lleva a alteraciones nucleares que afectan la división celular conduciendo a la muerte por apoptosis y/o necrosis y una senescencia precoz asociada al daño oxidativo.

**0535. (0216) ANÁLISIS DE GENES METABOLIZANTES XENOBIÓTICOS EN PACIENTES CON CÁNCER TESTICULAR. N Cambados, A Orłowski, SM Richard**

*Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC-CONICET, La Plata.*

Los genes del citocromo P450A2 (CYP1A2) y N-acetiltransferasa 2 (NAT2) codifican enzimas específicas involucradas en el metabolismo de muchos compuestos carcinogénicos y procarcinogénicos. Estos dos genes muestran diferentes alelos que dan origen a genotipos de metabolismo rápido, intermedio y lento. Los genotipos acetiladores lentos NAT2 tienen una menor incidencia en los cánceres colorrectales, alta incidencia en el cáncer de vejiga y una predisposición media a desarrollar cáncer testicular. En este trabajo se estudió la constitución del genotipo de NAT2 y una variante alélica del CYP1A2 (3860G>A), en una serie de 52 cán-

ceres testiculares con deleciones y sin deleciones de AZF (Azoospermic factor) analizados en trabajos anteriores por nuestro grupo. El análisis de las variantes alélicas se realizó mediante PCR y digestión enzimática con distintas enzimas de restricción par ambos genes. El 95% de los pacientes con deleciones de AZF y el 83% de los pacientes no deleccionados, presentaron el genotipo de acetilación lenta para NAT2. Un 5% de los casos presentaron el genotipo mutante para el alelo C del gen CYP1A2 analizado. No encontramos diferencias significativas entre los pacientes deleccionados o no deleccionados en AZF para ambos marcadores. Sin embargo pudimos corroborar la existencia mayoritaria del fenotipo de acetilación lenta para NAT2 en pacientes con cáncer testicular. Para el caso de CYP1A2 se sabe que la mutación del alelo C, genera un genotipo de metabolización más lenta. El 95% de los casos de tumores testiculares presentaron el genotipo wild type, lo cual indicaría que probablemente la metabolización de compuestos, como la de procarcinógenos es más rápida que la observada en una población sana.

#### SISTEMA CARDIOVASCULAR IV

**0536. (0097) PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA RESPUESTA CARDIOVASCULAR AL PÉPTIDO NATRIURÉTICO ATRIAL EN RATAS SHR.** M Mac Laughlin<sup>2</sup>, D Rodríguez Ierace<sup>1</sup>, R Elesgaray<sup>1</sup>, P Arza<sup>1</sup>, AM Balaszczuk<sup>1</sup>, MA Costa<sup>1</sup>, C Arranz<sup>1</sup>

1 Fac. de Farmacia y Bioquímica. UBA. IQUIMEFA-CONICET, 2 Fac. de Medicina

Hemos demostrado que el sistema del óxido nítrico (NO) es estimulado por la infusión aguda del péptido natriurético atrial (ANP) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). **Objetivo:** Investigar el efecto de la infusión crónica (7 días) con ANP sobre la presión arterial sistólica (PAS) y el sistema del NO en SHR. **Métodos:** Ratas SHR y controles normotensos Wistar-Kyoto (WKY), de 16 semanas, recibieron infusión (bombas osmóticas subcutáneas) de: solución fisiológica (SF) o ANP (100 ng/hora/rata). Se determinaron PAS (mmHg) y excreción de nitritos y nitratos (NOx). Al finalizar el período experimental los animales fueron sacrificados y se determinó la actividad de NOS, utilizando [<sup>14</sup>C] L-arginina, en arteria aorta (A), aurícula derecha (AD) y ventrículo izquierdo (VI). **Resultados:** El ANP administrado crónicamente en ambos grupos: disminuyó la PAS (WKY=-13±3 vs SHR=-25±10, ns) y aumentó la NOx (WKY=41±10% vs SHR=23±4%, p<0.01). El péptido incrementó la actividad NOS en todos los tejidos estudiados, en ambos grupos. Este aumento fue menor en las SHR (A: WKY= 51±4% vs SHR= 40±3%\*; AD: WKY=46±4% SHR 38±3%\*; VI: WKY=41±3% vs SHR=30±4%\*; \*p<0.01) Tabla: \*p<0.01 vs infusión SF igual grupo, #p<0.01 vs WKY+SF. **Conclusiones:** Las ratas SHR presentaron una mayor actividad basal del sistema del NO. El tratamiento crónico con ANP indujo un aumento de la actividad de este sistema asociado a la caída de la presión arterial. Sin embargo en las SHR el efecto del péptido sobre el sistema del NO fue menor. Estas alteraciones podrían estar asociadas a modificaciones en las vías de señalización que vinculan ambos sistemas en este modelo de hipertensión espontánea.

Actividad NOS (pmol/g.tej.min.)	WKY+SF	WKY+ANP	SHR+SF	SHR+ANP
Arteria aorta	205 ± 12	313 ± 15 *	339 ± 16 #	474 ± 18 *
Aurícula derecha	198 ± 11	289 ± 10 *	321 ± 15 #	444 ± 19 *
Ventrículo izquierdo	212 ± 14	298 ± 12 *	327 ± 16 #	425 ± 20 *

**0537. (0198) SEPSIS EXPERIMENTAL: EFECTO DEL TRATAMIENTO IN VIVO CON ÁCIDO LIPOICO SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.** V Vanasco, MC Cimolai, A Boveris, P Evelson, S Alvarez

Laboratorio de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universi-

dad de Buenos Aires, Junín 956 2° piso, C1113AAD, Buenos Aires, Argentina

Como parte del mecanismo patogénico en la sepsis, se observa una disfunción mitocondrial y un incremento masivo de NO. Estudios previos muestran que el estrés oxidativo está implicado en el daño tisular durante el proceso séptico, y por lo tanto una terapia antioxidante podría ser beneficiosa. Se utilizó en este estudio ácido lipoico (LA) con el objetivo de evaluar dicho antioxidante como terapia alternativa. Ratas hembra Sprague-Dowley, de 180 g, fueron inyectadas i.p. con LPS (lipopolisacárido serotipo 026:B6) en una dosis de 10 mg/kg y los animales se sacrificaron luego de 6 hs del tratamiento. Cuando fue necesario, se inyectó conjuntamente LA (dosis:100 mg/kg) con LPS. El presente estudio se focalizó en órganos musculares, ya que estos son principalmente afectados en procesos sépticos. En animales sépticos, se observó un incremento de 1,5 veces en la quimioluminiscencia (QL) in vivo en músculo esquelético (control: 34±1 cps/cm2; LPS: 50±3 cps/cm2, p<0,01). El consumo de oxígeno en cortes de tejido mostró un incremento del 30-35% en corazón (control: 1073±147 ng-atO/min.g tejido) y diafragma (control: 546±41 ng-atO/min.g tejido) de animales sépticos; en el consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3 se observó una disminución del 40% para los mismos órganos. La producción mitocondrial de NO aumento en un 90% en diafragma y 30% en corazón. En diafragma se observó una disminución de la actividad del complejo mitocondrial I (27%, control: 153±15 nmol/min.mg.prot) y IV (75%, control: 3±1 min-1/min.mg.prot). El tratamiento in vivo con LA en ratas sépticas: a) disminuye la QL en músculo esquelético; b) restituye la producción de NO a valores controles y c) normaliza la función mitocondrial. Los datos presentados sugieren que el estrés oxidativo y el daño en la función mitocondrial constituyen la base de los mecanismos moleculares de la disfunción orgánica en procesos sépticos, y el LA debería ser considerado como una oportunidad terapéutica.

**0538. (0534) LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD OXIDADA Y LIPOPROTEÍNA LIPASA VASCULAR EN UN MODELO NORMOCOLESTEROLÉMICO DE HIPERTENSIÓN.** G Yannarelli<sup>1</sup>, G Giunta<sup>1</sup>, F Brites<sup>2</sup>, N Pacienza<sup>1</sup>, D Santa Cruz<sup>1</sup>, L Masnatta<sup>1</sup>, L Cuniberti<sup>1</sup>

1 Universidad Favaloro, 2 Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA

La hipertensión arterial (HTA) es un reconocido factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis. Sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de este proceso no han sido completamente dilucidados. **Objetivo:** Analizar cambios en los niveles plasmáticos de LDL oxidada (LDLox) y en la expresión de lipoproteína lipasa (LPL) arterial inducidos por HTA experimental. Material y método: diez conejos NZ se instrumentaron según el modelo hipertensivo de Golblatt y 10 conejos con cirugía simulada. Los estudios se realizaron a los 3 meses de seguimiento. La presión arterial (PA) se determinó por método directo. La concentración de LDLox se evaluó por ELISA. Se analizó la LPL aórtica a nivel de ARN mensajero, proteína y localización histológica. Se determinaron las actividades humorales de paraoxonasa (PON) y fosfolipasa A2 (Lp-PLA2). Como marcadores de estrés oxidativo vascular se evaluaron la actividad de SOD, nitratos/nitritos, nitrotirosina y GMPc. Resultado: A los 3 meses el grupo HTA respecto del control presentó aumento de la PA sistólica y diastólica (51% y 50%, p<0,0001), niveles plasmáticos de LDLox (23%, p<0,001) y expresión proteica de LPL arterial (47,2%, p<0,05) asociada a inducción génica (8,7 veces, p<0,01). La inmunolocalización de LPL mostró una fuerte marcación a nivel del endotelio e íntima de aortas hipertensas, mientras que predominó en la túnica media de las arterias controles. La actividad de PON fue mayor en HTA (29%, p<0,01), mientras que la Lp-PLA2 disminuyó (30%, p<0,001). El estrés oxidativo vascular se evidenció por aumentos de la SOD (109%, p<0,05), nitratos/nitritos (142%, p<0,01) y nitrotirosina (40%, p<0,05), sin cambios en los niveles de GMPc respecto del grupo control. **Conclusión:** la HTA indujo una sobreexpresión íntima de LPL que a través de la ge-

neración de modificaciones oxidativas/mitogénicas de las lipoproteínas aterogénicas podría contribuir al aumento plasmático de LDLox y al remodelamiento vascular de origen hipertensivo.

**0539. (0035) CARACTERÍSTICAS DE LA GEOMETRÍA VENTRICULAR IZQUIERDA EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS.** OA Pinilla, VB Carranza, EM Escudero

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares UNLP*

**Introducción:** Si bien se han estudiado diferentes aspectos funcionales y estructurales del ventrículo izquierdo (VI) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), no hemos encontrado un análisis de la geometría ventricular izquierda y su relación con parámetros hemodinámicos como el realizado en humanos. Por lo tanto el presente trabajo fue diseñado para analizar, mediante ecocardiografía, esas variables en 114 ratas macho de 4 meses de edad. **Metodología:** la geometría ventricular normal fue definida en 41 ratas Wistar a partir del valor de la media más 2 desvíos estándar del índice de masa del VI (IMVI) y del espesor parietal relativo (h/r). Con estos puntos de corte se identificaron los siguientes patrones de geometría del VI: remodelado VI concéntrico (RC)  $IMVI < 2.06 \text{ mg/g} - h/r > 0.71$ ; HVI excéntrica (HE):  $IMVI > 2.06 \text{ mg/g} - h/r < 0.71$ ; e HVI concéntrica (HC):  $IMVI > 2.06 \text{ mg/g} - h/r > 0.71$ . Se estimó el volumen minuto midiendo los diámetros del VI y la frecuencia cardíaca; utilizando además la presión arterial para obtener la resistencia periférica. **Resultados:** 9/73 (12%) de las SHR mostraron IMVI y h/r dentro de los parámetros normales; 13/73 (18%) presentaron RC; 24/73 (33%) tenían HC y 27/73 (37%) desarrollaron HE. Las variables hemodinámicas también mostraron diferencias según el tipo de geometría señalado. La resistencia periférica fue mayor en RC ( $6.09 \pm 0.59 \text{ ua} - p < 0.01$ ), con los valores más bajos en la HE ( $2.23 \pm 0.09 \text{ ua}$ ), mientras que el volumen minuto mayor correspondió a la HE ( $86 \pm 3.4 \text{ mm}^3/\text{min} - p < 0.01$ ) y el menor a RC ( $34.75 \pm 3.5 \text{ mm}^3/\text{min}$ ). **Conclusión:** las características de los distintos tipos de geometría ventricular y su relación con los parámetros hemodinámicos encontradas son similares a las descriptas en pacientes hipertensos. Estos resultados refuerzan el valor de este modelo para estudiar diferentes aspectos de la hipertensión arterial, al señalar nuevos elementos de concordancia entre SHR e hipertensión esencial en humanos.

**0540. (0105) ROL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) EN EL DESARROLLO DE LA SEGUNDA FASE DE FUERZA (SFF) POST-ESTIRAMIENTO DEL MIOCARDIO.** RA Dulce, CI Caldiz, CD Garcíarena, LP Novaretto, IL Ennis, HE Cingolani, NG Pérez

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas de La Plata (UNLP)*

El estiramiento miocárdico aumenta la fuerza contráctil en dos fases: una inmediata atribuida al aumento de la respuesta al  $\text{Ca}^{2+}$  de los miofilamentos y una gradual (SFF) debida al aumento del "transient" de  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha propuesto que este aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  es consecuencia del aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$  por activación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) por angiotensin II (AII) y/o endotelina (ET) endógenas. Como ambos péptidos generan ROS, nuestro objetivo fue explorar si estos participan en el desarrollo de la SFF en músculos papilares de gato. Se midió fuerza contráctil,  $[\text{Na}^+]_i$  (fluorescencia de SBFI) y ROS (fluorescencia de H2DCFDF). Luego de 15 minutos de estiramiento la SFF fue  $122 \pm 1\%$  de la fase inicial ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) y fue acompañada por un aumento en la  $[\text{Na}^+]_i$  de  $2.6 \pm 0.4 \text{ mmol/L}$  ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ) sobre el basal. La inhibición del NHE (1  $\mu\text{mol/L}$  HOE642) canceló la SFF ( $100 \pm 1\%$ ,  $n=4$ ) y el aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  ( $-0.1 \pm 0.1 \text{ mmol/L}$ ,  $n=4$ ). El estiramiento aumentó los ROS un  $28 \pm 4\%$  sobre el basal ( $n=5$ ,  $p < 0.05$ ). La prevención del aumento de ROS con MPG (2  $\text{mmol/L}$ ) suprimió el aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  ( $-0.1 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$ ,  $n=5$ ) y la SFF ( $94 \pm 2\%$ ,  $n=5$ ). Se podría pensar que AII/ET estarían activando la NADPH oxidasa, lo que llevaría a un aumento de ROS por los canales de potasio ATP dependientes mitocondriales (mKATP) que activarían al NHE. La inhibición de la NADPH oxidasa (300  $\mu\text{mol/L}$  apocinina) o de los

mKATP (100  $\mu\text{mol/L}$  5HD) eliminó la SFF ( $96 \pm 1$  and  $102 \pm 2\%$  respectivamente,  $n=4$ ) y el aumento de  $[\text{Na}^+]_i$  ( $0.1 \pm 0.1 \text{ mmol/L}$  en ambos,  $n=4$ ). Paralelamente, el estiramiento aumentó la fosforilación de las kinasas ERK1/2 y p90rsk ( $148 \pm 15$  y  $192 \pm 33\%$  del control respectivamente,  $n=7$ ), efectos que se cancelaron por bloqueo de receptores AT1 (1  $\mu\text{mol/L}$  losartan) ( $87 \pm 6$  y  $84 \pm 8\%$  del control respectivamente,  $n=4$ ). En concordancia, la inhibición de la vía de ERK1/2 (50  $\mu\text{mol/L}$  PD98059) eliminó la SFF ( $103 \pm 2\%$ ,  $n=4$ ). En conclusión, nuestros resultados muestran una vinculación directa entre ROS y desarrollo de la SFF.

**0541. (0172) LAS ARRITMIAS LUEGO DE LA ACIDOSIS HIPERCÁPNICA SON DISPARADAS POR POS-DESPOLARIZACIONES TARDÍAS (DADS) Y DEPENDEN DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE  $\text{Ca}^{2+}$  Y CALMODULINA (CAMKII).** MM Said, R Becerra, G Rinaldi, L Vittone, C Mundiña-Weilenmann

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares - Facultad de Ciencias Médicas - UNLP*

Las arritmias cardíacas son una de las causas principales de muerte súbita. El tipo y los mecanismos de estas arritmias no están totalmente dilucidados. El retorno a pH normal luego de un período de acidosis del miocardio produce arritmias, similar a lo que ocurre en la reperfusión luego de la isquemia. En este trabajo se perfundieron corazones de rata, (tipo Langendorff), sometidos a 20 min de acidosis hipercápnica, y luego vueltos a pH normal. Simultáneamente se midió la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (LVDP) y potenciales de acción monofásicos registrados en el epicardio (MAP). Se determinó también la fosforilación de los sitios de fosfolamban (PLN), proteína que regula la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplasmático (RS). Los resultados indican que: 1) Durante la acidosis ocurre una recuperación espontánea de la contractilidad que coincide con un aumento de la fosforilación de Thr17 de PLN, dependiente de CaMKII, en concordancia con experimentos previos, en los que demostramos que esta fosforilación es esencial para el aumento de la contractilidad y de la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS durante la acidosis; 2) La fosforilación de Thr17 de PLN disminuyó en presencia del inhibidor de la CaMKII, KN-93 1  $\mu\text{M}$ ; 3) El retorno a pH normal luego de la acidosis, provocó la aparición de DADS (pos-acidosis  $43 \pm 8$  vs  $8 \pm 2$  basal, ambas en 3 min,  $p < 0,05$ ); 4) Las DADS fueron suprimidas por a) KN-93 (1  $\mu\text{M}$ ), pero no por el análogo inactivo KN-92, b) Dantrolene (45  $\mu\text{M}$ ) y thapsigargin (1  $\mu\text{M}$ ), (inhibidores de la liberación y retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS, respectivamente). Los resultados revelan por primera vez que las arritmias que ocurren luego de la acidosis son disparadas por DADS y dependen de la activación de CaMKII y de la función del RS. Sugerimos que la vuelta a pH normal induciría la liberación espontánea de  $\text{Ca}^{2+}$  por un RS sobrecargado, iniciando las DADS. Las mismas no ocurrirían en acidosis, debido a la inhibición que ejerce el bajo pH sobre la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el RS.

**0542. (0324) LA ANGIOTENSINA II PROMUEVE LA MUERTE CELULAR EN MIOCITOS AISLADOS DE RATA POR UN MECANISMO  $\text{Ca}^{2+}$ -INDEPENDIENTE QUE REQUIERE UN AUMENTO DE RADICALES LIBRES, ACTIVACIÓN DE CAMKII Y P38 MAPK.** L Sapia, C Valverde, M Vila Petroff

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

La muerte celular contribuye a la progresión de la insuficiencia cardíaca (IC). El aumento de la Ang II circulante ha sido propuesto como uno de los principales determinantes de la evolución de la IC en parte debido a que promueve la muerte celular. Aunque un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido sugerido como el principal efector de muerte celular inducida por el péptido, la Ang II activa otros mensajeros alternativos, independientes del  $\text{Ca}^{2+}$  que podrían potencialmente ser inductores de apoptosis/necrosis. Entre ellos, los radicales libres (ROS), la p38 MAPK y la CaMKII han sido identificados como moléculas inductoras de muerte celular. En este estudio, utilizando miocitos de rata cultivados durante 24

hs, evaluamos si la muerte celular inducida por Ang II se asocia con un aumento del  $Ca^{2+}_i$  y/o de radicales libres y si esta depende de la activación de CaMKII y p38 MAPK. La incubación de las células con  $1 \mu M$  de Ang II disminuyó significativamente la viabilidad celular determinada morfométricamente, de  $69,9 \pm 3,2\%$  a  $40,8 \pm 4,3\%$  ( $n=6$ ), a expensas de un aumento de la apoptosis evaluada por la activación de caspasa 3 y tinción TUNEL y necrosis determinada por liberación del LDH. El tratamiento con Ang II no modificó el  $Ca^{2+}_i$  (Indo-1) pero aumentó significativamente la producción de ROS (DFC-DA) y el tratamiento con el secuestrador de ROS, MPG, previno completamente la muerte celular inducida por el péptido. En experimentos paralelos, la muerte celular inducida por Ang II se previno con los inhibidores de la CaMKII, KN-93 ( $71 \pm 4,6\%$ ;  $n=4$ ) y de la p38 MAPK, SB 203580 ( $62,2 \pm 2\%$ ;  $n=6$ ) y la sobreexpresión de la p38 MAPK, mediante transferencia génica adenoviral, exacerbó la muerte celular inducida por el péptido ( $25,6 \pm 0,9\%$ ;  $n=3$ ). Estos resultados sugieren que la muerte celular inducida por la Ang II no es mediada por aumentos del  $Ca^{2+}_i$  y establece a los radicales libres como un mecanismo activador de la CaMKII y de la p38 MAPK y que culmina en la muerte celular.

**0543. (0483) CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL COTRANSPORTADOR  $Na^+/HCO_3^-$  EN MIOCITOS VENTRICULARES DE GATO. PAPEL DE LA ANGIOTENSINA II.** VC De Giusti, EA Aiello

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, La Plata, Argentina.*

El control del pH intracelular (pHi) es esencial para el funcionamiento contráctil y eléctrico del corazón. Son muchas las situaciones que llevan a la acidificación celular y que ponen en marcha mecanismos alcalinizantes para poder contrarrestarla. De éstos, el más conocido es el intercambiador  $Na^+/H^+$  (NHE), aunque en los últimos años se le ha prestado particular atención al cotransporte  $Na^+/HCO_3^-$  (NBC). El objetivo de esta investigación fue dilucidar la contribución del NBC en la recuperación del pHi en miocitos ventriculares de gato en situaciones fisiológicas, como así también establecer el rol de la Angiotensina II (Ang II) en la actividad del cotransporte. La actividad del NBC se estudió mediante epifluorescencia en células ventriculares de gato aisladas, cargadas con el indicador BCECF. Se indujo una carga ácida realizando pulsos de amonio y la recuperación de la acidosis se ajustó a una curva exponencial mediante la cual se determinó la velocidad de recuperación a pH 6.8. La velocidad de recuperación del pHi en un medio con bicarbonato fue de  $0.095 \pm 0.014$  unidades de pH/min (u pH/min;  $n=6$ ). En presencia del inhibidor del NHE, HOE642 ( $10 \mu M$ ), la velocidad de recuperación disminuyó a  $0.027 \pm 0.0038$  u pH/min ( $n=10$ ;  $p<0.05$ ). Esta recuperación quedó abolida tanto en presencia de  $0.1$  mM de SITS (inhibidor de transportadores aniónicos) como de  $10 \mu M$  de S0859 (inhibidor específico del NBC). En bicarbonato y con HOE642, el agregado de  $100$  nM de Ang II al medio extracelular aumentó la velocidad de recuperación a  $0.045 \pm 0.0052$  u pH/min ( $n=6$ ;  $p<0.05$ ). Los resultados nos permiten concluir que el NBC contribuye a la recuperación del pHi en miocitos aislados de gato, siendo el único mecanismo activo en un medio con bicarbonato cuando el NHE se encuentra bloqueado. También demostramos que la actividad del NBC se ve aumentada en presencia de Ang II, pudiendo representar un mecanismo de relevancia fisiopatológica ante niveles plasmáticos aumentados de esta hormona.

**0544. (0637) EFECTO HIPERTRÓFICO DE ENDOTELINA-1 EN MIOCITOS CARDÍACOS DE GATO ADULTO: PAPEL DEL INTERCAMBIADOR  $Na^+/H^+$  Y DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.** MV Correa, CI Caldiz, MB Nolly, CD Garcarena, G Chiappe de Cingolani, HE Cingolani, IL Ennis

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP.*

La endotelina 1 (ET-1), además de ser un eficaz agente vasoconstrictor es un potente inductor del crecimiento celular y

de la actividad del intercambiador  $Na^+/H^+$  isoforma 1 (NHE1). Trabajos recientes sugieren que las especies reactivas del oxígeno (ROS) participarían en las vías de señalización intracelular disparadas por agonistas de receptores acoplados a proteína G, como la ET-1, y estos ROS al activar kinasas que fosforilan al NHE-1 podrían ser los responsables del aumento de su actividad. Por otro lado en los últimos años se ha hecho evidente el efecto antihipertrófico de los inhibidores del NHE1. El objetivo de este estudio fue explorar el en miocardio de gato adulto el efecto de la ET-1 sobre el tamaño celular y la producción de ROS, así como la posible participación del NHE-1. Miocitos cardíacos aislados de gato fueron cultivados durante 18hs con estimulación eléctrica en presencia y ausencia de ET-1 ( $5nM$ ) con y sin el inhibidor específico del NHE-1 cariporide ( $1 \mu M$ ). La ET-1 indujo un aumento del tamaño celular del  $20 \pm 0.9\%$  ( $p<0.05$ ) y de la síntesis proteica evidenciado por la mayor incorporación de  $[3H]$ -fenilalanina (aumento del  $46 \pm 21\%$ ,  $p<0.05$ ) que no ocurrieron en presencia de ET-1+cariporide (tamaño celular  $104 \pm 2$ , incorporación de  $[3H]$ -fenilalanina  $102 \pm 17\%$  vs. control). Así mismo la ET-1 estimuló la producción de ROS evidenciada por un aumento de la señal quimioluminiscente de lucigenina en experimentos realizados en pequeños fragmentos de miocardio ventricular ( $100 \pm 6.4$  vs.  $191 \pm 17$ , control y ET-1 respectivamente,  $p<0.05$ ). Este efecto se canceló en presencia del bloqueante de los receptores ETA BQ123 ( $5 \mu M$ ,  $104 \pm 9$ ). Estos resultados evidencian el efecto prohipertrofiante y dependiente de la activación del NHE1 de la ET-1 en el miocardio adulto de gato; y permiten especular que la activación del intercambiador sea debida a una mayor producción de ROS estimulada por la ET-1.

**0545. (0711) CARACTERÍSTICAS DE LA ADAPTACION DEL VENTRÍCULO IZQUIERDO AL EJERCICIO EN RATAS NORMOTENSAS SEGÚN EL GÉNERO.** OA Pinilla, VB Carranza, EM Escudero

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares*

**Introducción:** La significación de la diferencia de sexo en la respuesta del ventrículo izquierdo (VI) al ejercicio, presenta todavía algunas controversias. **Objetivo:** el propósito del presente trabajo fue evaluar ecocardiográficamente las características de la adaptación del VI al ejercicio en ratas normotensas machos (M) y hembras (H). **Material y métodos:** 19 ratas Wistar de 4 meses de edad, fueron asignadas a los siguientes grupos: M controles (MC):5; M ejercicio (ME):7; H controles (HC):3, y H ejercicio (HE):4. El ejercicio consistió en nadar 90 minutos diarios, 5 veces por semana durante 8 semanas. Las ratas fueron estudiadas con ecocardiograma y registro indirecto de presión arterial, siendo sacrificadas al final del protocolo para obtener el peso del ventrículo izquierdo (MVI) y la longitud de la tibia (LT). Con esos datos se calculó el índice de masa ventricular izquierda (IMVI) y la relación espesor parietal/radio del VI (h/r). **Resultados:** el IMVI fue mayor en ambos grupos entrenados (MC:  $193.2 \pm 4.99$  mg/cm; ME:  $231.6 \pm 13$  mg/cm  $p<0.04$  – HC:  $110.76 \pm 1.34$  mg/cm; HE:  $120.92 \pm 1.93$  mg/cm  $p<0.01$ ). Los ME presentaron proporcionalmente mayor desarrollo de hipertrofia, respecto a las HE (ME:  $53.16 \pm 8.85\% \Delta MVI/LT$ ; HE:  $16.17 \pm 2.87\% \Delta MVI/LT$ ); mostrando además una patente de hipertrofia concéntrica (h/r MC:  $0.44 \pm 0.02$ ; ME:  $0.52 \pm 0.02$   $p<0.03$ ), no evidenciada en las hembras que mantuvieron la misma relación h/r ( HC  $0.44 \pm 0.01$ ; HE:  $0.45 \pm 0.02$ -ns). La función del VI evaluada por: % de acortamiento endocárdico, % de acortamiento medioventricular, e índice de performance miocárdica no mostró cambios en ninguno de los grupos. **Conclusiones:** la natación determinó una respuesta adaptativa del VI en M y H evidenciada por la hipertrofia VI sin modificaciones de la función ventricular. El desarrollo de hipertrofia fue mayor y de tipo concéntrica en los M, sugiriendo la influencia del género en los mecanismos de adaptación desencadenados por el ejercicio.

**0546. (0651) IMPACTO DEL DESARROLLO DE HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA EN UN MODELO DE HIPERTROFIA PATOLÓGICA.** MB Nolly, OA Pinilla, CD Garcarena,

VB Carranza, MR Piaggio, EM Escudero, HE Cingolani, IL Ennis

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP.

El objetivo del presente trabajo fue analizar en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) el efecto del entrenamiento físico programado (natación durante 90 minutos diarios, 5 veces por semana, 60 días) sobre la hipertrofia cardíaca y la función ventricular izquierda. Se utilizaron 19 animales, 10 controles (C) y 9 con ejercicio (E) efectuándose un estudio ecocardiográfico al comienzo y otro a los 60 días de entrenamiento. El índice de masa ventricular izquierda aumentó en E respecto a C (C:  $2.76 \pm 0.07$  mg/g; E:  $3.02 \pm 0.07$ ;  $p < 0.02$ ) señalando el desarrollo de hipertrofia secundaria al ejercicio. Ese aumento en la masa ventricular de aproximadamente 25%, se acompañó sin embargo de una disminución significativa de la expresión de genes marcadores de hipertrofia patológica como el del péptido natriurético auricular (ANP, C:  $100 \pm 19$ ; E:  $41 \pm 10\%$ ,  $p < 0.05$ ) y el de la isoforma 2 de la cadena liviana de miosina (MLC-2, C:  $100 \pm 8$ ; E:  $61 \pm 9\%$ ;  $p < 0.05$ ) evaluados por RT-PCR en tiempo real. Además el entrenamiento físico produjo un incremento del porcentaje de acortamiento medio ventricular (C:  $32.12 \pm 1.01$ ; E:  $36.03 \pm 1.34$ ;  $p < 0.05$ ), evidenciando una mejoría de la función ventricular en los animales hipertensos que fueron sometidos a entrenamiento por natación. Estos resultados sugieren que aún en animales con hipertrofia patológica determinada por la hipertensión arterial, el desarrollo de hipertrofia fisiológica inducida por el entrenamiento físico resultaría beneficioso tanto a nivel molecular como funcional. Estos hallazgos pueden tener relevancia clínica en la prevención del desarrollo de insuficiencia cardíaca secundaria a la hipertrofia patológica a través del ejercicio físico.

**0547. (0303) VALORACIÓN DE LA RESPUESTA FARMACOLÓGICA DE DICLOFENAC Y GEMFIBROZIL EN UN MODELO EXPERIMENTAL ATEROGÉNICO POR HIPERFIBRINOGENEMIA INDUCIDA EN RATAS.** M Tarán<sup>3</sup>, MC Baez<sup>1</sup>, V Campana<sup>1,3</sup>, J Simes<sup>3</sup>, P Pons<sup>2</sup>, JA Palma<sup>3</sup>, M Moya<sup>1,3</sup>

1 UNLAR, 2 Centro de Microscopía Electrónica-Fac. Cs Médicas-UNC, 3 Cat. Física Biomédica-Fac. Cs Médicas-UNC

Se valoró la respuesta farmacológica de diclofenac y gemfibrozil sobre la hiperfibrinogenemia (FP), óxido nítrico (NO) y superóxido y su efecto sobre las lesiones mitocondriales de músculo liso de aorta torácica con lesiones compatibles con aterogénesis. Se utilizaron 40 machos Wistar: control (I), injuria múltiple (IM)x60ds (II), IMx60 ds+diclofenac (III) e IMx60días+gemfibrozil (IV). Inducción proinflamatoria por inyección adrenalina (0,1 mg/oral/rata/día) en (II), (III) y (IV). Se administró: diclofenac (0,2 mg/día/rata) y gemfibrozil (3mg/día/rata) durante 45 ds. Se determinó en plasma FP (mg/dL), ON (uM) y en lisado de glóbulos rojos actividad SOD(U/ml) por espectrofotometría. Se estudió por Microscopía electrónica (ME) cortes de aorta en todos los lotes. **Resultados:** por ANOVA y ME por Chi Cuadrado, se estableció un nivel de significación de  $p < 0.05$ . FP y actividad SOD aumentó significativamente en (II) ( $400 \pm 17$ ) y ( $217 \pm 14$ ) respectivamente comparado con (I) ( $209 \pm 4$ ) y ( $141 \pm 4$ ) ( $p < 0.0001$ ). ON disminuyó significativamente en (II) ( $16.73 \pm 2.55$ ) respecto a (I) ( $24.05 \pm 2.42$ ) ( $p < 0.0001$ ). Se observó que tanto FP en (III) ( $253 \pm 13$ ) y (IV) ( $251 \pm 21$ ), como ON en (III) ( $19.11 \pm 1.17$ ) y (IV) ( $22.53 \pm 0.7$ ) y SOD en (III) ( $227 \pm 22$ ) y (IV) ( $218 \pm 24$ ) presentaron valores similares al control luego de la administración de diclofenac y gemfibrozil respectivamente. ME muestra mitocondrias en (III) y (IV): involución de lesiones respecto a (II). FP desencadenaría alteración del estrés oxidativo, con baja disponibilidad de ON e incremento de SOD, la administración tanto de diclofenac (por inhibición de ciclooxigenasa) como de gemfibrozil (reducción de expresión de citoquinas proinflamatorias y fibrinógeno en células vasculares) modificarían el componente inflamatorio presente en aterogénesis.

**0548. (0365) INJURIA POR REPERFUSIÓN: PAPEL DE LA INHIBICIÓN DEL NHE-1 SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ROS.**

Mosca, JC Fantinelli, C Caldiz, C Garciarena, I Ennis, G Chiappe de Cingolani, HE Cingolani

Centro de Investigaciones Cardiovasculares

La reactivación del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , isoforma 1 (NHE-1) llevando a un aumento del sodio y de calcio intracelular y la producción exagerada de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) son las dos hipótesis más aceptadas para explicar la injuria por reperfusión. Aunque la sobrecarga de calcio parece ser el factor en común entre ambas teorías, la relación entre ellas no está clara. En corazones aislados de rata la arteria coronaria izquierda fue ligada por 40 min y una vez liberada la ligadura, el corazón fue reperfundido durante 2 horas. Otros corazones fueron tratados durante los primeros 20 minutos de la reperfusión con un bloqueante específico del NHE-1, cariporide ( $10 \mu\text{M}$ ), un atrapante de ROS, mercaptopropionilglicina (MPG,  $2 \text{ mM}$ ) ó la combinación de ambos. El tamaño del infarto fue evaluado mediante la tinción con azul de Evans y sales de tetrazolio (TTC). Las dos intervenciones disminuyeron significativamente el tamaño del infarto ( $15.1 \pm 2.4\%$  y  $18 \pm 3\%$ , respectivamente vs  $31 \pm 2\%$  en corazones controles). La administración combinada no resultó en una mayor protección ( $17 \pm 1.7\%$ ). La peroxidación lipídica evaluada por las TBARS disminuyó significativamente y a valores similares con los tres tratamientos. La producción de superóxido medida en cortes de ventrículo izquierdo por quimioluminiscencia, inducida por un agonista como la angiotensina II (A II,  $1 \text{ nM}$ ) fue abolida en presencia de cariporide ( $-7 \pm 9\%$  vs  $37 \pm 10\%$ ). También el aumento de actividad de la quinasa ERK1/2 por A II fue anulado por el cariporide. Estos datos nos permiten sugerir que entre ROS y NHE-1 existe una relación más directa y recíproca, lo que indicaría que ambas intervenciones (bloqueo del NHE-1 o tratamiento con un antioxidante) serían estrategias alternativas para disminuir la injuria por reperfusión.

**0549. (0793) EFECTOS DEL LUMIRACOXIB EN LA EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR ASOCIADAS AL REMODELADO CARDÍACO UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO.** NF Renná<sup>1,2</sup>, M Vázquez<sup>1</sup>, C Lama<sup>1</sup>, S González<sup>1,2</sup>, RM Miatello<sup>1,2</sup>

1 IMBECU-CONICET, 2 Departamento de Patología. FCM-UNCuyo

El objetivo es demostrar el efecto sobre la inhibición de la enzima COX-2 y su relación con el remodelado vascular, a partir de la evaluación de las metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) mediante la administración de lumiracoxib (L) en un modelo de síndrome metabólico (SM). Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) se distribuyeron en 4 grupos (8 c/u): 1. WKY; 2. FFHR: SHR+fructosa 10%v/v durante 12 sem; 3. W+L: 10 mg/kg vía oral últimas 4 sem; IV. FFHR+L: ídem 2+3. Los datos (media±sem) se procesaron por ANOVA y post-test de Bonferroni. (\*) indica  $p < 0.001$ . En comparación con sus controles, los animales FFHR desarrollaron SM: presión sistólica (PAS-mmHg):  $118 \pm 0,05$  v  $182 \pm 1^*$ ; Glucemia (GB-mg/dL)  $86 \pm 5$  v  $140 \pm 5^*$ ; Triglicéridos (TG-mg/dL)  $90 \pm 2$  v  $270 \pm 30^*$ ; HDL-colesterol (HL-mg/dL)  $18 \pm 2$  v  $10 \pm 3^*$ . Estos cambios revirtieron por la administración de L (PAS  $165 \pm 0,9^*$ ; Glu  $90 \pm 5^*$ ; TG  $88 \pm 3^*$ ; HL  $17 \pm 2^*$ ). Se evaluó el remodelado cardíaco por peso relativo (RHW-g/100 g)  $2,5 \pm 0,01$  v  $4,1 \pm 0,02^*$ . El grupo FFHR+L disminuyó su RHW a  $3 \pm 0,01^*$ . La expresión de MMP-2 y MMP-9, determinada por Western blot, se incrementó en tejido cardíaco, y este efecto se revirtió por la administración de L. **Conclusión:** Los datos confirman el desarrollo del modelo experimental y sugieren la participación de la enzima COX-2 en la génesis del remodelado cardíaco asociado al síndrome metabólico.

**0550. (0409) EXPOSICIÓN AGUDA A CONTAMINANTES AMBIENTALES PARTICULADOS: METABOLISMO OXIDATIVO EN PULMÓN Y CORAZÓN.** N Magnani<sup>1</sup>, T Marchini<sup>1</sup>, D Tasat<sup>2</sup>, S Alvarez<sup>1</sup>, P Evelson<sup>1</sup>

1 *Laboratorio de radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junin 956 2° piso, C1113AAD, Ciudad de Buenos Aires, 2 Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín, Buenos Aires*

Las especies activas del oxígeno y el nitrógeno estarían involucradas en la iniciación y la progresión de los efectos patológicos producidos por exposición a partículas ambientales. El objetivo de este trabajo fue analizar el metabolismo oxidativo en pulmón y corazón de ratones expuestos a material particulado. Se utilizó un modelo de exposición aguda mediante instilación nasal a contaminantes particulados aéreos provenientes de la combustión del petróleo (ROFA) (0,20 mg/kg peso). Las medidas se realizaron 3 horas luego de la instilación. El metabolismo oxidativo se evaluó mediante el consumo de oxígeno en cortes de tejido, y la capacidad antioxidante total (TRAP), la actividad de catalasa y la producción de NO en homogeneizados de tejido. La exposición a las partículas produjo un aumento del 25% en el consumo de oxígeno de cortes (1 mm<sup>3</sup>) de pulmón (control: 111 ± 5 ng-atO/min. g tejido, p < 0,01) y una disminución del 35% en cortes de corazón (control: 613 ± 35 ng-atO/min. g de tejido, p < 0,01). La actividad de catalasa se halla disminuida en ambos tejidos (pulmón: control: 0,93 ± 0,08 pmoles/mg prot, tratado: 0,72 ± 0,08 pmoles/mg prot; corazón: control 2,0 ± 0,4 pmoles/mg prot, tratados 1,3 ± 0,3 pmoles/mg prot). Los valores de TRAP de pulmón muestran una disminución del 60% (control: 16 ± 1 µM Trolox/mg prot, p < 0,01) y no se observan diferencias en corazón (control: 3,9 ± 0,4 µM Trolox/mg prot. La producción de NO aumentó un 30% en homogeneizados de pulmón (control: 0,83 ± 0,08 nmol NO/min mg prot, p < 0,01), y una disminución del 57% para corazón (control: 1,25 ± 0,08 nmol NO/min mg prot, p < 0,01). Los resultados presentados muestran: (a) al pulmón como blanco principal de los efectos oxidativos en este modelo; (b) que el aumento en la producción de NO y consumo de oxígeno en pulmón está de acuerdo con la presencia de un proceso inflamatorio; (c) el corazón desarrolla una respuesta adaptativa en este modelo, a través de la disminución de la producción de NO.

**0551. (0794) REDUCCIÓN DE LAS ARRITMIAS DE REPERFUSIÓN CON 17β ESTRADIOL Y TAMOXIFENO. VARIABLES ELECTROFISIOLÓGICAS Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.** ER Diez, AZ Ponce Zumino, A Carrión, RM Miatello

*Fac. Cs. Médicas – U.N.Cuyo – IMBECU - CONICET*

Se han demostrado propiedades cardioprotectoras de los estrógenos y más recientemente, también del tamoxifeno. Si bien ejercen efectos opuestos sobre los receptores estrogénicos, ambos poseen capacidad antioxidante (CA). También se les atribuyen efectos sobre las corrientes iónicas. Por otra parte, el estrés oxidativo y los trastornos electrofisiológicos se asocian con el desencadenamiento de graves arritmias al momento de la reperfusión (AR). El objetivo fue evaluar si estas drogas disminuyen las AR y si esto se asocia a cambios en los potenciales transmembrana y/o a la CA. Se trabajó con corazones aislados y perfundidos de rata, sometidos a 10 min de isquemia, por ligadura de la arteria coronaria y 20 min de reperfusión por desoclusión de la misma. Se realizaron 7 series de experimentos: control, n=12(C); 17βestradiol 1 µM, n=10 (E1); 5 µM, n=10 (E5); 10 µM, n=11 (E10); y tamoxifeno 1 µM, n=10 (TX1); 2 µM, n=13 (TX2); y 5 µM, n= 10 (TX5). Se determinó la incidencia de las AR, el caudal coronario (CC) y el valor del poder antioxidante total (PAT). Se midieron variables electrofisiológicas (VEF): amplitud (APA) y duración (DPA) de los potenciales ventriculares, magnitud del potencial de reposo (PR) y frecuencia cardíaca. Las variables cuantitativas fueron analizadas por ANOVA2 y la incidencia de las AR mediante el test de  $\chi^2$ . La incidencia de arritmias, respecto del 75% de C, presentó una reducción en todos los casos, siendo los valores: E1 30%, E5 30%, E10 9.09% y para TX1 30%, TX2 30.7%, TX5 10%. E10 prolongó la DPA y aumentó APA y PR en todo el período de isquemia. TX5 aumentó APA y PR sólo en la última etapa de isquemia. Para todas las concentraciones se obtuvo un aumento en el PAT. El CC y las demás VEF no presen-

taron cambios. Ambos compuestos demostraron cardioprotección sobre la incidencia de AR, asociada a su aumento del PAT. La protección aumentó con las dosis mayores y se observaron modificaciones de las VEF con similar aumento del PAT.

## ENDOCRINOLOGÍA V

**0552. (0410) LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS ESTÁ MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE PKC EPSILON Y ERK 1/2.** JP Petiti, AL De Paul, S Gutierrez, CM Palmeri, LV Sosa, G Alvin, AI Torres

*Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Cs Médicas, UNC, Córdoba, Argentina.*

En investigaciones previas demostramos que las diferentes isoformas de proteína quinasa C (PKC) modulan el crecimiento hipofisario participando en la proliferación y muerte celular. Nuestro objetivo fue estudiar la activación, translocación subcelular y regulación transcripcional de la PKC epsilon y la implicancia de la vía ERK1/2 en la proliferación de células lactotropas estimuladas con ester de forbol (PMA). Cultivos adenohipofisarios de rata hembra se incubaron con PMA (400 nM, 15 min y 3 h) sólo o con los siguientes inhibidores: BIM (PKC convencionales y noveles, 4 µM; 30min), eV1-2 (PKC epsilon 50 y 100 µM; 30 min) y PD98059 (ERK 1/2; 50 y 100 µM; 30min). Se cuantificó la proliferación de lactotropas por inmunomarcación para BrdU/PRL. La activación de PKC epsilon por PMA se determinó en fracción de membrana y citosólica por western blot y su localización subcelular mediante inmunocitoquímica ultraestructural. Los niveles de ARNm de PKC epsilon se evaluaron por PCR. Análisis estadístico: ANOVA-Fisher. La proliferación de lactotropas aumentó un 60% luego del tratamiento con PMA por 15min, mientras que la exposición por 3 h la disminuyó significativamente (p < 0.001). La PKC epsilon alcanzó su mayor activación (78%) a los 15 min de estimulación con PMA y sólo un 40% a las 3 h (p < 0.05). Tanto el inhibidor específico de PKC epsilon, como el de las ERK1/2 bloquearon la proliferación inducida por PMA (p < 0.001). El tratamiento con PMA up-reguló los niveles de ARNm de PKC epsilon, efecto revertido por el inhibidor BIM (p < 0.05), sugiriendo una autorregulación transcripcional de esta isoforma. La estimulación con PMA por 15 min indujo una significativa translocación de PKC epsilon al núcleo y complejo de Golgi de lactotropas en comparación a lo observado en células controles. Estos resultados demuestran que la activación de la PKC epsilon y su translocación subcelular inducida por PMA regula la proliferación de células lactotropas a través de la vía MAP quinasa ERK1/2.

**0553. (0215) ALTERACIONES EN EL EJE GONADAL DE RATAS PERIPÚBERES NACIDAS DE PROGENITORES EXPUESTOS AL DISRUPTOR ENDOCRINO DEHP(DI-2-ETILHEXILFALATO).** S Carbone<sup>1</sup>, B Szwarcfarb<sup>1</sup>, R Reynolds<sup>2</sup>, O Ponzio<sup>2</sup>, N Cardoso<sup>2</sup>, J Moguilevsky<sup>3</sup>, P Scacchi<sup>1,2</sup>

*1 Laboratorio Endocrinología, Facultad de Medicina, CONICET, 2 Laboratorio Endocrinología, Facultad de Medicina, UBA, 3 Universidad Favaloro, Posgrado*

DEHP produce efectos tóxicos en el eje reproductor, actuando como agonista alfa-estrogénico y antagonista androgénico. Previamente informamos modificaciones en el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal de ratas inmaduras expuestas al disruptor endocrino desde la concepción. En este trabajo se midió la secreción de gonadotropinas y el contenido hipotalámico de aspartato (ASP) y GABA (métodos RIA y HPLC) en ratas hembra peripúberes (30 días) sin exposición al DEHP, provenientes de progenitores macho (M) y hembra (H) expuestos al tóxico (325 u/l agua bebida) desde su gestación hasta el apareo. Los grupos de apareo fueron: H-DEHP+M-DEHP; H-CONTROL+M-DEHP; H-DEHP+M-CONTROL; H-CONTROL+M-CONTROL (n=10 por grupo). FSH (ng/ml) disminuyó en ratas nacidas de apareos con machos previamente expuestos al tóxico (H-DEHP+M-DEHP vs H-CONTROL+ M- CONTROL: 43.33±6.6 vs 230.6±38.5, p < 0.001; H-

CONTROL+M-DEHP vs H-CONTROL+M-CONTROL:  $153.3 \pm 20.2$  vs  $230.6 \pm 38.5$ ,  $p < 0.01$ ); sin detectarse cambios en el contenido hipotalámico de ASP y GABA (pmol/mg tejido) en estos grupos. FSH no se modificó en hembras nacidas del apareo con machos no expuestos: H-DEHP+M-CONTROL vs H-CONTROL+M-CONTROL:  $210 \pm 20.1$  vs  $228.5 \pm 17.3$ . No hubo variación de LH (ng/ml) en ninguno de los grupos: H-DEHP+M-DEHP:  $10.6 \pm 1.5$ ; H-CONTROL+M-DEHP:  $8.2 \pm 2.4$ ; H-DEHP+M-CONTROL:  $11.2 \pm 1.4$ ; H-CONTROL+M-CONTROL:  $12.1 \pm 1.5$ . Por otra parte, se detectó disminución de FSH ( $p < 0.001$ ) en los progenitores machos expuestos desde su gestación al DEHP vs. CONTROL ( $270.3 \pm 33.7$  vs  $458.5 \pm 47.7$ ). Se concluye que el DEHP podría alterar el eje gonadal de ratas hembras peripúberes nacidas de machos expuestos al DEHP, aún sin haber tenido exposición directa al mismo durante la gestación y lactancia.

**0554. (0126) PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS DE MEMBRANA EN LOS EFECTOS ANTIMITOGÉNICOS DEL ESTRADIOL SOBRE LAS CÉLULAS LACTOTROPAS.** S Gutiérrez<sup>1</sup>, AL De Paul<sup>1</sup>, JP Pettiti<sup>1</sup>, LV Sosa<sup>1</sup>, CM Palmeri<sup>1</sup>, M Soaje<sup>2</sup>, EM Orgero<sup>1</sup>, AI Torres<sup>1</sup>

*1 Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. UNC. Córdoba, Argentina., 2 Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza, Argentina.*

En trabajos previos hemos demostrado efectos antagónicos del estradiol (E2) en interacción con factores de crecimiento sobre la proliferación de células lactotropas, desconociéndose la participación de los receptores estrogénicos (RE) de membrana en estas acciones. Nuestro objetivo fue investigar los efectos de la interacción E2/Insulina (Ins), evaluar la participación de RE de membrana y de PKC $\epsilon$ , ERK1/2, y Pit-1 en estas acciones e identificar RE en la membrana plasmática de lactotropas. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra fueron tratados con E2 o E2-BSA (forma impermeable a la membrana) (1 nM) solos o co-incubados con Ins, (100 ng/ml) por 15, 30, 60 min y 24 h. Previo a los tratamientos, se agregó un inhibidor de PKC (BIM 1  $\mu$ M). La proliferación de lactotropas se cuantificó por detección inmunocitoquímica de BrdU/PRL y la secreción de PRL por RIA. La expresión de PKC $\epsilon$ , ERK 1/2 fosforilada y total, Pit-1 y  $\beta$  actina fue determinada por Western Blot. Análisis estadístico ANOVA-Tukey. Los RE de membrana se identificaron por inmunocitoquímica para microscopía electrónica (ICQe). E2-BSA estimuló la secreción de PRL, mostrando un efecto diferencial en relación al E2 libre. Ins incrementó significativamente la actividad mitogénica de las lactotropas. El número de lactotropas no presentó cambios con E2 o E2-BSA. El tratamiento combinado de E2 o E2-BSA con Ins inhibió la proliferación inducida por este factor ( $p < 0.001$ ). La expresión de PKC  $\epsilon$ , ERK 1/2 fosforilada y Pit-1 fue incrementada tanto con E2-BSA como con Ins, mientras que la co-incubación E2-BSA/Ins redujo su expresión, en correlación con el efecto antimitogénico observado. Mediante ICQe se observó la isoforma RE  $\alpha$  en la membrana plasmática de las lactotropas. Nuestros resultados evidencian que los RE de membrana, probablemente la isoforma  $\alpha$ , participan en la modulación de la proliferación de las células lactotropas inducida por el E2 en interacción con Ins, a través de la vía PKC $\epsilon$ , ERK 1/2 y Pit-1.

**0555. (0338) EFECTO DEL ANALOGO DE GNRH BUSERELINA SOBRE LA EXPRESION DEL RECEPTOR DE OREXINAS OX1 EN CULTIVOS ADENOHIPOFISARIOS Y OVARIOS.** P Silveyra<sup>1, 2</sup>, L Zubeldía-Brenner<sup>1</sup>, VAR Lux-Lantos<sup>1</sup>, C Libertun<sup>1, 2</sup>

*1 IBYME-CONICET, 2 Universidad de Buenos Aires*

Previamente describimos incrementos en las expresiones de los receptores de orexinas OX1 y OX2 en hipotálamo, adenohipofisis y ovario, selectivamente durante la noche del proestro de la rata. Postulamos que los mismos serían dependientes de GnRH y/o gonadotropinas e independientes de la ingesta y del sueño (Am

J Physiol Endocrinol Metab 2007; 292:E820-8; Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; En prensa). Metodología: Profundizamos el estudio analizando la expresión de OX1 en cultivos primarios de células adenohipofisarias (AH) provenientes de hembras en la mañana del proestro, en condiciones basales o estimuladas 72 h con el análogo sintético de GnRH Buserelina (BUS;  $M 10^{-7}$ ) y/o Cetorelix, antagonista de GnRH (CRX;  $M 10^{-7}$ ). La expresión de OX1 fue cuantificada por Real Time RT-PCR. Se midió en el medio LH y FSH por RIA. Por otro lado, en cultivos primarios de células ováricas de hembras prepúberes superovuladas (SPO), estimuladas *in vitro* durante 48 h con BUS, CRX o hCG ( $M 10^{-9}$ ), se cuantificó la expresión de OX1 por Real Time RT-PCR; en el medio se midió progesterona ( $P_4$ ) por RIA. En otra serie de cultivos SPO ensayamos el efecto de OXA y OXB ( $M 10^{-7}$  a  $10^{-11}$ ) sobre  $P_4$ . **Resultados:** BUS estimuló la expresión del receptor OX1 en células AH [ $\Delta\Delta Ct$  OX1 C:  $1.55 \pm 0.25$  ( $n=9$ ) vs. Bus:  $10.06 \pm 1.48$  ( $n=5$ ),  $p < 0.05$ ] y en células SPO [ $\Delta\Delta Ct$  OX1 C:  $1.04 \pm 0.12$  ( $n=4$ ) vs. Bus:  $4.95 \pm 0.49$  ( $n=4$ ),  $p < 0.05$ ]. CRX abolió todos estos incrementos, tanto en AH como en SPO. La estimulación con hCG no modificó los niveles de OX1 en SPO aunque estimuló  $P_4$ ; esta hormona también fue incrementada por OXA y OXB a concentraciones bajas. **Conclusiones:** En la expresión del receptor OX1 estaría involucrada la activación del receptor de GnRH. OXA y OXB modularían la secreción hormonal de las células luteales. (CONICET-UBA-ANPCYT).

**0556. (0210) LA ADMINISTRACIÓN DE BPA DURANTE LOS PERÍODOS PRE Y POSTNATAL NO AFECTA LOS MECANISMOS NEUROENDOCRINOS DE REGULACIÓN DEL EJE REPRODUCTOR EN RATAS MACHO PREPÚBERES.** N Cardoso<sup>1</sup>, B Szwarcfarb<sup>2</sup>, S Carbone<sup>2</sup>, O Ponzio<sup>1</sup>, M Pandolfi<sup>3</sup>, M Alonso<sup>4</sup>, P Scacchi<sup>5</sup>, J Moguilevsky<sup>6</sup>, R Reynoso<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Endocrinología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA, 2 Laboratorio de Endocrinología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. CONICET, 3 Lab de Embriología Animal DBBE, FCEy N. UBA, 4 Laboratorio Hospital Británico. Bs.As., 5 Laboratorio de Endocrinología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA. CONICET, 6 Fundación Favaloro*

El BPA es un disruptor endocrino ampliamente utilizado en la fabricación de plásticos policarbonatos. El mismo se une débilmente a ambas isoformas del receptor estrogénico y al receptor androgénico, ejerciendo efectos adversos sobre el eje reproductor. Se estudió el efecto de la administración de BPA sobre el eje hipotálamo-hipofiso-testicular de ratas prepúberes (30 días). Este fue administrado en el agua de bebida (25 mg/l) a la rata madre desde el inicio de la preñez y durante la lactancia, administrándose etanol al 0.1% al grupo control, ( $n=10$  por grupo). Se determinó LH, FSH, (RIA, ng/ml), testosterona (EQLIA, nmol/ml), liberación de Gn-RH y amino ácidos neurotransmisores (Aspártico, ASP, Glutámico, GLU) por fragmentos de hipotálamo medio basal, (RIA, pg/HMB, HPLC, nmoles/HMB). Se evaluaron peso corporal (gs.), peso testicular, peso de vesículas seminales, epidídimo, (mg) y se observó la presencia de testículo en el escroto. **Resultados:** Tanto los niveles de LH como los de FSH y testosterona disminuyeron significativamente, (Control:  $12.0 \pm 1.0$  vs BPA:  $7.7 \pm 0.7$ ,  $p < 0.001$ ), (Control:  $583 \pm 34$  vs BPA:  $414 \pm 23$ ,  $p < 0.001$ ), (Control:  $12 \pm 1.6$  vs BPA:  $0.6 \pm 0.09$ ,  $p < 0.001$ ). La liberación de Gn-RH y de ASP y GLU, no sufrieron cambios significativos. No se observaron diferencias significativas en los pesos corporales, gonadas, vesículas seminales y epidídimo, ni en el descenso testicular. **Conclusiones:** El presente trabajo demuestra que la exposición a BPA durante el período pre y postnatal provoca cambios adversos en el eje reproductor, disminuyendo la secreción de ambas gonadotropinas y de testosterona por parte del testículo en el período prepuberal. La falta de efecto sobre los parámetros neuroendocrinos estudiados, sugiere que este disruptor endocrino afectaría el eje reproductor actuando en esta etapa del desarrollo a nivel hipofisario.

**0557. (0416) ESTUDIO DEL 6 PROPIL-2 TIORACILO (PTU) COMO RADIOPROTECTOR EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE TIROIDES.** M Perona<sup>1</sup>, MA Dagrosa<sup>1</sup>, R Pagotto<sup>2</sup>, M Casal<sup>3</sup>, O Pignataro<sup>2</sup>, M Pisarev<sup>1,4</sup>, GJ Juvenal<sup>1</sup>

1 Comisión Nacional de Energía Atómica, 2 IBYME-CONICET, 3 Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", 4 Facultad de Medicina, UBA

**Introducción:** Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición a altas dosis de radiación externa incrementa la frecuencia de neoplasias de tiroides, particularmente cuando la misma ocurre en la niñez o en la adolescencia. El uso de radioprotectores de la tiroides sería de utilidad para evitar efectos tumorigénicos en la glándula cuando la radiación ionizante en la zona del cuello es la única terapia posible. **Objetivos:** Estudiar el posible efecto radioprotector de la droga antitiroidea 6 propil-2 tiouracilo (PTU). Se cultivaron células tiroideas normales (línea FRTL-5 de rata) y patológicas (líneas de cáncer humano tiroideo anaplásico ARO). Las mismas fueron irradiadas con una fuente de <sup>60</sup>Co (1Gy/min) en dosis variables entre 1 y 8 Gy, en presencia y ausencia de PTU (1 mM). A posteriori se evaluó el daño post radiación mediante el ensayo de formación de colonias tomando la fracción de sobrevivida (FS) como indicador del efecto.

**Resultados:** la FS aumentó respecto del Control en ambas líneas celulares para todas las dosis utilizadas. La relación PTU vs Control fue de 2,3 y 2,7 para las células ARO y FRTL-5 respectivamente. El efecto radioprotector del PTU es el mismo si es agregado 24 hs antes o inmediatamente post irradiación. Dado que se ha demostrado que el aumento de la radioresistencia de los tejidos puede inducirse mediante la estimulación de las vías del AMP cíclico (cAMP), se midieron los niveles del segundo mensajero luego de incubar las líneas celulares durante 5, 24, 48 y 72 horas con diferentes concentraciones de PTU (0; 0,1 mM; 1 mM y 2 mM). El PTU aumentó los niveles intra y extracelulares del cAMP en todos los tratamientos. Se observó un pico a las 24 hs en los niveles extracelulares incubados con PTU 1 mM de 36,97 ± 6,37 (fmol/μg de prot) vs Control 16,67 ± 3,92 (fmol/μg de prot). El efecto radioprotector del PTU fue mimetizado por el cAMP. **Conclusión:** El PTU ejerce un efecto radioprotector estimulando la vía del cAMP.

**0558. (0488) INHIBICIÓN DE LA BOCIÓGENESIS POR EL 2- IODOHEXADECANAL.** L Thomasz<sup>1</sup>, R Oglio<sup>1</sup>, MA Dagrosa<sup>1</sup>, R Harach<sup>2</sup>, G Jahn<sup>3</sup>, L Krawiec<sup>1</sup>, O Pignataro<sup>4</sup>, G Sartorio<sup>5</sup>, M Pisarev<sup>1,3</sup>, G Juvenal<sup>1</sup>

1 Comisión Nacional de Energía Atómica, División Bioquímica Nuclear, 2 Hospital Arturo Oñativia, 3 Facultad de Medicina, UBA, 4 IBYME, 5 Laboratorio Sartorio

**Introducción:** La autoregulación tiroidea puede ser definida como la capacidad que tiene el yodo intracelular de modular la función glandular así como la respuesta a otros factores de regulación. El yodo debe ser organificado para ejercer estos efectos. Se ha propuesto que iodolípidos podrían jugar un rol en el mecanismo autoregulatorio. Entre estos la 6-iodo-delta-lactona del ácido araquidónico (IL) y el 2-iodohexadecanal (IHD) inhiben varios parámetros tiroideos. Sin embargo sólo para la IL se ha demostrado un efecto antibociógeno. **Objetivo:** analizar la posible acción antibociógena del IHD. **Metodología y Resultados:** Ratos hembras (100-120g) fueron inyectadas durante diez días con 10 μg/día de IL, IHD, MMI (10 mg/día), MMI+IL o MMI+IHD. La administración de MMI durante 10 días incrementó el peso de la tiroides en un 86%. Este efecto fue inhibido por la inyección simultánea de 10 μg/día de IL (45% inhibición) o de IHD (48%), mientras que el hexadecanal y el yodo no tuvieron efecto. La TSH sérica aumentó como era de esperar en las ratas tratadas con MMI (10,54±1,26 vs 0,69±0,10ng/ml en los controles). El tratamiento con iodolípidos redujo parcialmente los niveles de TSH: (MMI+IHD: 4,23±0,72; MMI+IL: 4,09±0,61). El contenido de cAMP aumentó en las ratas tratadas con MMI comparadas con los controles (18,97±1,6 vs 9,49±0,52pMoles/mg proteína) mientras que la ad-

ministración de iodolípidos redujeron significativamente estos valores (MMI+IHD: 13,73±1,45 MMI+IL: 12,99±1,61). La histología mostró bocio difuso (hiperplasia difusa) en las tiroides de ratas tratadas con MMI y MMI más iodolípidos mientras que las ratas tratadas con iodolípidos únicamente muestran tiroides en el rango histológico de la normalidad. La administración de iodolípidos no produjo cambios en el contenido de T3 y T4 total, colesterol, proteínas totales, urea y acetilcolinesterasa, demostrando que no poseen efectos tóxicos. **Conclusión:** El IHD al igual que la IL posee acción antibociógena.

**0559. (0056) RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA EN RATONES INMUNODEFICIENTES MEDIANTE TERAPIA GÉNICA CON EL GEN DE TIMULINA.** E Martínez<sup>1</sup>, P Reggiani<sup>2</sup>, C Ferese<sup>3</sup>, R Goya<sup>2</sup>, G Cónsole<sup>1,3</sup>

1 Cátedra 'B' de Histología-Embriología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata, 2 INIBIOLP-CONICET, 3 Comisión de Investigaciones Científicas: CICPBA

**Introducción:** La integridad del timo durante la vida perinatal es esencial para una correcta maduración del eje pituitario-gonadal. La timectomía neonatal o la atimia congénita (ratones nude) provocan alteraciones endocrinas, como una reducción de los niveles de gonadotrofinas circulantes y una menor fertilidad. La timulina es un onapéptido inactivo llamado factor tímico sérico (FTS) que acoplado al ion zinc expresa actividad biológica. **Objetivo:** Implementar una terapia génica neonatal mediante un vector adenoviral Rad-metFTS en ratones inmunodeficientes (nude) con el fin de prevenir la reducción de los niveles séricos de las gonadotrofinas y preservar la población gonadotropa pituitaria. **Material y métodos:** Se utilizaron ratones nude hembras homocigotas (nu/nu) y heterocigotas (nu/+). El día 1 postnatal cada ratón recibió una única inyección i.m. de 10 8 unidades formadoras de placa (pfu) de Rad-metFTS o de un vector control (RAD-GFP/TKfus). En el día 51 postnatal fueron sacrificados. Se midieron FSH, LH y timulina. Las pituitarias se inmunomarcaron con un sistema anti-FSH/anti-LH-EnVision. La densidad de volumen (DVx10-2), densidad celular (DCx10-4) y tamaño celular (TCum2) se registraron mediante un analizador de imágenes. **Resultados:** La terapia génica con timulina neonatal previno el descenso de la población gonadotropa y el déficit de gonadotrofinas. Se registró aumento significativo (p<0.01) en la densidad celular (DC) de RAD-FTS vs controles: células LH: 19,2±1,9 vs 6,3±0,7 y células FSH: 18,4±1,8 vs 6,8±0,5. Hubo ascenso significativo (p<0.01) en gonadotrofinas séricas: RAD-FTS vs controles LH: 6,4±0,9 vs 2,1±0,3 ng/ml, FSH: 4,3±1,1 vs 1,6±0,2 ng/ml, timulina 280,1±25 vs 20,9±1,2 fg/ml. **Conclusiones:** La terapia con el gen de timulina previno el descenso de la población gonadotropa pituitaria y el déficit de gonadotrofinas-timulina en el ratón nude adulto.

**0560. (0284) LA ESTRONA INTERFIERE CON LA ACCIÓN ESTIMULATORIA DE ESTRADIOL Y PROGESTERONA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN AORTA DE RATA.** MB Rauschemberger<sup>1,2</sup>, S Benozzi<sup>1</sup>, NN Polini<sup>1</sup>, VL Massheimer<sup>1,2</sup>

1 Cátedra de Análisis Clínicos II, Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, 2 CONICET

La utilidad clínica a nivel cardiovascular de la terapia de sustitución hormonal [estradiol (E2) + progesterona(Pg)] es motivo de debate aún. Dado que, previamente hemos demostrado que en anillos de aorta de ratas hembras (RAS), E2, estrona (E1) o Pg regulan la producción de vasoactivos y que dicho efecto desaparece en ratas ovariectomizadas (OVX), nos propusimos investigar el efecto de tratamientos conjuntos (in vitro o en modelos de suplementación hormonal) sobre la capacidad generadora de óxido nítrico (NO). Empleando <sup>3</sup>H arginina como precursor, se midió la producción de NO en RAS aislados de ratas hembras

fértiles (REN) o ratas OVXip (suplementadas intraperitonealmente con las hormonas). En RAS obtenidos de REN, el tratamiento conjunto (5min) in vitro con E2+Pg potencia significativamente el efecto individual de las hormonas (141; 129 vs 296% s/control E2; Pg, vs E2+Pg  $p < 0.01$ ). En cambio cuando el tratamiento dual incluye a la E1 (E2+E1 o E1+Pg) el efecto conjunto es inferior al individual (0.55±0.04; 1.72±0.18; 1.86±0.16; 1.97±0.15; 0.98±0.1; 0.91±0.1 control; E1; E2; Pg; E1+Pg; E2+E1 nmolNO/mgprot,  $p < 0.01$ ). Se empleó la concentración máxima de estímulo hormonal, obtenida de los respectivos estudios dosis respuesta. Para los ensayos in vivo, se administró por 7 días 50; 500 o 5000ug/kg peso/día, E2; E1 o Pg respectivamente, se aislaron los RAS y se sometieron a 5 min de tratamiento in vitro con los esteroides. La administración simultánea de E2+Pg revirtió la ausencia de estímulo sobre la producción de NO (72%; 115% s/control E2; Pg en OVXip vs 2; 5% s/control E2; Pg en placebo). En OVX suplementadas con E1 o E2+E1 no se observaron diferencias significativas entre los grupos placebo y OVXip. Estos resultados muestran que la presencia de E1 en simultáneo con E2 o Pg interfiere con la acción individual de cada uno de ellos, sugiriendo la existencia de un posible cross talk en los mecanismos hormonales de regulación de la producción de vasoactivos.

**0561. (0169) EFECTO DE PGF2ALFA SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE TIROSIN HIDROXILASA Y RECEPTORES HORMONALES EN RATAS PREÑADAS Y SU RELACIÓN CON LA SECRECIÓN DE PRL.** MM Bonafede, SR Valdez, M Soaje, GA Jahn

*Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza.*

La secreción de PRL está regulada negativamente por la dopamina (DA) hipotalámica y por factores estimulatorios (PRFs). Uno de los PRFs más importante es el estrógeno, que actúa a nivel hipotalámico e hipofisario. La progesterona (P4) tiene acción dual, inhibitoria o estimuladora según el modelo experimental. El objetivo de este trabajo es determinar si la secreción de PRL inducida por caída de P4 (provocada por el agente luteolítico PGF2alfa) al final de la preñez es mediada por modificaciones en la expresión relativa a actina de tirosin hidroxilasa (TH), enzima limitante en la síntesis de DA, y en los receptores (R) de PRL, E2 (alfa y beta), P4 y opioides (O)  $\mu$  y  $\kappa$ , en hipotálamo medio basal (HMB). Ratas en día 19 de preñez se trataron con PGF2alfa (estrumate, 25  $\mu$ g/rata x2) y se sacrificaron 24 hs después. Se midió PRL y P4 por RIA y se prepararon ARN y proteínas de los HMB donde se determinó la expresión de TH, RPRL, REalfa, REbeta, RP4 y RO  $\mu$  y  $\kappa$  por RT-PCR y Western blot (TH, REalfa, y RP4). El tratamiento con PGF2alfa produjo caída en P4 (Co 160 ± 28, PGF2alfa 31 ± 9  $p < 0.01$ ) y aumento en PRL (Co 7 ± 1, PGF2alfa 61 ± 26,  $p < 0.01$ ) séricas. Por RT-PCR detectamos una caída en el mARN de TH (Co 0.91 ± 0.13, PGF2á 0.55 ± 0.07,  $p < 0.05$ ) y aumento del REalfa (Co 1.22 ± 0.08, PGF2alfa 2.03 ± 0.11  $p < 0.01$ ), sin cambios en la expresión de los otros receptores. Por WB también se observó una caída en la expresión de TH (Co 0.56 ± 0.09, PGF2alfa 0.27 ± 0.06,  $p < 0.05$ ), sin cambios en la de REalfa y R. **Conclusion:** La caída de P4 inducida por PGF2alfa produce una caída en la expresión de TH en HMB, que disminuye el tono inhibitorio dopaminérgico, y un aumento en la expresión del mARN de REalfa. La caída en el tono dopami-nérgico, a su vez, contribuiría a la estimulación de la liberación de PRL.

**0562. (0806) ESTRADIOL MODULA LA ACCIÓN ESTIMULADORA DE MIFEPRISTONE Y NALOXONA SOBRE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA.** C Villegas Gabutti, JM Ortiz, RP Deis, M Soaje

*IMBECU-CONICET*

Progesterona (P4) inhibe la secreción de PRL en la preñez tardía. La administración del antiopioide naloxona (NAL) a ratas pretratadas con el antiprogesterona mifepristone (Mp) en el día 19 de gestación, induce un aumento en los niveles séricos de

PRL. A nivel hipotalámico, estradiol (E2) inhibe la actividad de las neuronas dopaminérgicas. **Objetivos:** Establecer el rol de E2 en el aumento de PRL inducido por tratamiento con Mp y NAL en el día 19 de preñez determinando los niveles de expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y de los receptores E2alfa (REa) en hipotálamo medio basal (HMB). **Materiales y Métodos:** se usaron ratas preñadas tratadas con el antiestrógeno tamoxifeno (Tm) o vehículo (V) los días 14-15 (0.5 mg/kg, vo, 12.00 h), Mp o v (5 mg/kg sc, 08.00 h, día 19) y NAL o salina a las 17.30 h. A las 18.00 h se obtuvo sangre troncal para determinar PRL sérica por RIA y los HMB para extraer el ARN total con TRIzol y establecer la expresión relativa a beta-actina de TH y REa por RT-PCR semicuantitativa. **Resultados:** Mp disminuyó la expresión de TH en HMB (V:0.7±0.05; Mp:0.4±0.08;  $p < 0.05$ ) y aumentó la expresión del REa (V:0.9±0.03; Mp:1.2±0.02;  $p < 0.05$ ). La administración de Tm a ratas pre-tratadas con Mp previno el efecto de Mp solo (Tm+Mp:0.6±0.04). La administración de NAL no modificó los niveles de ARNm de TH, REa. **Conclusiones:** 1) El bloqueo de progesterona por Mp disminuye los niveles de expresión de ARNm de TH y aumenta la expresión del REa en HMB facilitando la acción estimuladora de NAL sobre la secreción de PRL; 2) El bloqueo de los receptores de E2 por el tratamiento con Tm los días 14-15 de preñez revierte la caída de los niveles de expresión de TH inducida por Mp. 3) Los resultados presentados sugieren la participación del subtipo alfa del RE en la modulación dopaminérgica de la secreción de PRL al final de la gestación.

**0563. (0823) REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA EN RESPUESTA AL ESTÍMULO DE LA SUCCIÓN: ROL DEL SISTEMA OPIOIDE.** JM Ortiz, SR Valdez, C Villegas Gabutti, GA Jahn, M Soaje

*Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CONICET*

En la lactancia la prolactina (PRL) sérica está aumentada por el estímulo de succión en correlación con una actividad dopaminérgica hipotalámica disminuída. Los péptidos opioides participan en la liberación de PRL actuando a nivel hipotalámico para mantener elevados sus niveles en la lactancia. **Objetivos:** determinar la expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), de receptores opioides  $\mu$  ( $R\mu$ ) y  $\kappa$  ( $R\kappa$ ) y del receptor de estrógeno alfa (REa) en hipotálamo medio basal (HMB) en respuesta a la succión en ratas en días 10-12 de lactancia. **Materiales y Métodos:** se usaron ratas con lactancia continua (LC), separadas de sus crías durante 12 h (S/ss), con separación de crías por 12 h y sometidas a succión durante 2 (S/cs2h) y 4 h (S/cs4h). A las 12.00 h del día 10-12 de lactancia se obtuvo sangre troncal para determinar PRL sérica por RIA y los HMB para extraer el ARN total con TRIzol. Se estableció la expresión relativa a beta-actina de TH,  $R\mu$ ,  $R\kappa$  y REa por RT-PCR semicuantitativa. **Resultados:** el grupo S/ss mostró niveles elevados (0.80 ± 0.05) de expresión de TH comparado con LC (0.46 ± 0.04,  $p < 0.05$ ), en correlación inversa con los niveles de PRL. La succión por 2 o 4 h aumentó la PRL sérica sin modificar los niveles de ARNm de TH (S/cs2h: 0.76 ± 0.06; S/cs4h: 0.84 ± 0.03) comparado con S/ss. La expresión de  $R\mu$  fue mayor en S/ss (0.94 ± 0.04) con respecto a los grupos LC (0.65 ± 0.09) y 4 h de succión (0.68 ± 0.07) ( $p < 0.05$ ) y no se observaron cambios en  $R\kappa$ . REa disminuyó su expresión en S/ss (0.85 ± 0.04) comparado con 4 h de succión (S/cs4h: 1.10 ± 0.04). **Conclusiones:** 1) 2 y 4 h de succión no fueron suficientes para detectar cambios en la expresión de TH 2) la succión disminuyó diferencialmente la expresión del  $R\mu$  opioide e indujo un aumento en la expresión de REa en HMB en lactancia 3) estos datos sugieren la participación de estos receptores en el mecanismo de regulación de la secreción de PRL inducida por succión.

**0564. (0681) PREGNENOLONA SULFATO INHIBE LA LIBERACIÓN DE LH A TRAVES DE SU ACTIVIDAD MODULATORIA SOBRE EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO. VS Bazzocchini<sup>1,2</sup>, F Nanfaro<sup>1</sup>, AS Vega Orozco<sup>1</sup>, J González<sup>1</sup>, R Yunes<sup>1</sup>, RJ Cabrera<sup>1,2</sup>**

1 LINCE – IMBECU – CONICET. Area de Farmacología-FCM-Universidad Nacional de Cuyo, 2 Centro de Investigaciones Superiores – Universidad de Mendoza

Los neuroesteroides de origen astrocitario actúan modulando sistemas neuronales asociados a canales iónicos como el GABAérgico y el glutamatérgico. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la actividad moduladora de pregnenolona sulfato (preg-S) administrada intracerebroventricularmente (icv) sobre la secreción de LH. Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Sprague-Dawley ovariectomizadas impregnadas con estrógeno (25µg/rata sc) y progesterona (1mg/rata sc) (n=7-8) y canuladas en el ventrículo lateral (icv) para la administración de las diferentes drogas a estudiar. En el día del experimento se implantó un catéter en la vena yugular para la extracción seriada de sangre desde las 16 hs hasta las 21 hs.; 30 minutos posterior a la toma de la muestra basal, se administró icv las siguientes drogas, de acuerdo al protocolo experimental: LCR; preg-S 0.5 mM; AP7 25mM + preg-S.; de 17 a 21 hs. los resultados de la concentración de LH se expresaron como la media ± SEM (ng/ml), y analizados estadísticamente mediante test-t punto a punto. Observamos una inhibición estadísticamente significativa de preg-S sobre la secreción de LH respecto del grupo control entre las 20 y 21 hs, 20 hs (14.6±2.2 vs 7.1±1.5) 21 hs (22.6±3.6 vs 10.8±1.9), (p<0.05 para ambos horarios). La administración de preg-S y AP7 bloqueó el efecto inhibitorio, a las 19, 20 y 21 hs. 19 (27.3±7 vs 5.2±1.1), 20 (38.7±6.4 vs 7.1±1.6), 21 (36.7±5.6 vs 10.8±1.9) (19 p<0.01; 20 y 21 p<0.001). Nuestros resultados muestran una acción moduladora dual de preg-S tanto a nivel del sistema GABAérgico (inhibiendo), como sobre el glutamatérgico en un sitio no ligado al receptor NMDA.

**0565. (0519) LA PROLACTINA INDUCE APOPTOSIS DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS.** J Ferraris, D Radl, S Zárate, G Jaita, V Zaldívar, G Eijo, A Seilicovich, D Pisera

*Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*

La prolactina (PRL) secretada por la adenohipófisis participa en la proliferación, diferenciación y muerte celular en diversos tejidos. Esta hormona induce apoptosis de células luteales durante el proestro mientras que ciertas isoformas (14-16 kDa) inhiben la angiogénesis al inducir apoptosis de células endoteliales. Se ha observado que la PRL inhibe la proliferación de lactotrofos, por lo que estudiamos los efectos de esta hormona en la inducción de apoptosis de células adenohipofisarias y de lactotrofos. La PRL, a concentraciones de 100 ng/ml o mayores, disminuyó la viabilidad de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembras (determinada por MTS) (DO, Control: 0.52 ± 0.01; 10 ng/ml: 0.53 ± 0.01; 100 ng/ml: 0.29 ± 0.02, p<0.01; 500 ng/ml: 0.03 ± 0.01, p<0.01; test de Dunnett), e incrementó el número de células apoptóticas (TUNEL) (Control: 3.5%; 10 ng/ml: 3.1%; 100 ng/ml: 13.0%, p<0.01; 500 ng/ml: 64.4%, p<0.01; chi2) y de lactotrofos apoptóticos, identificados por inmunofluorescencia (Control: 3.1%; 10 ng/ml: 3.7%; 100 ng/ml: 20.6%, p<0.01; 500 ng/ml: 62.0%, p<0.01; chi2). Dado que los estrógenos sensibilizan a la adenohipófisis a estímulos proapoptóticos, evaluamos la modulación estrogénica del efecto de la PRL. Células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas fueron incubadas con vehículo (VEH) o estradiol (E2, 10-9 M) y PRL (100 ng/ml). La PRL disminuyó la viabilidad celular (MTS) independientemente de la presencia de E2 (DO; VEH: 0.77 ± 0.02; VEH+PRL: 0.52 ± 0.05, p<0.01, t de Student; E2: 0.76 ± 0.02; E2+PRL: 0.47 ± 0.07, p<0.01, t de Student). El pico de PRL que ocurre durante el proestro podría estar involucrado en la apoptosis de células adenohipofisarias que se observa durante esta etapa del ciclo estral.

## GENÉTICA II

**0566. (0092) LA METILACIÓN EN EL GEN DEL COACTIVADOR DE PPARG (PGC-1A) EN LOS RECIEN NACIDOS SE ASO-**

**CIA CON EL BMI DE LA MADRE.** C Gemma<sup>1</sup>, S Sookoian<sup>1</sup>, J Alvaríñas<sup>2</sup>, S García<sup>1</sup>, L Quintana<sup>2</sup>, D Kanevsky<sup>1</sup>, C González<sup>3</sup>, CJ Pirola<sup>1</sup>

*1 Inst. de Inv. Médicas A. Lanari, 2 Policlínico Bancario- Unidad de Nutrición, 3 Fac. de Medicina (UBA)-Dpto. de Farmacología*

Numerosos trabajos demuestran que los recién nacidos (RN) de bajo y alto peso tienen mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico en la adultez. Hemos demostrado en una población de 72 RN, 27 con peso anormal (16 bajo peso: menor al percentilo 10 para la edad gestacional y 11 alto peso: mayor al percentilo 90), que el contenido de DNA mitocondrial (DNAmt) se encuentra disminuido en los RN de peso anormal vs. los de normopeso. En la biogénesis mitocondrial intervienen varios genes que codifican para factores de transcripción, entre ellos PGC-1a, Tfam y PPARg. Postulamos que diferencias en el estado de metilación de los promotores de los genes antes mencionados podrían asociarse con cambios en el DNAmt y con las características clínicas, antropométricas y de laboratorio de los RN en relación con las características maternas. A partir de DNA de cordón umbilical del RN se hizo una PCR metilación específica, para lo cual el DNA se trató con bisulfito y luego mediante PCR en tiempo real se cuantificó la presencia de DNA metilado y no metilado. La región promotora del PPARg estudiada no presentó variación en la metilación, encontrándose completamente metilada en todas las muestras. La variabilidad en la metilación de los promotores PGC-1a y Tfam no se asoció con los cambios en el DNAmt ni con ninguna otra característica del RN. Sin embargo, encontramos una correlación entre los niveles de metilación del PGC-1a del RN y el índice de masa corporal de la madre (p = 0,044386, r = 0,25, Spearman). En conclusión, la metilación en la región promotora del PGC-1a podría ser uno de los mecanismos por los cuales un ambiente de obesidad materna durante la gestación condicione el desarrollo futuro de insulino resistencia en el hijo ya que se ha demostrado que individuos expuestos a obesidad materna durante la gestación tienen mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico. Además se han descripto alteraciones en la expresión de este gen en pacientes con síndrome metabólico.

**0567. (0723) ESTUDIO BIOQUÍMICO Y GENÉTICO DE UNA FAMILIA CON ENFERMEDAD DE HUNTER (MUCOPOLISACARIDOSIS II).** A Gulayin, S Salemm, CA Fossati, PA Rozenfeld

*LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP*

La Enfermedad de Hunter o Mucopolisacaridosis II es un desorden genético ligado al X, causado por la deficiencia de la enzima lisosomal iduronato-2-sulfatasa (IDS), que produce la acumulación de heparan y dermatansulfato en diversos tejidos. Las manifestaciones clínicas en los hemizigotas incluyen retardo del desarrollo, pérdida de audición, obstrucción de vías aéreas superiores, hepatosplenomegalia, enfermedad cardíaca valvular, rasgos faciales toscos y deformidades esqueléticas. La expresión fenotípica es variable, observándose 3 fenotipos: leve, intermedio y severo. El objetivo del presente trabajo es realizar el diagnóstico confirmatorio de un paciente con sospecha clínica de Enfermedad de Hunter severo y determinar la mutación genética del caso índice y de mujeres familiares. Se tomaron muestras de sangre del paciente con sospecha clínica y sus familiares. Se determinó la actividad de la enzima IDS utilizando un método fluorométrico. Para el estudio genético se realizó una amplificación por PCR de los 9 exones que codifican para IDS, y posterior secuenciación de los mismos. La actividad enzimática del paciente fue de 18,75 micromoles/l.h (Intervalo de referencia: 71.34 – 187,68 ). Se encontró actividad enzimática reducida en dos primeros hermanos del primer paciente, confirmando en los 3 casos el diagnóstico de enfermedad de Hunter. El análisis por secuenciación de la región codificante del gen de IDS reveló una mutación puntual de C por A en la posición 683 del cDNA, que produce un cambio en la secuencia primaria de la proteína IDS de prolina por glutamina en la posición 228. Se analizó la presencia

de esta mutación en mujeres familiares, detectándose hasta el momento 3 mujeres heterocigotas y una normal. Se encontró una mutación nueva, anteriormente no descrita en la bibliografía para Enfermedad de Hunter, asociado a un fenotipo severo. Además, es la primera mutación descrita en un caso de Hunter en Argentina.

**0568. (0628) UN METODO SENCILLO PARA DOSAJE DE GLOBOTRIAOSILCERAMIDA EN SEDIMENTO URINARIO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE FABRY.** PA Rozenfeld, PN De Francesco, CA Fossati

LISIN

La enfermedad de Fabry es un desorden genético ligado al X, causado por la deficiencia de la enzima lisosomal alfa-galactosidasa-A, que produce la acumulación de globotriaosilceramida (Gb3) en lisosomas. En la actualidad, el tratamiento específico consiste en el reemplazo enzimático (ERT). La determinación de Gb3 en sedimento urinario es uno de los marcadores para evaluar severidad, progresión y tratamiento de la enfermedad. El objetivo es desarrollar un método sencillo de cuantificación de Gb3 en el sedimento urinario de pacientes con Enfermedad de Fabry y evaluar su utilidad para seguimiento del tratamiento. Se incluyeron 15 hemizigotas y 21 heterocigotas, la mitad de los cuales se encontraban en ERT. Alícuotas de 200 ml de orinas de 24 horas recolectadas por los pacientes y 10 controles sanos fueron centrifugadas. Los glicolípidos presentes en el sedimento urinario fueron extraídos con cloroformo-metanol, sometidos a una digestión alcalina, e incubados con alfa-galactosidasa A recombinante. La cantidad de galactosa producida por la reacción enzimática sobre el Gb3 fue dosada por fluorometría. El resultado se expresó en nmoles de Gb3/orina de 24hs. Los valores de Gb3 determinados en las muestras de hemizigotas (723,03+488,69) y heterocigotas (231,56+102,93) fueron significativamente elevados ( $p=0,03$  y  $p=0,01$ , respectivamente) con respecto a los de los controles (74,28+63,03). La cantidad de Gb3 en hemizigotas y heterocigotas en ERT (183,32+134,36 y 72,03+31,33, respectivamente) es significativamente menor que en los pacientes no tratados ( $p=0,005$ ), mientras que no se observa diferencia significativa con los CN ( $p=0,15$ ). Este sencillo método de dosaje de Gb3 resulta en una medida sensible y específica para el dosaje de Gb3 en muestras de pacientes con Enfermedad de Fabry. También demostró ser de utilidad para el seguimiento de la terapia de reemplazo enzimático, mostrando la reducción de los niveles de Gb3, a valores dentro del intervalo de referencia normal.

**0569. (0767) CARACTERIZACIÓN DEL MÓDULO RCCX EN LA DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA.** C Fernández<sup>1,3</sup>, N Buzzalino<sup>1</sup>, A Oneto<sup>2</sup>, M Stivel<sup>2</sup>, S Belli<sup>2</sup>, E Pasqualini<sup>4</sup>, E Charreau<sup>3</sup>, L Alba<sup>1</sup>, L Dain<sup>1,3</sup>

1 Centro Nacional de Genética Médica, 2 División Endocrinología Hospital Durand, 3 Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, 4 Servicio de Pediatría Hospital Italiano

El gen CYP21A2 codifica para la enzima 21-hidroxilasa, siendo su deficiencia la principal causa de Hiperplasia Suprarrenal Congénita. El gen se ubica en el módulo RCCX, compuesto por los genes RP1, C4, CYP21 y TNX. En humanos, generalmente se encuentra duplicado en tandem. Como consecuencia, los cromosomas poseen 2 genes C4, un gen CYP21A2 y un pseudogen CYP21A1 con 98% de identidad de secuencia. En un trabajo previo estudiamos las 10 mutaciones puntuales más frecuentes del gen mediante PCR. El objetivo fue discriminar entre la presencia de mutaciones en homocigosis, deleciones y/o macroconversiones así como caracterizar el módulo RCCX. De un total de 270 pacientes, se analizaron por Southern-blot 65, así como muestras de 16 familiares. El ADN genómico fue digerido con Taq I y Bgl II y las membranas hibridizadas con sondas para los genes CYP21A1/2, TNXA/B y C4A/B. El análisis de los resultados permitió discriminar entre homocigosis, deleción y/o macroconversión en todos los individuos analizados. De un total de 150 alelos no

relacionados, se caracterizó el módulo RCCX en el 89% de ellos. Los haplotipos hallados fueron: 4 y 15 deleciones del módulo que contiene al gen y al pseudogen, respectivamente; 8 macroconversiones, de las cuales 6 involucran sólo la región 5' del gen; 37 cromosomas trimodulares con duplicación del módulo del pseudogen; al menos 29 de estos portan la mutación V281L. Además, 70 alelos resultaron bimodulares y se halló un cromosoma con un gen C4 "short" de ubicación telomérica. Por otro lado, observamos un patrón de bandas compatible con un genotipo homocigota para la deleción del pseudogen y para una macroconversión que involucraría una región 5' distal del gen. La información que aporta la restricción con 2 enzimas y la utilización de 3 sondas, permite una caracterización más precisa de la estructura molecular de este complejo locus. Asimismo nuestros resultados indicarían una elevada asociación entre V281L y la duplicación del pseudogen.

**0570. (0454) ANÁLISIS BIBLIOMÉTRICO DE LA PRODUCCIÓN CIENTÍFICA REFERIDA A MARCADORES GENÉTICOS DEL GUSTO AMARGO.** J Porretti, AM Calviño

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires e IQUIMEFA, CONICET, Argentina.

Diferencias individuales en la percepción de amargor de dos marcadores genéticos del gusto, 6-n-propil-2-tiouracilo (PROP) y feniltiocarbamida (PTC), se asocian con otras variaciones de sensibilidad y de preferencias alimentarias. El objetivo del presente trabajo es realizar un análisis bibliométrico de la producción científica mundial en este área de interés biomédico. Con la estrategia de búsqueda "(taste AND PROP) or (taste AND PTC)" se recuperaron 283 registros indizados en la base de datos Scopus desde 1965 a 2006 inclusive. El análisis incluyó a) la descripción de journals y autores de mayor producción y la frecuencia de citas recibidas; b) la categorización de los trabajos en 9 subáreas (antropología, tipificación sensorial, biología molecular, correlación con otras sensibilidades, correlación con patologías, percepción de productos o atributos, genética, revisión bibliográfica, ensayo con otras especies). Esta clasificación se efectuó mediante análisis del abstract ( $n=228$ ) o del título en ausencia del abstract ( $n=55$ ) en los períodos 1965-1974, 1975-1984, 1985-1994, 1995-2004 y 2005-2006. Cinco revistas de corriente principal contribuyeron con el 31,8% de los registros y los cinco autores más productivos aportan el 28,3% de la producción mundial. Se obtuvo un promedio de 9,7 citas/artículo pero 81 trabajos recuperados no muestran citas (17 publicados en 2005-2006, 57 en 1966-1995) y 12 trabajos no corresponden al tema investigado. Ni la subárea ( $p=0,08$ ) ni el período ( $p=0,06$ ) afectaron significativamente el número de trabajos analizados pero la covariación en la sensibilidad a estos marcadores y a otras modalidades ( $n=59$ ), la percepción de otros productos o atributos ( $n=34$ ) y las revisiones bibliográficas ( $n=21$ ) son las subáreas que concentran a los autores más productivos. Estos resultados muestran los esfuerzos de la comunidad científica para vincular esta ceguera gustativa con patrones más amplios de variabilidad individual.

**0571. (0234) IDENTIFICACIÓN DE CUATRO NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR BETA DE HORMONAS TIROIDEAS ASOCIADAS A RESISTENCIA A HORMONAS TIROIDEAS.** MC Olcese<sup>1</sup>, FS Belforte<sup>1</sup>, A Chiesa<sup>2</sup>, L Gruñeiro-Papendieck<sup>2</sup>, HM Targovnik<sup>1</sup>, CM Rivolta<sup>1</sup>

1 Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina., 2 Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET, División Endocrinología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina

El síndrome de resistencia a hormonas tiroideas (RTH), es un desorden genético con un modo de herencia dominante caracterizado por una disminución periférica a la acción de estas hormonas y niveles elevados de las mismas con un nivel inapropiadamente normal o elevado de TSH. RTH está ligado principalmente

a mutaciones en el gen del receptor beta de hormonas tiroideas (TR $\beta$ ), encontrándose la mayor parte de éstas en el dominio de unión al ligando (LBD). Se estudiaron 4 familias argentinas no relacionadas con evidencias clínicas de RHT. Con el objeto de identificar mutaciones causantes de esta patología, se aisló ADN genómico a partir de sangre periférica y los exones 9 y 10 del gen TR $\beta$  incluyendo las regiones intrónicas flanqueantes fueron amplificadas por PCR. Los fragmentos obtenidos se secuenciaron por el método de terminadores de cadena utilizando los primers específicos forward y reverse para los correspondientes exones. El análisis de la secuenciación identificó 4 nuevas variantes, 3 en el exón 9: c.991A>G; (p.N331D), c.1022T>C (p.L341P) y c.1036C>T (p.L346F) y una en el exón 10: c.1358C>T (p.P453L). Con el objeto de determinar si las alteraciones identificadas correspondían a nuevas mutaciones, se empleó la técnica de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) en la cual 100 cromosomas controles fueron analizados. Dado que no se observaron ninguna de estas variantes en el estudio poblacional podemos concluir que se han identificado en el presente trabajo 4 nuevas mutaciones inactivantes en el gen TR $\beta$ . El análisis molecular en RTH es de importancia para establecer un diagnóstico preciso considerando que esta patología no presenta signos ni síntomas patognomónicos, permitiendo la administración del tratamiento adecuado en aquellos pacientes sintomáticos.

**0572. (0782) HAPLOTIPOS DEL BETA 2 AR EN SINDROME DE POLIQUISTOSIS OVÁRICA (PCO).** MS Perez, CV Ramirez, GD Frechtel, GE Cerrone

*Cátedra de Genética y Biología Molecular UBA.*

La actividad lipolítica en células grasas es regulada por catecolaminas que actúan a través de receptores adrenérgicos, entre ellos el receptor beta2 adrenérgico (beta2- AR) que se expresa en células del tejido graso estimulando la lipólisis. Los ácidos grasos libres liberados al torrente sanguíneo actuarían como desencadenantes de complicaciones metabólicas en las pacientes con PCOs. Se ha descrito una relación entre diferentes SNPs en el gen beta2- AR y el desarrollo de PCOs. **Objetivo:** 3 haplotipos mayoritarios I, II y III que comprenden 4 SNPs del gen beta2- AR, fueron analizados para determinar su relación con la predisposición a PCOs. **Métodos:** Se estudió una población de 107 mujeres normales y una población de 90 pacientes con diagnóstico de PCOs. Ambas poblaciones se subdividieron en población normopeso (IMC<25kg/m<sup>2</sup>) y población con obesidad (IMC=25kg/m<sup>2</sup>). Se amplificó por PCR, un fragmento que comprende el péptido señal y región codificante del gen beta2- AR con primers específicos. Se identificaron los haplotipos mediante la técnica de SSCP en gel de poliacrilamida al 8% con glicerol. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Instat. **Resultados:** se observaron diferencias en frecuencias con una tendencia estadísticamente significativa tanto en la herencia alélica como genotípica para la presencia del haplotipo II.

	PCO (%)	N (%)	p PCO/N	OD (IC 95%)
I	59 (33.0)	76 (35.5)	ns	
II	81 (45.0)	76 (35.5)	0.07	1.4865 (0.9849-2.2246)
III	40 (22)	62 (29)	ns	
Alelos Totales	180	214		

**Conclusiones:** una mayor frecuencia del haplotipo II en pacientes con PCO independientemente de su IMC, establecería una tendencia al desarrollo del síndrome. Este haplotipo está relacionado con un aumento de la lipólisis en células del tejido graso con el consecuente aumento de ácidos grasos libres en circulación por lo cual sería un marcador genético de complicaciones de insulinorresistencia en las pacientes portadoras del mismo.

**0573. (0431) PRIMER CASO DE PORFIRIA HEPATOERITROPOLYÉTICA EN LA POBLACIÓN ARGENTINA. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS.** BX Granata<sup>1,2</sup>, VE Parera<sup>1,2</sup>, A Battlé<sup>2</sup>, MV Rossetti<sup>1,2</sup>

*1 Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA, 2 Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas - UBA*

Las Porfirias son desórdenes metabólicos que se originan por la deficiencia parcial primaria de alguna de las enzimas del camino biosintético del hemo. Se clasifican en hepáticas y eritropoyéticas. La Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE) es la forma homocigota de la Porfiria Cutánea Tardía (PCT) y sólo se han descrito alrededor de 30 casos a nivel mundial. Presenta una severa sintomatología cutánea. El defecto molecular se localiza en el gen que codifica para la enzima uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) en el que se han identificado alrededor de 70 mutaciones diferentes. Se estudió el caso de un paciente de 14 años con síntomas cutáneos leves aparentemente consistentes con una PCT pero con un perfil bioquímico indicativo de PHE: porfirinas urinarias: 12.072 µg/24h (VN: 20-250 µg/24h); cromatografía Uro: 33%, Hepta: 41%, Hexa: 5%, Penta: 14%, Copro: 7% (VN: Copro 100%); IPP: 10,33 a λ: 619 nm (VN: ≤ 1,30); porfirinas en sangre: 390 µg/ 100ml GR (VN: 150 ± 40 µg/ 100ml GR ) y porfirinas en materia fecal: 935 µg/ g seco (VN: 30-130 µg/ g seco). Por ensayos de PCR y secuenciación automática se detectó la presencia de dos mutaciones en el gen de la URO-D, previamente reportadas en pacientes con PCT. Una de estas corresponde a una mutación puntual en el sitio donador de splicing del exón 9 (IVS-1 G>A) que, además de llevar a la pérdida de este exón durante el procesamiento del ARNm de la URO-D, provoca un corrimiento del marco de lectura generándose así un codón stop prematuro en el séptimo codón del exón 10. La otra alteración es una mutación missense en el exón 7 (c.703 C>T) que provoca un cambio de aminoácido (p. P235S) en una región conservada de la enzima. La mutación de splicing corresponde al alelo materno y la missense al paterno, sin embargo, ambos padres son asintomáticos, y el único hermano no posee ninguna de las mutaciones. El estudio genético permitió diagnosticar de forma diferencial el primer caso argentino de PHE y así aplicar el tratamiento adecuado.

**0574. (0010) RECURRENCIA DE LAS MUTACIONES P.R277X EN PACIENTES CON BOCIO CONGÉNITO E HIPOTIROIDISMO. ANÁLISIS COMPARATIVO DE HAPLOTIPOS.** M Caputo<sup>1</sup>, GA Machiavelli<sup>1</sup>, SA Esperante<sup>1</sup>, V Varela<sup>1</sup>, L Gruñeiro-Papendieck<sup>2</sup>, A Chiesa<sup>2</sup>, CM Rivolta<sup>1</sup>, HM Targovnik<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA, 2 Centro de Investigaciones Endocrino-lógicas CEDIE-CONICET. Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.*

La prevalencia del hipotiroidismo neonatal es de 1/4.000 recién nacidos vivos. El hipotiroidismo congénito puede ser sin bocio (disembriogénesis), o con bocio (dishormonogénesis) causado por alteraciones en alguno de los genes cuyas proteínas intervienen en la biosíntesis de hormonas tiroideas: tiroglobulina (TG), TPO, DUOX2, NIS y PDS. Mutaciones en el gen de TG se han identificado a lo largo de todo el gen, siendo p.R277X la mutación más frecuente hallada en nuestro laboratorio (4/21). El objetivo del presente trabajo fue analizar el entorno genético de la mutación p.R277X para determinar si se debe a un efecto fundador o a una mutación recurrente. Se estudiaron 3 individuos heterocigotas y 2 individuos homocigotas para la mutación de origen argentino con bocio e hipotiroidismo congénito. En los pacientes se analizaron 15 polimorfismos exónicos de nucleótido único, un Indel ubicado en el intrón 18 (IVSTG18) y cuatro microsatélites ubicados en los intrones 10 (Tgms1), 27 (Tgms2), 29 (Tgri29) y 30 (Tgri30) del gen de la TG. También se estudiaron los padres para determinar el haplotipo asociado a la mutación. Los resultados fueron comparados con un individuo heterocigota de origen brasilero. Se observaron diferencias para los polimorfismos c.5995C>T, c.7408C>T, c.7501T>C, c.7589G>A, c.7920C>T, Indel IVSTG18, Tgms1, entre los pacientes argentinos analizados. A su vez, se observa que los argentinos compar-

ten al menos 13 de los 20 polimorfismos analizados. Por otra parte se observan al menos siete diferencias entre individuos argentinos y el individuo brasilero, por lo tanto se podría suponer que la mutación de origen brasilero y la de origen argentino se generaron por eventos mutacionales diferentes y hay alta evidencia que los alelos de la mutación p.R277X podrían derivar de un ancestro común en los argentinos. La identificación de la mutación p.R277X en el gen de TG ayudará a expandir nuestro conocimiento sobre el posible mecanismo mutacional para esta mutación.

**00575. (0655) ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE LA VARIANTE GLY482SER DEL GEN PGC-1 (COACTIVADOR-1 DEL RECEPTOR DE PEROXISOMA-PROLIFERADOR-ACTIVADO GAMMA -PPAR $\gamma$ -) Y SINDROME METABÓLICO. ML Tellechea<sup>1</sup>, MS Perez<sup>1</sup>, M Taverna<sup>2</sup>, GD Frechtel<sup>1,3</sup>**

*1 Cátedra de Genética y Biología Molecular, FFyB, UBA., 2 CONICET, 3 División Genética, Hospital de Clínicas José de San Martín. UBA.*

**Introducción:** El desarrollo de Síndrome Metabólico (SM) y de sus diferentes componentes responden a un tipo de herencia mendeliana que involucra tanto aspectos genéticos como ambientales. Dentro de los genéticos, variantes alélicas comunes en distintos genes determinarían la predisposición a SM. El gen PGC-1 estaría involucrado en la termogénesis adaptativa y en la insulino-sensibilidad. Estos datos sumados a hallazgos de clonado posicional sugieren el estudio del gen PGC-1 como gen candidato para SM. **Objetivo:** Analizar la frecuencia poblacional y la asociación entre la presencia de la variante Ser en la posición 482 del gen PGC-1 y SM. **Materiales y Métodos:** Diseño poblacional: 292 hombres de 18 a 64 años de edad fueron seleccionados de nuestra base de datos SMMS. Diseño de asociación: se aplicó el criterio del NCEP/ATP III modificado en el 2005 por AHA/NHLBI para seleccionar 75 hombres con SM y 75 controles del mismo sexo apareados por edad. Genotipificación: Extracción de ADN genómico de linfocitos de sangre periférica. Amplificación por PCR y digestión de con Hpa II (PCR-RFLP). **Resultados:** Distribución poblacional de frecuencias alélicas: alelo Gly 0.61, alelo Ser 0.39. Se verificó el equilibrio de Hardy-Weinberg. El estudio de comparación de medias a nivel poblacional de los parámetros bioquímicos y antropométricos en los grupos de individuos con genotipo Gly/Ser+ Ser/Ser v.s. Gly/Gly arrojó resultados no significativos (NS). El estudio de asociación entre la presencia de la variante Ser482 (homocigota o heterocigota) y SM presentó resultados NS. p: 0.86, OR: 1.1, IC95%: 0.57-2.27. **Conclusiones:** No se halló asociación entre la variante en estudio y la presencia de SM en esta población. Teniendo en cuenta el modesto aporte que cada variante alélica representa en una patología multifactorial, el análisis de un número mayor de individuos o el estudio de haplotipos podría brindar mayor poder de definición que el análisis de SNPs aislados.

**00576. (0559) RASTREO DE MUTACIONES EN EL GEN RB1 EN DOS CASOS FAMILIARES DE RETINOBLASTOMA. J Paiva-Palomino<sup>1</sup>, S González<sup>1</sup>, M Torres<sup>1</sup>, MM Ferrer<sup>2</sup>, I Szijan<sup>1</sup>**

*1 Cátedra de Genética y biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Instituto Neurociencias Aplicadas, Facultad de medicina, UBA*

El retinoblastoma (RB) es un tumor maligno de niños causado por pérdida de función del gen supresor tumoral Rb1 (13q14). Tiene dos formas, hereditaria (40%) y no hereditaria (60%). Las mutaciones descriptas para este gen incluyen grandes rearrreglos (20%) y mutaciones pequeñas (80%). La forma hereditaria se transmite a la descendencia, por lo tanto es importante para el diagnóstico la identificación de mutaciones. Nuestro objetivo fue estudiar molecularmente 2 familias que incluían varios afectados, identificar las mutaciones y rastrearlas en los familiares. Se purificó ADN de leucocitos de sangre periférica. Para conformar los haplotipos, determinar el de riesgo y detectar las grandes deleciones se analizaron 4 polimorfismos intragénicos:

dos RFLPs, un STR (CA)<sub>n</sub> y un VNTR CTTT(T). Para detectar mutaciones se amplificaron por PCR la región promotora del gen y los 27 exones, en los productos se buscaron patrones alterados mediante la técnica de heteroduplex/SSCP. La primera familia consta de 7 individuos, un paciente con RB unilateral y otro con RB bilateral, la segunda familia de 6 individuos con dos primas terceras con RB unilateral y bilateral respectivamente. El análisis de polimorfismos permitió determinar el haplotipo de riesgo en la primer familia. En la segunda las dos afectadas presentaron haplotipos diferentes. El análisis directo de mutaciones detectó alteraciones en los patrones de migración en ambas familias: formación de heteroduplex del exón 17 en los afectados de la primera y alteración en la conformación de cadena simple del exón 22 en una afectada de la segunda. Conclusiones: por análisis de segregación de polimorfismos se determinó el haplotipo de riesgo en una familia y se excluyeron hermanos asintomáticos. El análisis directo identificó el exón alterado en ambos casos. Los resultados obtenidos confirmaron la existencia de un mecanismo diferente en el origen del tumor de las primas de la segunda familia.

**00577. (0833) GENOTIPIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DEL SISTEMA GLUTATION-S-TRANSFERASA EN POBLACIÓN ARGENTINA NORMAL. AF Fundia, IB Larripa**

*Depto. de Genética, Academia Nacional de Medicina*

El sistema de enzimas Glutation-S-Transferasa (GST) tiene un importante rol en la metabolización de carcinógenos e influye en la susceptibilidad individual a los mismos. Este sistema de detoxificación contribuye a preservar la integridad genómica. Los genes que codifican las isoformas GST presentan variantes alélicas polimórficas. Los genes GST mu-1 (GSTM1) y GST tetha-1 (GSTT1) tienen una variante alélica nula con ausencia total del gen, asociadas con la susceptibilidad al cáncer. Se han observado diferencias intra-étnicas así como inter-étnicas en el tipo y frecuencia de los genotipos polimórficos. El objetivo del presente trabajo fue determinar las frecuencias de los polimorfismos de GSTM1 y GSTT1 en población Argentina. Se extrajo ADN de linfocitos de sangre periférica de 40 dadores sanos obtenidos al azar. Los genotipos se determinaron mediante una PCR triplex que incluye el gene de  $\beta$ -globina como control de calidad del ADN y los genes GSTM1 y GSTT1. La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida no desnaturizante (9%) durante 1h a 100V y coloración argéntica (2%). Se estableció que el 35% de la población mostró amplificación de ambos genes. La frecuencia de los alelos nulos GSTM1 y GSTT1 fue 55% y 5%, respectivamente. En el 5% de los individuos se observó la ausencia concomitante de ambos genes. La comparación de las frecuencias de los polimorfismos GST observada en este estudio con las de otras poblaciones reveló que la prevalencia del genotipo nulo GSTT1 es llamativamente menor que la documentada previamente (14-54%). Estos resultados proporcionan la base para realizar estudios de farmacogenómica y epidemiología. La caracterización molecular de los genotipos nulos permitirá evaluar el riesgo de la población expuesta a carcinógenos ambientales y/o agentes quimioterapéuticos.

**00578. (0550) HEMOFILIA A (HA): INVERSE SHIFTING-PCR (IS-PCR) PARA DIAGNÓSTICO DE TODOS LOS PATRONES Y REARREGLOS GENÉTICOS ASOCIADOS A INT22H. LC Rossetti, CP Radic, IB Larripa, CD De Brasi**

*Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires*

La HA es una coagulopatía ligada al sexo, causada por mutaciones en el gen del F8. Casi la mitad de las HA-severas están causadas por la inversión del intrón 22 (Inv22), mutación inusual originada por recombinación homóloga entre duplicones invertidos del X (int22h, 10-kb). Existen 3 copias de int22h: una en el intrón 22 (int22h-1) y otras 2, cerca del telómero Xq (int22h-2 e int22h-3), lo que permite 2 tipos de Inv22 (T1 y T2). Han sido hipotetizadas en la literatura, duplicaciones (no-causales de HA) y deleciones (causales de HA), aún no observadas clínicamente. **Objetivos:** validar y aplicar la técnica de IS-PCR en pacientes con

HA-severa. El abordaje IS-PCR incluye 2 fases, (1) preparación de círculos a partir de fragmentos de restricción BclI, (2) análisis por PCR, subdividido en 2 ensayos, diagnóstico y complementario. Para validación se compararon resultados de IS-PCR con análisis por Southern blot que detecta los rearrreglos y patrones de int22h; y con la técnica de PCR-inversa que sólo detecta la presencia de la Inv22. Se estudió un total de 109 individuos. En la validación IS-PCR vs Southern blot se estudiaron 32 individuos y se obtuvo una correlación perfecta: 18 varones (10 no-Inv22, 4 Inv22-T1 y 4 Inv22-T2) y 14 mujeres (6 no-Inv22, 4 portadoras Inv22-T1 y 4 portadoras Inv22-T2). También hubo perfecta concordancia entre IS-PCR y PCR-inversa en 43 individuos: 24 varones (11 no-Inv22, 13 Inv22: 11 T1 y 2 T2) y 19 mujeres (10 no-Inv22, 9 portadoras de la Inv22: 7 T1 y 2 T2). El sistema IS-PCR fue desafiado con 34 nuevos individuos: 20 varones (15 no-Inv22 y 5 Inv22-T1) y 14 mujeres (11 no-Inv22 y 3 portadoras Inv22-T1). El ensayo diagnóstico IS-PCR para la Inv22 es un método ideal para su incorporación en primera línea en el diagnóstico molecular de HA-severa. Su combinación con el ensayo complementario constituye una herramienta de screening poblacional para la investigación de los rearrreglos de int22h sugeridos como posibles, pero aún no reportados.

**0579. (0668) EVALUACIÓN GENOTÓXICA DE IONES COBRE LIBERADOS POR BIOMATERIALES EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.** CA Grillo<sup>1</sup>, MA Reigosa<sup>2</sup>, MA Fernández Lorenzo<sup>1</sup>

1 INIFTA, 2 IMBICE

El fenómeno de corrosión de biomateriales que contienen cobre, tales como los componentes de dispositivos intrauterinos y materiales dentales juega un rol decisivo en la biocompatibilidad. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial genotóxico de iones cobre liberados a partir del metal puro en células de ovario de Hamster Chino (CHO-K-1). Los extractos con iones cobre (Ext) de distintas concentraciones (cCu) se obtuvieron por disolución de discos de cobre metálico en medio de cultivo Ham-F10 con 10% de Suero Fetal Bovino a 37°C durante períodos de 0 a 72 h. Se evaluó la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE), se calculó el índice mitótico (IM) y la citotoxicidad se estimó a través del ensayo colorimétrico de reducción del metil tetrazolio (MTT). La cCu de los Ext se midió por espectrofotometría de absorción atómica obteniendo valores entre 0-55 mg/L. Se analizaron un total de 300 metafases por punto experimental y se utilizó el test de  $\chi^2$  para el análisis estadístico de los datos. La frecuencia de ACE muestra un incremento de metafases anormales respecto a los valores controles para Ext de más de 9 h (cCu  $\geq$  10 mg/L) ( $p < 0,01$ ). El IM reveló un comportamiento dual, un incremento para Ext de 1, 2 y 3 h. (cCu  $\leq$  4 mg/L) y un marcado efecto citotóxico ( $p < 0,001$ ) para concentraciones mayores. Los resultados obtenidos con el ensayo de MTT corroboran lo observado al analizar el IM. Estos resultados indican que, en las condiciones experimentales empleadas, los iones cobre liberados en medios biológicos simulados, ejercerían un efecto genotóxico y citotóxico para concentraciones mayores a 10 mg/L, en la línea celular CHO-K-1.

**0580. (0297) DETECCIÓN DE DELECIONES Y DUPLICACIONES EN EL GEN DE LA DISTROFINA EN AFECTADOS Y PORTADORAS DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER MEDIANTE LA TÉCNICA DE MLPA.** A Mampel<sup>1</sup>, D Marzese<sup>2</sup>, L Gomez<sup>2</sup>, AL Vargas<sup>1</sup>, V Ferreiro<sup>3</sup>, MI Echeverría<sup>1</sup>, F Giliberto<sup>3</sup>, M Roque<sup>2</sup>

1 Instituto de Genética, Fac Cs Medicas, UNCuyo, 2 Lab de Biología celular y Molecular IHEM CONICET Fac.Cs Médicas UNDe Cuyo, 3 Departamento de Genética molecular, Hospital de Clínicas, UBA

La distrofia muscular de Duchenne/Becker es una enfermedad asociada a mutaciones en el gen DMD ubicado en Xp21. Entre un 60-70% de las alteraciones corresponden a delecciones y/o duplicaciones que pueden detectarse por PCR sólo en los afectados y no en portadoras, por no ser una técnica cuantitativa. El

objetivo de este trabajo fue validar y aplicar la metodología cuantitativa Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) en 12 muestras de pacientes y portadoras de distrofia muscular de Duchenne/Becker. Siete muestras de ADN con previo diagnóstico de delecciones/duplicaciones realizado por análisis de segregación de STRs fueron incluidas en este estudio. La metodología MLPA consistió en la utilización de 40 pares distintos de sondas adyacentes ligadas a cada exón del gen DMD y posteriormente amplificadas en conjunto por PCR. Los productos fueron separados por electroforesis capilar y analizados con un software específico. En el 100% de las muestras con diagnóstico previo, MLPA confirmó los resultados. En tres de las siete muestras (un varón afectado y dos probables portadoras) el tamaño de la delección detectada por MLPA fue idéntico al hallado por STRs y en las cuatro muestras restantes, se encontró que las delecciones abarcaban más exones. En cinco muestras sin estudios moleculares previos se diagnosticó una portadora de una delección y un varón afectado con una duplicación. Los resultados obtenidos permitieron validar la metodología MLPA para detectar alteraciones en el número de copias de uno o más exones del gen DMD en pacientes y portadoras. Establecer el estado de portadora permitió realizar el asesoramiento genético correspondiente y al delimitar la alteración molecular se pudo analizar el marco de lectura del gen y así predecir el fenotipo Duchenne o Becker de los afectados. La metodología es sensible, específica, rápida y su aplicación amplía las posibilidades de diagnóstico genético molecular en nuestro país.

**0581. (0246) DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR (5-HTR2A) Y TRANSPORTADOR (SLC6A4) DE LA SEROTONINA EN UNA MUESTRA DE LA POBLACIÓN DE ARGENTINA.** AR Cajal, MA Redal, JL Faccioli, PF Argibay

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

**Introducción:** Los trastornos depresivos implican cambios fisiológicos que podrían depender del perfil genético. Las investigaciones se centran en el estudio de genes implicados en las vías de neurotransmisión, como los receptores de serotonina (5-HTR) y su transportador (SLC6A4). El gen 5-HTR2A presenta 2 polimorfismos: el 102 T/C donde C se asocia a ideación suicida, esquizofrenia y desórdenes de pánico y el -1438 G/A donde A está asociado a comportamiento impulsivo/compulsivo-obsesivos, entre otros. El gen SLC6A4 presenta otros 2 polimorfismos: HTTLPR caracterizado por una inserción/delección de 44 bp, donde la isoforma larga esta asociada a psicosis y agresión, y la corta a comportamiento suicida, depresión, desórdenes bipolares y HTTVNTR caracterizado por 9, 10 o 12 repeticiones, asociado a trastornos obsesivo-compulsivos (variantes largas) y depresión mayor (variantes cortas). **Materiales y métodos:** Se determinaron por PCR y PCR-RFLP las frecuencias alélicas y genotípicas de 2 polimorfismos (HTTLPR y HTTVNTR) del gen SLC6A4 y de 2 polimorfismos (102T/C y -1438G/A) del gen 5-HTR2A en una muestra aleatoria de 100 individuos no relacionados de la población Argentina. **Resultados:** Para el gen 5-HTR2A las frecuencias del polimorfismo -1438G/A calculada fueron G/G:36.63%, G/A:50.5%, A/A:12.87% (Frec. alélica G:0.62; A:0.38). Para el polimorfismo 102 T/C fue T/T:11.43%, T/C:51.43%, C/C:37.14% (Frec. alélica T:0.37; C:0.63). Para el gen SCL6A4 las frecuencias del polimorfismo HTTVNTR fue 12/10: 47.12% ;10/10:10.57% (Frec. Alélica 10:0.34;12: 0.66). Para el polimorfismo HTTVNTR obtuvimos L/L: 20.55%; L/S: 53.42%; S/S: 26.03% (Frec. alélica L: 0.47;S:0.53). **Conclusiones:** Considerando la importancia de documentar las frecuencias poblacionales de polimorfismos que pueden estar implicados en el desarrollo de ciertas patologías y debido a la ausencia de datos en la población argentina, desarrollamos este estudio preliminar que servirá de base para posteriores investigaciones.

**0582. (0180) MUTACIÓN MITOCONDRIAL A827G EN EL GEN ARNR 12S Y OTOTOXICIDAD. (ESTUDIO EPIDEMIOLÓ-**

**GICO CÓRDOBA - ARGENTINA).** MARÍ Chaig<sup>1</sup>, ME Zernotti<sup>2</sup>, N Soria<sup>3</sup>, F Romero O<sup>4</sup>, J Martínez<sup>2</sup>, G Fernandez de Soto<sup>4</sup>, F Romero M<sup>5</sup>, F Romero M<sup>5</sup>

1 *Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular FCM UNC*, 2 *Servicio de ORL Sanatorio Allende*, 3 *Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular FCM UNC*, 4 *Servicio de ORL Hospital de Niños*, 5 *Cátedra de ORL Hospital de Clínicas*

Mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNm) están asociadas a pérdidas de la audición que pueden ser de presentación sindrómica (S) y no sindrómica (NS). En este trabajo se informan resultados de un estudio epidemiológico, clínico y molecular, de sorderas neurosensoriales (ns) que se ubican en alguno de estos dos criterios de inclusión: por ototoxicidad y sordera neurosensorial mayor a 61 db. Las mutaciones en el ADNm estudiadas mediante PCR y enzimas de restricción adecuadas, fueron las siguientes: en el gen ARNr 12S: A1555G y A1557C; en el gen ARNt ser (UCN): A7443G, G7444A y A7445G y en el gen ARNt leu (UUR) la A3243G. Se realizó además evaluación clínica audiológica. De 80 individuos estudiados, se observó en un paciente la mutación A1557C y en otros dos (no emparentados) la G7444A. Estos resultados ya han sido comunicados. Otras dos niñas, de una misma familia, manifestaron sordera ns NS post lingual, al mes de la administración de antibióticos aminoglucósidos (ATB-AG), y dado que no se encontraron las mutaciones asociadas a ototoxicidad se decidió enviar a secuenciar todo el ADNm. El análisis del mismo indicó la presencia de la mutación A827G en el gen ARNr 12S, tanto en el probando como en la familia por línea materna, no así en controles. La posición A827G corresponde a un sitio altamente conservado del ARNr 12S (sitio A). Es posible que la mutación A827G altere la estructura del ARNr y afecte la función mitocondrial y por lo tanto la producción de ATP. Esta mutación del ARNr haría que se asemeje la estructura del mismo a la del ARNr bacteriano, y en consecuencia, más sensible a la acción de los ATB-AG y provoque pérdida de la audición. La mutación, por sí sola, no sería suficiente para producir sordera, es probable que además del medio ambiente participen otros factores (genes nucleares modificadores o asociados) que contribuyan en la expresión del fenotipo.

## INMUNOLOGÍA IX

**0583. (0726) LA HISTAMINA INDUCE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ESPECÍFICAS TCD8+ VÍA LA POTENCIACIÓN DE LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.** MM Amaral<sup>1</sup>, C Davio<sup>2</sup>, MA Gabelloni<sup>1</sup>, K Nahmod<sup>1</sup>, Y Petracca<sup>1</sup>, G Salamone<sup>1</sup>, J Maggini<sup>1</sup>, J Geffner<sup>1</sup>, M Vermeulen<sup>1</sup>

1 *Lab. Inmunología Oncológica, IHEMA, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires. Argentina*, 2 *Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lab. de Radioisótopos. Buenos Aires. Argentina.*

La histamina (HIS) es sintetizada por los mastocitos en la proximidad de las células dendríticas (CD) y tiene un rol importante en la génesis de los procesos alérgicos e inflamatorios, donde modula la polarización de las células TCD4+ hacia un perfil TH2. Actualmente, es aceptado que los linfocitos TCD8+ desempeñan un papel importante en el desarrollo de las respuestas alérgicas a nivel del árbol respiratorio. Previamente, nosotros demostramos que la HIS incrementa la captación y la presentación cruzada de antígenos solubles por las CD; actuando a través del receptor H2 y el H3/H4, respectivamente. En este trabajo, evaluamos en un modelo de alergia a la OVA en ratones BALB/C, la inducción de clones TCD8+ específicos por la HIS. Encontramos, que en ratones vacunados con CD tratadas con HIS se observó un incremento de las células TCD8+, mientras que en los ratones vacunados con CD tratadas con el antagonista del receptor H3/H4 (tioperamida:Ti), los valores tendieron a normali-

zarse (PBS: 17; CD: 15; HIS: 28; Ti: 21, % células; n=4). Asimismo, estudiamos el perfil de citoquinas de los linfocitos T obtenidos de pulmón por selección positiva, observando que la vacunación de ratones con CD estimuladas con HIS no indujo la producción de IFN $\gamma$  por los TCD8+ (PBS: 2; CD: 5; HIS 1.8; Ti 1.3, % células; n=4). Por el contrario, potenció la liberación de IL-12 en sobrenadantes de células pulmonares depletadas de CD (PBS: 6; CD: 10; HIS 20; Ti 12, media  $\mu$ g/ml, n=3), sin afectar la producción de IL-10. Nuestros resultados sugieren que la HIS contribuiría en el desarrollo del proceso alérgico a través de la activación de clones alérgenos específicos de linfocitos TCD8+ que resultan de la capacidad de la amina de incrementar la PC de OVA por las CD.

**0584. (0768) EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE RATÓN CON TRIODOTIRONINA INDUCE EL DESARROLLO DE UNA RESPUESTA INMUNE TH1.** I Mascanfroni<sup>1</sup>, M Montesinos<sup>1</sup>, S Susperreguy<sup>1</sup>, J Illarregui<sup>2</sup>, G Rabinovich<sup>2</sup>, C Pellizas<sup>1</sup>

1 *CIBICI-CONICET*, 2 *IBYME-CONICET*

Las células dendríticas (DC), CPA especializadas, son las únicas con la capacidad de activar linfocitos T vírgenes y orquestar la inmunidad adaptativa. Sin embargo, el impacto de las hormonas tiroideas (HT) en la iniciación de la inmunidad no había sido estudiado. Previamente demostramos que DC expresan el receptor de HT (TR) y que niveles fisiológicos de triiodotironina (T3) estimulan la expresión de marcadores de maduración de DC y su capacidad para inducir proliferación de células T vírgenes en cultivos alogénicos (CA). El objetivo del presente estudio fue investigar si T3 es capaz de regular una respuesta inmune mediada por DC. Para ello, evaluamos la capacidad de T3 de modular la secreción de citoquinas en DC. DC se obtuvieron de células de médula ósea de ratón cultivadas en presencia de GM-CSF y posteriormente expuestas a la acción de T3 (DCT3) durante 18 h. Células productoras de IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-5 fueron determinadas por citometría de flujo y la producción de IL-12, IL-10 e IFN- $\gamma$  determinada en SN de DC y CA cultivadas durante 48 h respectivamente, por ELISA. Los resultados indicaron que DCT3 mostraron un significativo incremento tanto en la frecuencia de células CD11c+ productoras de IL-12 ( $p < 0.01$ ) como en la secreción ( $p < 0.05$ ), mientras que la producción de IL-10 no fue modificada. La incrementada producción de IL-12 junto con una aumentada capacidad aloestimuladora de DCT3 fue también reflejada por el marcado incremento en la producción de la citoquina efectora IFN- $\gamma$  pero no de IL-5, tanto en el número de células productoras (12% vs. 2% control) como en SN de esplenocitos estimulados con DCT3. Sin embargo, IL-10 fue no detectable en CA de células T estimuladas con DCT3. Estos resultados indican fuertemente que T3 es capaz de promover el desarrollo de una respuesta Th1, lo cual podría tener profundas implicaciones en inmunopatologías, incluyendo cáncer y manifestaciones de las glándulas tiroideas a nivel de las interacciones inmunes y endócrinas.

**0585. (0809) EFECTO DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA PRODUCCION DE TNFA INDUCIDA POR TLR2: PAPEL DE LA FOSFOINOSITOL 3-QUINASA.** MA Hermoso Ramello, S Arancibia, CJ Beltran, D Benitez, P Langjahr

*Laboratorio de Inmunidad Innata, Programa de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile*

Productos bacterianos o citoquinas pro inflamatorias, junto con los glucocorticoides son clásicamente reconocidos como reguladores recíprocamente antagonísticos de la respuesta inmune adaptativa y la inflamación. Previamente, hemos demostrado que la expresión de TLR2 es inducida por citoquinas pro inflamatorias y aumenta cooperativamente por efecto de los glucocorticoides anti-inflamatorios, a través de la participación de sitios de unión de factores de transcripción tales como NF $\kappa$ B, STAT y elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) presentes en el extremo 3' del promotor de TLR2. Sin embargo, poco se sabe acerca de

la acción de ligandos del TLR2 y glucocorticoides sobre procesos de la inmunidad innata. En este trabajo, mostramos evidencia molecular de la regulación de la producción TNF $\alpha$  por un agonista sintético de TLR2, el Pam3Cys-Ser-Lys4 (sBLP), y el glucocorticoide sintético dexametasona (Dex). Células expuestas a sBLP aumentan la fosforilación de Akt de manera dosis dependiente, un evento que se bloquea con Dex. Esta observación indica que la ruta de señalización de TLR2 como la del receptor de glucocorticoides (GR) requiere la activación de PI3K y la fosforilación de Akt para regular la transcripción de genes pro inflamatorios. TLR2 y GR contienen motivos de unión de dominios SH2 de PI3K de tipo MXXY lo que indica que las funciones de ambos receptores requiere la participación de PI3K. La evidencia molecular indica que PI3K es fundamental en la regulación negativa de la expresión de TNF $\alpha$  y TLR2 inducida por sBLP y Dex. El tratamiento de células que expresan una mutante de la subunidad reguladora de PI3K con Dex regula negativamente la actividad transcripcional de NF $\kappa$ B y AP-1 inducida por TLR2. Nuestros datos sugieren que TLR2 y GR interactúan con p85 formando un complejo molecular, lo que define un mecanismo de señalización novedoso para TLR2, GR y PI3K con impacto relevante en el desarrollo de la respuesta inmune innata. Financiamiento FONDECYT #1050451.

**0586. (0855) CLONADO Y ESTABLECIMIENTO DE SISTEMAS REPORTEROS CON LOS PROMOTORES HUMANO Y MURINO DE LAS QUIMOQUINAS CXCL1 Y CXCL2.** MP Bayardo<sup>1</sup>, D Meier<sup>1</sup>, D Gonzalez Maciel<sup>1</sup>, JC Sirard<sup>2</sup>, M Rumbo<sup>1</sup>

1 LISIN - Facultad de Ciencias Exactas - UNLP, 2 Institut Pasteur Lille, Francia

La inducción de la respuesta innata por estimulación de receptores de patrones moleculares (PRR) se caracteriza por una fuerte inducción de distintos genes proinflamatorios, entre los que se destacan distintas quimoquinas. CXCL1 y CXCL2 son dos quimoquinas con actividad quimioattractante sobre neutrófilos. Ambas son fuertemente inducidas por distintos ligandos de PRRs. El objetivo del presente trabajo fue clonar los promotores de CXCL1 y CXCL2 para su utilización como reporteros de activación de la respuesta innata en sistemas in vitro e in vivo. El clonado se realizó amplificando por PCR la región upstream de los genes seleccionados. Los fragmentos clonados en todos los casos fueron de un tamaño aproximado de 1 Kbp, abarcando el inicio de transcripción y los elementos característicos de los promotores de quimoquinas proinflamatorias, tales como sitios de unión de los factores NF $\kappa$ B y AP-1. Se observó una alta homología entre los promotores humano y murino de ambas quimoquinas. Los fragmentos fueron subclonados en el plásmido pGL3, controlando la expresión de la luciferasa como reportero. Las construcciones fueron testeadas por transfección transciente en la línea epitelial intestinal Caco-2, empleando la luciferasa de renilla como normalizador. En todos los casos se observó un aumento de 2 a 10 veces en la actividad reportera al estimularse las células con flagelina (agonista de TLR5). Las construcciones murinas se analizaron in vivo en ratones por transfección transciente mediante shock hidrodinámico, observándose la actividad de luciferasa en el hígado del animal, inducible por LPS o flagelina de alrededor de 100 veces respecto al control no estimulado. Las construcciones generadas presentan analogía estructural y alta capacidad de inducción frente a los agonistas de TLRs utilizados, pudiendo ser empleadas en el establecimiento de sistemas reporteros para el screening de agonistas de la respuesta innata, tanto en modelos in vitro como in vivo.

**0587. (0815) EL VIRUS SINCIAL RESPIRATORIO MODULA LA EXPRESIÓN DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASA LEUCOCITARIA.** MJ Costa<sup>1,3</sup>, MF Delgado<sup>2</sup>, FP Polack<sup>2</sup>, HE Chuluyan<sup>1</sup>

1 3ra Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA, 2 Fundación Infant, Buenos Aires, 3 Lanais, Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas, UBA

El Inhibidor Secretorio de Proteasa Leucocitaria (SLPI) es una serpina de 11,7kDa que SLPI se expresa en forma constitutiva en células epiteliales y se encuentra modulado por citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$ . El virus sincial respiratorio (RSV) es responsable de infección respiratoria en los niños. El virus presenta sobre su superficie dos proteínas vitales para su propagación: la proteína G (adhesión) y la proteína F (fusión). Hasta el presente se desconoce con exactitud la patogenia de la enfermedad viral, habiéndose postulado un mecanismo inmunológico. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del RSV sobre SLPI presente en el epitelio respiratorio que posee actividad inmunomoduladora. Células A549 (Adenocarcinoma de pulmón) fueron crecidas e infectadas con distintas moI de RSVwt durante 16hrs y luego se evaluó el nivel de SLPI en el sobrenadante de cultivo mediante un ELISA. A partir de los resultados se pudo determinar que RSVwt aumenta la producción de SLPI (Ctrol= 9,83 $\pm$ 5,98, RSVwt=37,8 $\pm$ 13,3ng/ml, p<0.01). Este efecto fue máximo con una moI de 2 y tras 16hrs post-infección. Luego y con el objeto de determinar el rol de la proteína G y proteína F sobre la producción de la serpina, se incubaron las células A549 con RSVdnoose (mutante carente de proteína G), RSV sG (mutante productor de proteína G secretoria), RSVmG (mutante que sobre expresa la proteína G en membrana), y RSV inactivo por UV (RSVUV). Los resultados mostraron que: i) el RSV UV y el RSVdnoose no inducía la expresión de SLPI (Ctrol=4,65ng/ml $\pm$ 2,75, RSVUV=6,91ng/ml $\pm$ 4,16, RSVdnoose=9,6ng/ml $\pm$ 4,9 p>0,05); ii) el RSVsG y el RSVmG inducían niveles significativamente mayores de SLPI que RSVwt (Ctrol=4,65ng/ml $\pm$ 2,75; RSVwt=37,8ng/ml $\pm$ 13,3; RSVsG=64,1ng/ml $\pm$ 3,2, RSVmG=61,14ng/ml $\pm$ 7,6; p<0.01). Estos resultados demuestran que el RSV aumenta la producción de SLPI a través de la proteína G y sugieren que el SLPI podría estar involucrado en la patogenia de la infección respiratoria viral por RSV.

**0588. (0843) ROL DE LINFOCITOS TH17 EN LA TUBERCULOSIS HUMANA ACTIVA.** MF Quiroga<sup>1</sup>, V Pasquinielli<sup>1</sup>, IB Alvarez<sup>1</sup>, JO Jurado<sup>1</sup>, G De Stefano<sup>2</sup>, L Ciallalla<sup>2</sup>, RM Mussella<sup>2</sup>, VE Garcia<sup>1</sup>

1 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; Laboratorio de Inmunogenética, Hospital José de San Martín, Facultad de Medicina, UBA, 2 División Tisiopneumología, Hospital FJ Muñiz.

La inmunidad Th1 es crítica para prevenir la tuberculosis (TB), pero se desconoce cómo la respuesta inmune innata delimita la respuesta Th1 y por qué ésta no es suficiente para erradicar a *M. tuberculosis* (*Mtb*). La población Th1 antagoniza al linaje Th17. Las células Th17 producen IL-17, citoquina que atrae neutrófilos a los sitios de inflamación. No existe a la fecha información sobre la interrelación de los linajes Th1-Th17 en la TB humana, por lo cual es necesario investigar la participación de ambas poblaciones durante el daño tisular en la infección por *Mtb*. Tanto IL-6+TGF- $\beta$  como IL-23 participan en la diferenciación/proliferación de LTh17. En este trabajo, estudiamos el balance Th1-Th17, y la regulación por el microambiente de citoquinas de la población Th17 en sangre periférica (CMSP) y derrame pleural (DP) de pacientes con TB activa. Las CMSP y células de DP fueron estimuladas con sonicado de *Mtb* cepa Erdman (TBE). Se determinó la frecuencia (%) de LTh17 y LTh1 por citometría de flujo, y las citoquinas IL-17 e IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Los resultados mostraron que TBE indujo un mayor porcentaje de LTh17 en CMSP vs. DP (13.7 $\pm$ 3.7 vs. 2.8 $\pm$ 0.7, p<0.05), así como un aumento significativo de la población Th17 por efecto de TBE post-agregado de TGF- $\beta$ +IL-6 (p<0.05) o bloqueo del IFN- $\gamma$  endógeno (p<0.05). Asimismo, observamos una correlación inversa entre el % de LTh17 y la producción de IFN- $\gamma$  inducidos por TBE (R<sup>2</sup>: 0.701) en CMSP. Más aún, los resultados mostraron que el 3% de las células IL-17<sup>+</sup> de CMSP expresaban IFN- $\gamma$ , y que menos del 3% de las células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> producían IL-17, indicando que ambas poblaciones son mutuamente excluyentes en la infección crónica por *Mtb*. Nuestros datos revelan la coexistencia de células Th17 y Th1 durante la TB humana, que la pobla-

ción Th17 es regulada por el IFN- $\gamma$  y que en el sitio de la infección, prevalecen las células Th1, demostrando así el rol modulador de las células Th17 durante la infección por *Mtb*.

**0589. (0841) FUNCIÓN DE PD-1 Y PD-1 LIGANDOS EN LINFOCITOS T DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR ACTIVA.** JO Jurado<sup>1</sup>, IB Alvarez<sup>1</sup>, V Pasquinelli<sup>1</sup>, MF Quiroga<sup>1</sup>, E Abbate<sup>2</sup>, S Abad<sup>2</sup>, JP Castagnino<sup>2</sup>, RM Musella<sup>2</sup>, S de la Barrera<sup>2</sup>, VE García<sup>1</sup>

*1 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, UBA. Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina, UBA., 2 División Tisiopneumología, Hospital F.J. Muñiz, 3 Academia Nacional de Medicina, UBA*

La protección contra *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) depende de la inmunidad mediada por células. La completa activación de linfocitos T (LT) requiere de señales intracelulares iniciadas por el TCR y modulada luego por señales coestimuladoras. El receptor PD-1 es una molécula coestimuladora expresada en LT activados que actúa como regulador negativo de la activación de LT. PD-1 posee dos ligandos, PD-L1, PD-L2. En este trabajo estudiamos el rol de PD-1 y sus ligandos sobre las funciones efectoras de los LT durante la infección por *Mtb*. Para ello, analizamos la capacidad citotóxica de los LT CD8+ mediante el análisis de la expresión de CD107a/b por citometría de flujo. Así, células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis fueron estimuladas con *Mtb* en presencia/ausencia de anticuerpos bloqueantes anti-PD-1, anti-PDL-1 y/o anti-PDL-2. Nuestros resultados mostraron que el bloqueo de PD-1 en células estimuladas con *Mtb* incrementó significativamente la citotoxicidad de LTCD8+ respecto a LT cultivados sólo con antígeno ( $p < 0.005$ ). El bloqueo de PD-L1 en LT estimulados con *Mtb* incrementó levemente el porcentaje de células CD107a/b+, mientras que el bloqueo de PD-L2 aumentó significativamente esta población celular ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la neutralización conjunta PD-1/PDLs no produjo un incremento sinérgico de la citotoxicidad. El bloqueo de PD-1, PD-L1 o PD-L2 en células estimuladas con *Mtb* incrementó significativamente el porcentaje de LT CD4+ IFN- $\gamma$  respecto a las células estimuladas sólo con antígeno ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observó un efecto sinérgico al bloquear conjuntamente PD-1/PDLs. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la vía PD-1 inhibe la actividad citotóxica de los LT CD8+ y la producción de IFN- $\gamma$  por LT CD4+ en pacientes con tuberculosis activa, denotando un rol inhibitorio de dicha vía de señalización sobre las respuestas efectoras de los LT en la infección por *Mtb*.

**0590. (0853) PARTICIPACIÓN DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASAS LEUCOCITARIO (SLPI) EN LA FISIOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.** N Tateosian<sup>1</sup>, S Gomez<sup>2</sup>, MJ Costa<sup>1</sup>, V Pasquinelli<sup>1</sup>, J Jurado<sup>2</sup>, D Guerrieri<sup>1</sup>, P Maffia<sup>1</sup>, N Amiano<sup>1</sup>, M Reiteri<sup>1</sup>, C Arguelles<sup>3</sup>, R Musella<sup>4</sup>, E Abbate<sup>4</sup>, E Chuluyan<sup>1</sup>, V García<sup>2</sup>

*1 3ra Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA, 2 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas, UBA, 3 ANLIS-Malbrán, Instituto Nacional de Producción de Biológicos, 4 Hospital Muñiz, Departamento de Tisiopneumología*

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) produce 3 millones de muertes/año mundialmente. En la fisiopatogenia de la tuberculosis (TB) se diferencian tres etapas: latencia, reactivación y diseminación. Se postuló que las proteasas y sus inhibidores podrían cumplir un rol en cada una de estas etapas. Así, el objetivo de este trabajo fue investigar la actividad del inhibidor de serino proteasas, SLPI, en la fisiopatogenia de la TB. Con este fin, estudiamos la producción de IFN- $\gamma$  y SLPI inducida por estimulación antigéno-específica (*Mtb*) en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con TB y dadores sanos (DS). Nuestros resultados mostraron que *Mtb* incrementó significativamente los niveles de IFN- $\gamma$  disminuyendo la secreción de SLPI en TB (IFN- $\gamma$ 99.8% (100-(IFN- $\gamma$ Mtb)/(IFN- $\gamma$ Mtb - IFN- $\gamma$ Medio)); SLPI 85.8% (100-(SLPIMtb/

(SLPIMedio - SLPIMtb)); y DS (IFN- $\gamma$ 98%; SLPI: 55.2%). Bloqueando el IFN- $\gamma$  endógeno producido por *Mtb* se revierte parcialmente la disminución de SLPI inducida por *MTB*. La disminución de SLPI por *MTB* también se observó en células de adenocarcinoma de pulmón A549 (30% de disminución). Más aún, la adición exógena de IFN- $\gamma$  redujo la secreción de SLPI en A549 ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, el SLPI bloqueó la producción de IFN- $\gamma$  inducida por *Mtb* en forma dosis respuesta (control: 28.3 $\pm$ 2.8; 20 ng/mlSLPI: 3.8 $\pm$ 1.9 ng/ml,  $p < 0.05$ ). Para corroborar el efecto de SLPI sobre la producción de IFN- $\gamma$  in vivo, ratones Balb/c infectados por vía intranasal con BCG fueron inoculados con SLPI. Los resultados mostraron que efectivamente el IFN- $\gamma$  en líquido broncoalveolar (BAL) de animales tratados con SLPI disminuyó un 47% respecto al control. Más aún, el tratamiento con SLPI redujo el recuento de leucocitos totales en BAL (44.3%,  $p < 0.0001$ ) y en pulmón (48%,  $p < 0.05$ ). En conclusión, nuestros resultados demuestran por primera vez la interrelación entre un inhibidor de serino proteasas, el SLPI y la citoquina crucial en la defensa contra *Mtb*, el IFN- $\gamma$  durante la fisiopatogenia de la TB.

## INMUNOLOGÍA X

**0591. (0476) ANALISIS DEL POLIMORFISMO DE LOS ALELOS HLA-DRB1 Y SU RELACION CON LA PRESENCIA DE MIOCARDIOPATÍA EN INDIVIDUOS CON INFECCION CRONICA POR TRYPANOSOMA CRUZI.** S García Borrás<sup>1</sup>, R Regules<sup>1</sup>, C Cotorruelo<sup>2</sup>, C Biondi<sup>1</sup>, J Beloscar<sup>3</sup>, L Racca<sup>1</sup>, O Bottasso<sup>3</sup>, A Racca<sup>4</sup>

*1 Area Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR., 2 CONICET, 3 Facultad de Ciencias Médicas, 4 CIUNR*

En el desarrollo de la respuesta inmune a patógenos intracelulares participa el elevado polimorfismo de las moléculas HLA de clase II. Los factores genéticos que determinan la presencia de lesiones cardíacas en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, no han sido totalmente elucidados. El objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de los alelos HLA-DRB1 en el desarrollo de Miocardiopatía Chagásica Crónica (MCC). Se estudiaron 152 personas nacidas en la zona endémica de la Provincia de Santa Fe, 71 seropositivas para el T. cruzi (ELISA y Hemaglutinación Indirecta) y el resto sin evidencia de enfermedad alguna. Los grupos estudiados no presentaron diferencias en las variables sexo y edad (50.17 $\pm$ 12.68 vs 48.62 $\pm$ 13.71 años). Los alelos fueron tipificados mediante la técnica de PCR-SSOP. Se identificaron 20 alelos diferentes en ambos grupos. En los seropositivos los alelos más frecuentes fueron: DRB1\*0409 (24.65) y DRB1\*1503 (13.38). Al comparar las frecuencias en estos individuos respecto de los controles, los riesgos relativos (RR) fueron para el alelo DRB1\*0409 RR=19.97 (IC95%; 4.89-67.56) y para el alelo DRB1\*1503 RR=21.68 (IC95%; 2.94-159.91). Dentro de los seropositivos, 38 pacientes presentaron MCC (examen clínico, radiografía de tórax y ECG) mientras que los 33 restantes no presentaban compromiso cardíaco. La comparación de las frecuencias alélicas entre ambos grupos de infectados, mostró que únicamente el alelo DRB1\*1503 RR= 7.38 (IC95%; 1.77-30.77) está asociado al desarrollo de lesiones cardíacas. Los resultados obtenidos indican que en nuestra población encontramos únicamente alelos predisponentes (DRB1\*0409 y DRB1\*1503) a la infección con T. cruzi. El incremento de frecuencia del alelo DRB1\*1503 observado en los cardiopatas, sugiere su participación en la susceptibilidad genética al daño cardíaco. Estos hallazgos podrían ser utilizados en el control de la enfermedad.

**0592. (0123) RESPUESTA INMUNE DE OSTEBLASTOS FRENTE A LA INFECCIÓN CON BRUCELLA ABORTUS 2308 VS LA INFECCIÓN CON STAPHYLOCOCCUS AUREUS.** MV Delpino, CA Fossati, PC Baldi

*Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET)*

Las complicaciones osteoarticulares son las más frecuentes en la brucelosis activa. Los osteoblastos podrían ser infectados por *Brucella* produciendo sustancias que atraen y activan fagocitos profesionales. Nuestro objetivo es estudiar la respuesta inmune durante la infección osteoarticular por *Brucella abortus* y compararla con la de *Staphylococcus aureus*, el principal agente causal de osteoartritis en el hombre. Se evaluó si los efectos encontrados pueden ser mediados por factores solubles producidos por las células interactuantes monocitos (línea THP-1) y osteoblastos (línea SaOS-2). Se estudiaron los efectos de los sobrenadantes de cultivo de osteoblastos infectados sobre los monocitos, y viceversa. Se determinó IL-8, MCP-1 y TNF- $\alpha$  por ELISA, y la capacidad de replicarse en osteoblastos por recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) en placa (se confirmó por microscopía confocal). Los resultados obtenidos indicaron que *B. abortus* y *S. aureus* pueden replicarse en osteoblastos. Las UFC de *B. abortus* fueron  $1397 \pm 74.95$  a las 24 hs posinfección,  $2993.5 \pm 9.19$  a las 48 hs y  $5080 \pm 183.85$  a las 72 hs. Para *S. aureus* fueron  $254000 \pm 8485.28$ ,  $8450 \pm 70.71$  y  $2550 \pm 353.55$ , respectivamente. Ambas infecciones indujeron una baja producción de IL-8 y MCP-1 en SaOS-2. En cambio, se detectó producción de IL-8 y MCP-1 en SaOS-2 tratadas con sobrenadantes de THP-1 infectadas por *B. abortus* (MCP-1:  $1231 \pm 521.70$  pg/ml, IL-8:  $475 \pm 63.64$  pg/ml) o por *S. aureus* (MCP-1:  $1455.123 \pm 114.52$  pg/ml, IL-8:  $1087.5 \pm 142.128$  pg/ml). A su vez, cuando se estimularon THP-1 con sobrenadantes de SaOS-2 infectados con *B. abortus* se observó la inducción de IL-8 y TNF- $\alpha$ , mientras que los sobrenadantes de SaOS-2 infectados con *S. aureus* indujeron solo la producción de IL-8 por parte de las células THP-1. El conocimiento de la respuesta inmune inducida durante la infección osteoarticular por *Brucella* permitirá encontrar nuevos blancos terapéuticos para el control de la brucelosis osteoarticular.

**0593. (0229) EL EFECTO BENEFICIOSO DEL BENZNIDAZOL (BZL) SOBRE LA LIGACIÓN Y PUNCIÓN CECAL ESTÁ ASOCIADO A SU CAPACIDAD ANTI-INFLAMATORIA Y A UNA MENOR BACTERIEMIA.** R Manarin<sup>1,2</sup>, E Bottasso<sup>1</sup>, O Bottasso<sup>1</sup>, E Serra<sup>2</sup>, S Revelli<sup>1</sup>

*1 Instituto de Inmunología. Fac. de Cs. Médicas. UNR, 2 IBR- CONICET. Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.*

Nuestro grupo probó que el tratamiento con BZL, antiparasitario empleado en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, protege a ratones desafiados con lipopolisacárido, aumentando su supervivencia y disminuyendo los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias. Esto nos alentó a evaluar la acción de esta droga en un modelo con componente inflamatorio e infeccioso como es el de Ligación y Punción Cecal, (CLP de Cecal Ligation and Puncture), el cual deviene en una peritonitis séptica. Para la CLP se utilizaron ratones C57BL/6 de 8-10 semanas. El esquema de administración fue 2 hs antes de la CLP y cada 12 hs post-CLP y se probaron varias dosis de BZL (200, 25 y 10 mg/kg de peso) por vía oral. Se realizaron grupos sham como controles quirúrgicos. Animales sham y con CLP recibieron BZL y solvente (S). En cuanto a la supervivencia, a las 24 hs post-CLP en el grupo con BZL 25 se registró menor mortalidad respecto a los demás ( $p=0,05$ ). Este grupo también presentó la mejor condición clínica a las 24 hs con respecto a los grupos restantes. Contrariamente, el grupo CLP+BZL 200 mostró el peor estado clínico comparado con el resto. A las 24 hs post-CLP se evidenció que la producción de NO en todos los grupos con CLP fue significativamente mayor que en los grupos sham. En cuanto al FNT-a sérico, se observó un descenso significativo en el grupo con BZL 25 con respecto al grupo CLP+S. Esta citoquina apareció significativamente aumentada en el grupo CLP+BZL 200, lo cual se relaciona directamente con el deterioro y la muerte de estos animales. Un hallazgo llamativo fue que el grupo CLP+BZL 25 mostró un descenso significativo de la bacteriemia con respecto a los demás. Esto sugiere que el BZL, en la dosis de 25 mg/kg de peso, estaría facilitando una mejor depuración bacteriana en los ratones con CLP. El BZL no inhibió el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la

mejoría observada en los animales CLP+BZL 25, se debería al menos a las propiedades antiinflamatorias de la droga.

**0594. (0157) EFECTO DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS VIRALES SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS DURANTE LA ETAPA ASINTOMÁTICA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA EQUINA (VAIE).** A Bailat<sup>1</sup>, L García<sup>1</sup>, A Soutullo<sup>1,2</sup>, MI García<sup>1</sup>, A Racca<sup>1</sup>, C Veaute<sup>1</sup>, I Malan Borel<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, 2 Laboratorio de Inmunológica, Dirección de Sanidad Animal. Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe*

Durante la etapa asintomática de la infección por el VAIE, el sistema inmunológico logra restringir la replicación viral hasta niveles no detectables, lo cual provee un modelo animal para evaluar los mecanismos involucrados en el control natural de las infecciones ocasionadas por lentivirus. En trabajos anteriores hemos observado que los péptidos sintéticos gp90 y gp45, que imitan secuencias conservadas de las proteínas virales, son reconocidos específicamente por anticuerpos y linfocitos de animales infectados naturalmente. Por otra parte, inducen la producción, in vitro, de IL-12 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Basándonos en estos hechos, el objetivo del presente estudio fue evaluar, mediante RT-PCR semicuantitativa, los niveles de ARNm de IFN- $\gamma$ , IL-4 y TGF- $\beta$ , luego del estímulo in vitro con gp90 y gp45 en PBMC obtenidas de ocho caballos asintomáticos infectados naturalmente. Los resultados mostraron un aumento de IFN- $\gamma$  frente al estímulo específico, tanto con gp90 como con gp45, en caballos VAIE(+) ( $p<0,05$ ). Los niveles de IL-4 no fueron alterados luego del estímulo peptídico, siendo los valores hallados para el grupo VAIE(+) mayores que los observados en el grupo control ( $p<0,05$ ). Los péptidos gp90 y gp45 tampoco modificaron la expresión de TGF- $\beta$ , siendo los niveles semejantes entre ambos grupos de animales analizados ( $p>0,05$ ). Estos resultados revelan que la respuesta generada frente a las regiones conservadas de las proteínas gp90 y gp45 es fundamentalmente Th1, con niveles conservados de IL-4, sugiriendo la participación de una respuesta inmune mediada por células en el control de la infección durante el estadio asintomático.

**0595. (0064) RESPUESTA INMUNE FRENTE A UN MODELO DE LENTIVIRUS EQUINO.** A Bailat<sup>1</sup>, A Soutullo<sup>1,2</sup>, MI García<sup>1</sup>, L García<sup>1</sup>, C Veaute<sup>1</sup>, A Racca<sup>1</sup>, I Malan Borel<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Inmunología Básica, Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, 2 Laboratorio de Inmunológica, Dirección de Sanidad Animal. Ministerio de la Producción de la Provincia de Santa Fe*

El virus de la anemia infecciosa equina (VAIE) es un lentivirus miembro de la familia Retroviridae, el cual presenta dos glicoproteínas de envoltura, gp90 y gp45. En este trabajo se han analizado por RT-PCR semicuantitativa, los niveles de ARNm de TLR4, MD-2, IFN- $\alpha$  e IL-12p40 en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de equinos VAIE(+) asintomáticos y VAIE(-) como grupo control. Se ha determinado, además, el efecto in vitro de los péptidos sintéticos gp90 y gp45, que imitan regiones conservadas de las proteínas virales, sobre la síntesis de ARNm de TLR4, IFN- $\alpha$  e IL-12p40 en dichas células. Se encontró ARNm específico para TLR4 y MD-2 en todos los animales. Los datos hallados para TLR4 mostraron una amplia dispersión, ubicándose el 70% de los valores de VAIE(+) ( $n=22$ ,  $0,80 \pm 0,09$ ) por debajo de la media estadística obtenida para VAIE(-) ( $n=14$ ,  $0,88 \pm 0,18$ ) ( $p>0,05$ ). Los valores hallados para MD-2 se encontraron en un rango más restringido, sin diferencia significativa entre ambos grupos ( $n=8$ ,  $0,74 \pm 0,02$  y  $n=6$ ,  $0,91 \pm 0,07$  para VAIE(+) y VAIE(-), respectivamente). Los valores de IFN- $\alpha$  fueron menores en VAIE(+), ( $n=8$ )  $1,014 \pm 0,057$ , que en VAIE(-), ( $n=6$ )  $1,593 \pm 0,162$ ,  $p<0,05$ ; mientras que los niveles de IL-12p40 no presentaron di-

ferencias significativas con el grupo control ( $p > 0,05$ ). Los ensayos de estimulación con gp90 y gp45 mostraron que ninguno de los péptidos alteró la expresión de TLR4 ni de IFN- $\alpha$  ( $p > 0,05$ ). Los animales VAIE(+) mostraron una tendencia a expresar mayores niveles de IL-12p40 luego del estímulo con cada uno de los péptidos ( $p > 0,05$ ). En este trabajo se demostró la presencia de ARNm específico para TLR4 y MD-2 en PBMC equinas, evidenciándose además, en este estadio de la infección, una inhibición de IFN- $\alpha$  así como la participación de IL-12 en la respuesta inmune celular frente al virus.

**0596. (0267) IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INTERACCIÓN DEL SUPERANTÍGENO SEG CON EL TCR MURINO VARIABLE BETA 8.2.** MM Fernández<sup>1</sup>, MC De Marzi<sup>1</sup>, AB Bauer<sup>1</sup>, S Cho<sup>2</sup>, B Ganem<sup>1</sup>, RA Mariuzza<sup>2</sup>, EL Malchiodi<sup>1</sup>

*1 IDEHU- CONICET, Cátedra de Inmunología Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA., 2 CARB-UMBI Maryland USA*

Los superantígenos bacterianos (SAGs) son toxinas que sin ser procesadas, interactúan con el CMH-II y la región V $\beta$  del TCR produciendo una respuesta inmune exacerbada de tipo proinflamatoria que puede ser letal. Los SAGs se asocian fuertemente con el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes en individuos susceptibles. Dos modelos murinos, uno para la encefalitis autoinmune, análoga a la esclerosis múltiple y el segundo para la artritis rematoidea permiten estudiar la relación entre SAGs y estas enfermedades. En ambos casos, los TCRs involucrados expresan preferentemente cadenas V $\beta$ 8.2. El SAGs SEG forma parte de la familia de SEB, la que se caracteriza por interactuar con V $\beta$ 8.2. **Resultados** obtenidos en nuestro laboratorio sugerían fuertemente que el sitio de interacción SEG-V $\beta$ 8.2 no era el conservado en la familia. Para caracterizarlo SEG y la región V $\beta$ 8.2, se titularon por tamiz molecular, concentrándose a 7 mg/ml y sometándose a un "screening" de cristalización. Los cristales obtenidos difrataron a 2.0 amstrongs. La resolución de la estructura tridimensional del complejo demostró que el sitio de interacción SEG-V $\beta$ 8.2 está desplazado respecto al conservado en la familia de SEB, no involucrando residuos que se consideran "hot spot". El número aumentado de puentes de hidrógeno entre ambas moléculas, explica la muy alta afinidad natural de SEG, en el orden nanomolar, por V $\beta$ 8.2. Esta afinidad similar a la de un complejo Ag-Ac, con tasas de asociación y disociación rápidas, sumada a un sitio de interacción desplazado, sugiere una ventaja adaptativa de las cepas capaces de expresar este SAG.

**0597. (0295) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR TIPO II DE LA CADENA  $\gamma$  DE IGG (FC $\gamma$ RII) EN LA APOPTOSIS DE EOSINÓFILOS INDUCIDA POR PRODUCTOS EXCRETORES-SECRETORES (PES) DE FASCIOLOSA HEPÁTICA.** MC Serradell, L Guasconi, DT Masih

*Dpto. de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET. Fac. de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba*

Hemos demostrado que productos excretorios-secretorios (PES) de *F. hepatica* inducen apoptosis de eosinófilos (Eo) de manera dependiente de la activación de enzimas tirosin-kinasas (TirK) y de la producción de derivados tóxicos de oxígeno (DTO). Se observó además que carbohidratos (CH) presentes en los PES participaban en el fenómeno de apoptosis. Como posibles receptores de residuos de CH se evaluó la participación del receptor de  $\beta$ -glucanos (Dectina-1) y del receptor de manosa (RM). Por otra parte, teniendo en cuenta que receptores de inmunoglobulinas, especialmente el Fc $\gamma$ RII, participan en la apoptosis de Eo mediante vías de señalización dependientes de TirK, se decidió estudiar su participación en la muerte de Eo inducida por los PES. Eo peritoneales de ratas Wistar se purificaron mediante gradiente con Percoll con un rendimiento mayor al 95% (May-Grünwald Giemsa). Las células purificadas se incubaron en medio solo, con 80  $\mu$ g/ml de PES o con dexametasona (control positivo de apoptosis) a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 6 hs de incubación la apoptosis se evaluó por citometría mediante el análisis de hipodiploidía en células fijadas con etanol y teñidas con yoduro de propidio. Los

niveles de DTO se determinaron en cultivos de 1 hora mediante la técnica de quimioluminiscencia derivada de la oxidación del luminol. Los resultados mostraron que el tratamiento de las células con inhibidores de Dectina-1 (laminarina) y del RM (manano y  $\alpha$ -metil manosa) no fue capaz de suprimir el efecto proapoptótico de los PES. Por el contrario, el bloqueo del Fc $\gamma$ RII inhibió de manera significativa tanto la apoptosis de Eo como la producción de DTO inducida por estos productos parasitarios ( $p < 0,025$  respecto a Eo con PES solo). Estos datos demuestran que PES liberados por *F. hepatica* son capaces de señalar a nivel de Eo a través de la interacción con Fc $\gamma$ RII de manera independiente de la presencia de opsoninas y dando como resultado un aumento en la producción de DTO y apoptosis celular.

**0598. (0033) EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR CEPAS LOCALES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES A DROGAS.** N Yokobori<sup>1</sup>, L Geffner<sup>1</sup>, P Schierloh<sup>1</sup>, M Alemán<sup>1</sup>, L Balboa<sup>1</sup>, B Lopez<sup>2</sup>, V Ritacco<sup>2</sup>, L Barrera<sup>2</sup>, A García<sup>3</sup>, M Vescovo<sup>3</sup>, E Abbate<sup>3</sup>, S de la Barra<sup>1</sup>, MC Sasiain<sup>1</sup>

*1 Academia Nacional de Medicina, 2 Servicio de Mico-bacterias-ANLIS, Malbrán, 3 Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz*

La tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB) es causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistentes por lo menos a isoniazida y rifampicina. En Argentina se han detectado casos de MDR-TB causados por cepas autóctonas, las cuales fueron clasificadas en cepas de alta y baja infectividad pero nada se conoce de la respuesta inmune inducida por las mismas. Previamente hemos descrito que las cepas M y 410 tendrían propiedades inmunogénicas diferentes a H37Rv (Rv); éstas inducen menor producción de TNF- $\alpha$  y muerte por apoptosis en macrófagos derivados de monocitos (MDM) humanos que la Rv. El objetivo de este trabajo fue investigar los mecanismos que podrían estar involucrados. La preincubación (1h) de monocitos de sangre periférica de pacientes MDR-TB con la cepa M no modificó la inducción de TNF- $\alpha$  luego de 4 horas de estimulación con Rv (%Mono TNF- $\alpha$ + C: 10 $\pm$ 4; Rv: 54 $\pm$ 17; M: 38 $\pm$ 12; 410: 35 $\pm$ 17; M+Rv: 51 $\pm$ 23; Rv vs. M/410:  $p < 0,05$ ; Rv vs. M+Rv: NS). Al realizarse un esquema de estimulación similar con MDM de dadores sanos se observó que M es capaz de inhibir parcialmente la apoptosis inducida por Rv. Este no fue el caso para el pretratamiento con 410 (%MDM AV+IP- Rv: 50 $\pm$ 7; M: 20 $\pm$ 5; 410: 25 $\pm$ 5; M+Rv: 32 $\pm$ 6; 410+Rv: 56 $\pm$ 8; Rv vs. M+Rv:  $p < 0,05$ ; Rv vs. 410+Rv:  $p = 0,68$ ; Rv+M vs. Rv+410:  $p < 0,05$ ). TNF- $\alpha$  fue propuesto como mediador de la apoptosis inducida por Mtb. Sin embargo en nuestro sistema la menor producción de esta citoquina por M no sería la causa de la baja inducción de apoptosis ya que el agregado exógeno de rTNF- $\alpha$  no revierte esta característica (M: 9 $\pm$ 3; M+50ng/ml rTNF- $\alpha$ : 10 $\pm$ 3). Nuestros datos sugieren que la cepa M es capaz de manipular la respuesta inmune en dos puntos críticos: induce resistencia a la apoptosis y baja producción de TNF- $\alpha$  por mecanismos de señalización diferentes. Estas características podrían estar asociadas a su alta infectividad, ya que la cepa no próspera 410 no altera la sobrevivencia de los MDM frente a un estímulo pro-apoptótico.

**0599. (0727) EFICACIA DEL ESTÍMULO DE M. TUBERCULOSIS H37RV INACTIVADO (MTBI) Y FILTRADO DE CULTIVO DE M. TUBERCULOSIS (FC) EN LA SÍNTESIS DE NITRITOS POR CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN) Y NEUTRÓFILOS (PMN) DE PACIENTES TUBERCULOSOS (PTB).** DA Selenscig<sup>1</sup>, GL Fiorenza<sup>1</sup>, DJ Martinel Lamas<sup>1</sup>, MA Farroni<sup>2</sup>, CR Bogué<sup>2</sup>, DG Dlugovitzky<sup>1</sup>

*1 Sección Inmunología - Cátedra de Microbiología - Fac. Cs. Médicas - UNR, 2 Hospital I. Carrasco - Rosario*

Interesa investigar la idoneidad de las proteínas micobacterianas para estimular a las células inmucompetentes y su uso posterior en la fabricación de vacunas. Se estudió la eficacia de Mtb y FC para estimular la síntesis de nitritos por CMN y PMN

de PTB. Se evaluaron 20 PTB de ambos sexos y edades variables ( $35 \pm 14.5$  SD) del Hospital I. Carrasco y 12 sujetos normales (Co) con las mismas características de sexo y edad que PTB. Después del diagnóstico de tuberculosis (exámenes clín., radiol. y bacteriol.), se extrajo a los PTB 15 ml de sangre i.v para separar las poblaciones celulares. Se separaron las CMN y PMN a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque. Se vertieron  $5 \times 10^6$ /ml de CMN de PTB y Co resuspendidas en RPMI, en 6 tubos Basal (B) y Estimulado (E). Se colocó en los tubos B 250  $\mu$ l de CMN ( $5 \times 10^6$ /ml) más 5  $\mu$ l de RPMI 1640, en los tubos E1 250  $\mu$ l de CMN y 5  $\mu$ l Mtbi (conc.  $10^6$  de la Escala de Mc. Farland) y en los E2 250  $\mu$ l de CMN y 40  $\mu$ g/ml de FC. Los tubos B y E de PTB y Co se incubaron 20 horas a 37 °C. Se procedió igual con PMN. Se centrifugaron y separaron 250  $\mu$ l de sobrenadantes de cultivo (s.c), que se conservaron a -20 °C para las determinaciones de nitritos, utilizando el método de Griess. **Resultados:** Niveles de nitritos en s.c. de CMN y PMN, B y E con Mtbi y FC (N: 20) (X $\pm$ E.S). CMN: PTB: B:  $6.437 \pm 0.7117$ ; E c/ Mtbi:  $11.106 \pm 2.154$ ; E c/ FC:  $12.303 \pm 1$ . B vs E Mtbi:  $p < 0.05$ ; E Mtbi vs E FC: ns; B vs E FC:  $p < 0.01$ . Co (N: 12): B:  $9 \pm 1.489$ ; E c/ Mtbi:  $10.021 \pm 2.664$ ; E c/ FC:  $9 \pm 2.730$ . B TBP vs B Co: ns; E Mtbi TBP vs E Mtbi Co: ns; E FC TBP vs E FC Co:  $p < 0.003$ . PMN: PTB: B:  $10.969 \pm 2.233$ ; E c/ Mtbi:  $13.403 \pm 2.848$ ; E c/FC:  $58.887 \pm 7.316$ . Co: B:  $7.30 \pm 1.181$ ; E c/Mtbi:  $7.18 \pm 1.18$ ; E c/FC:  $8.811 \pm 2.38$ . B TBP vs B Co: ns; E Mtbi TBP vs E Mtbi Co:  $p < 0.05$ ; E FC TBP vs E FC Co:  $p < 0.02$ . Estos datos sugieren que Mtbi, y más aún los Ags proteicos de FC son eficaces para estimular la producción de nitritos por CMN y PMN en PTB, concepto de importancia en la preparación de vacunas.

**0600. (0310) FASCIOLISIS EXPERIMENTAL: INDUCCIÓN DE APOPTOSIS DE CÉLULAS PERITONEALES EN ESTADIOS TEMPRANOS DE LA INFECCIÓN.** L. Guasconi, MC Serradell, DT Masih

Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

*Fasciola hepatica* es un helminto cosmopolita que posee un ciclo de vida complejo, pudiendo afectar un amplio rango de mamíferos, incluyendo al hombre. Los productos de Excreción-Secreción (PES) que *F. hepatica* libera le permiten evadir la respuesta inmune y establecerse finalmente en canalículos biliares. Hasta el momento, cuantiosos reportes han descripto los fenómenos que ocurren durante etapas tardías de la infección, pero muy poco se conoce sobre la interacción entre el parásito y la inmunidad innata durante estadios tempranos de la misma, es por ello que decidimos evaluar el comportamiento de células peritoneales a tiempos tempranos post-infección. Se infectaron ratones Blab/c con 15 metacercarias de *F. hepatica* por vía oral. A las 48 horas posteriores a la infección se obtuvieron células peritoneales. Se realizaron tinciones con May-Grünwald Giemsa y Bromuro de etidio, en cuyo análisis por microscopía se pudo observar la presencia de células con características compatibles con apoptosis (disminución del tamaño celular, condensación de cromatina, fragmentación nuclear). Para corroborar y cuantificar lo observado por microscopía se realizó tinción con Ioduro de propidio en células fijadas y con Anexina V en células sin fijar, y se analizó por citometría de flujo. Observamos un aumento significativo ( $p < 0.000908$ ) en el porcentaje de células peritoneales con hipodiploidía, así como también un aumento significativo ( $p < 0.0032$ ) de células Anexina V positivas en los animales infectados con respecto a los controles. Los fenómenos aquí descriptos fueron evaluados sobre las diferentes poblaciones de células peritoneales, y pudimos observar que la población involucrada en los mismos se correlacionaría por tamaño y granularidad con Macrófagos. Los resultados encontrados estarían sugiriendo un nuevo mecanismo de evasión de la respuesta inmune durante estadios tempranos de la fasciolosis.

**0601. (0536) EFECTO DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTB) SOBRE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN IN VITRO DE MONOCITOS (MO) DE SANGRE PERIFÉRICA**

**A CÉLULAS DENDRÍTICAS (DC).** L Balboa<sup>1</sup>, M Romero<sup>1</sup>, N Yokobori<sup>1</sup>, LP Schierloh<sup>1</sup>, L Geffner<sup>1</sup>, R Musella<sup>2</sup>, E Abbate<sup>2</sup>, N Roldan<sup>2</sup>, S de la Barrera<sup>1</sup>, MC Sasiain<sup>1</sup>, M Alemán<sup>1</sup>

1 IIHema - Academia Nacional de Medicina, 2 Servicio de Neumología - Hospital Muñiz

Las DC son células presentadoras de antígenos (CPA) claves en la inmunidad contra micobacterias por lo que, alteraciones en el proceso de diferenciación de Mo a DC tendrían un impacto directo en la generación de la respuesta adaptativa. Recientemente demostramos que los pacientes con tuberculosis pulmonar (TB) generan en forma deficiente la población CD1a+/CD14- durante su diferenciación *in vitro*. La presencia de *Mtb* al inicio del proceso de diferenciación induce tanto en TB como en dadores sanos, una población CD1a-/CD14low/CD86high que no expresa DC-SIGN, receptor para *Mtb* característico de DC, con baja capacidad linfoproliferativa. El objetivo de este trabajo fue evaluar los mecanismos que ejerce el *Mtb* en la generación de dicha población de tipo macrófágica. Para esto, a partir de Mo de sangre periférica separados por adherencia se generaron *in vitro* DC, con IL-4 y GM-CSF durante 6 días sin estímulo inicial o en presencia de *Mtb* (relación 2:1 *Mtb*:Mo), IL-10 (20 ng/mL) o el ligando de TLR2, Pam3Cys (180 ng/mL). Posteriormente se determinó la expresión de CD1a, CD14, CD86, DC-SIGN, CD1b por citometría de flujo y la proliferación específica por medio de la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (18 hs) enfrentándose las CPA con linfocitos autólogos, durante 5 días a 37 °C. **Resultados:** La presencia de *Mtb* durante la diferenciación inhibe la expresión del CD1a, conservando la expresión de CD14 ( $p < 0.005$ ), mientras que Pam3Cys e IL-10 reproducen sólo parcialmente el efecto inducido por el *Mtb*. En particular, IL-10 resultó ser un fuerte inductor de CD14 ( $p < 0.05$ ). Pam3Cys e IL-10 no generan la población CD86high/DC-SIGN- característica del *Mtb*, pero sí reducen la capacidad de CPA ( $p < 0.05$ ). **Conclusión:** El efecto inhibitorio del *Mtb* sobre la diferenciación de Mo a DC estaría mediado en parte por la secreción de IL-10 y la activación de TLR2, generando a su vez CPA de fenotipo DC-SIGN-, sugiriendo un mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

**0602. (0803) ESTUDIO DE ANTIGENOS DE BACTERIAS ENTERICAS EN PACIENTES CON ARTRITIS REACTIVA: IDENTIFICACION DE LOS COMPONENTES ARTRITOGÉNICOS.** MG Lacoste<sup>1</sup>, DE Cargnelutti<sup>1</sup>, H Tamashiro<sup>2</sup>, MS Di Genaro<sup>1</sup>

1 Inmunología. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis, 2 CE.RE.CA

La Artritis Reactiva (ARe) es una inflamación articular aséptica, secundaria a una infección gastrointestinal o genitourinaria. Infecciones entéricas con *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* están asociadas a ARe. El objetivo fue evaluar en líquidos sinoviales (LS) de tres pacientes (P1, P2 y P3) con ARe la respuesta inmune contra diferentes preparaciones antigénicas de bacterias entéricas, a fin de identificar los componentes bacterianos más relacionados con la patología y la bacteria implicada, y definir el método más específico para su estudio. Se analizó la respuesta de IgA contra *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri* por ELISA y Western blot. Los antígenos utilizados fueron: lisado crudo (LC), proteínas de membrana externa (PME), fracción citosólica (FC), proteínas de sobrenadante de cultivo (SN), lipopolisacárido (LPS) y proteínas externas de *Yersinia* (Yops). La presencia de DNA bacteriano y HLA-B27 se investigó por PCR. Se ensayó proliferación de células mononucleares de sangre periférica y LS frente a los diferentes antígenos. En P1, la respuesta de IgA fue marcada contra antígenos de *Salmonella* (PME, LPS, SN y LC), y en P2 y P3 se destacó la respuesta contra antígenos de *Shigella* (en P2 contra SN y en P3 contra PME, LC y SN). Western blot de P1 fue positivo para *Salmonella*, observándose reacción contra siete PME (56-25 kDa), y de P2 y P3 para PME y SN de *Shigella*, destacándose la reacción contra una banda de 94 kDa en SN. Se observó respuesta proliferativa sólo en presencia de LC de *Salmonella* en P1. No se detectó DNA

bacteriano en ninguna de las muestras. HLA-B27 fue positivo en P3. Concluimos que proteínas de SN y PME son los antígenos bacterianos mas inmunogénicos en ARe por *Salmonella* y *Shigella*. Western blot sería la metodología indicada para identificar la bacteria implicada. Estos resultados contribuirían a conocer los antígenos en ARe y a diseñar métodos de diagnóstico para la identificación de la bacteria asociada.

**0603. (0640) LAS PROTEÍNAS OMP16 Y OMP19 DE BRUCELLA SPP.: DOS NUEVOS CANDIDATOS PARA UNA VACUNA ORAL CONTRA LA BRUCELOSIS.** KA Pasquevich<sup>1</sup>, L Coria<sup>1</sup>, SM Estein<sup>2</sup>, C García Samartino<sup>1</sup>, A Zwerdling<sup>1</sup>, H Warzecha<sup>3</sup>, CA Fossati<sup>1</sup>, GH Giambartolomei<sup>1</sup>, J Cassataro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA). Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas (UBA), <sup>2</sup> Laboratorio de Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro Pcia. Bs.As. Tandil, <sup>3</sup> Darmstadt University of Technology. Institute of Botany. Darmstadt. Alemania

Previamente hemos demostrado que las lipoproteínas de *Brucella* spp. Omp16 y Omp19 carentes de su dominio lipídico (U-Omp16 y U-Omp19), inoculadas por vía intraperitoneal, inducen protección frente a la infección con *B. abortus* sin el agregado de adyuvantes. Siendo la vía oral una de las principales vías de contagio de la brucelosis, se decidió estudiar si Omp16 y Omp19 son capaces de conferir protección contra *B. abortus* al ser inoculadas por esta vía, y además el rol del dominio lipídico en la protección. Para ello, se inocularon ratones BALB/c con U-Omp16, U-Omp19 u Omp19 lipídica (L-Omp19) con o sin adyuvante (toxina colérica) por vía oral. Como control se inocularon animales con PBS o con *B. abortus* RB51 (cepa vacunal). Se desafiaron los ratones con *B. abortus* 2038 (cepa virulenta) por vía oral y luego se evaluó la protección conferida por recuento de las UFC en los bazos. Tanto U-Omp16 como U-Omp19 con o sin adyuvante confirieron protección significativa contra *B. abortus*, los recuentos de UFC en los bazos fueron 10,71 y 9,33 veces menores respecto al recuento en los bazos de los ratones inoculados con PBS; los niveles de protección conferidos fueron similares ( $p > 0.05$ ) a los inducidos con *B. abortus* RB51. L-Omp19 y U-Omp19 no difirieron en el grado de protección conferido, indicando que la porción lipídica no estaría implicada en la respuesta protectora inducida. En todos los casos, excepto en el grupo vacunado con U-Omp19, se detectó IgG específica en el suero de los animales, presentando los mayores títulos el grupo vacunado con L-Omp19. Nuestros resultados indican que U-Omp16 y U-Omp19 tienen actividad adyuvante intrínseca para inducir una respuesta protectora a nivel de mucosas. Esto las convierte en candidatas para una vacuna oral expresada en plantas transgénicas. Por ello se obtuvieron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgénicas que expresan estas proteínas recombinantes y se está evaluando su inmunogenicidad y capacidad protectora.

**0604. (0099) MODIFICACIÓN EN LOS NIVELES DE LAS SUBPOBLACIONES TCD8 EN NIÑOS HIV(+) POR ACCIÓN DE LA TERAPIA HAART.** J Balbaryski, M Candi, G Barboni, S Raiden, H Quiroz, C Cantisano, E Gaddi

Hospital General de Niños Pedro de Elizalde. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Durante el desafío antigénico por el HIV los LTCD8 naive sufren cambios en la expresión de moléculas de superficie, en sus propiedades migratorias y proliferativas, adquieren funciones efectoras y algunos se transforman en células de memoria. El tratamiento HAART al disminuir la carga viral de HIV permitiría la normalización cuantitativa y funcional de las células citotóxicas. Los TCD8 naive (N), de memoria central (MC) y efectora (ME) fueron evaluados en 20 niños HIV(+) vírgenes de tratamiento y luego de 12 meses, en promedio, del inicio del HAART, 4 en el estadio E1(CD4>25%), 9 en E2 (CD4:15-25%) y 7 en E3 (CD4<15%). Se utilizaron Acs Mo anti CD45, CD45RA, CD3, CD14, CD27, CD4 y CD8. Marcación similar fue ensayada en 15 niños sanos HIV(-)

(Co). Los porcentajes de los TCD8 totales previos al tratamiento difirieron en forma significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo Co y los 20 niños HIV(+) (TCD8Co:22.8± 1.7, TCD8 HIV(+):49.1±12.3). Los niveles de los TCD8N de los niños HIV(+) aumentaron significativamente entre los dos momentos del seguimiento (TCD8Npre: 25.1±11.2, TCD8Npost: 37.2±7.2), mientras que los TCD8MC y TCD8ME si bien disminuyeron entre ambos momentos, la diferencia no fue significativa. Previo al HAART los niveles de TCD8N del grupo Co mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con los pacientes HIV(+) de los grupos E1, E2 y E3 (TCD8NCo: 52.8±11.2, E1:36.5±8.1, E2:21.9±3.4, E3:19.5±6.3). En la determinación intratratamiento las diferencias con respecto al Co no fueron significativas E1:42.2±16.9, E2:31.2±13.4, E3:42.7±13.8). Se obtuvieron correlaciones positivas entre los niveles de TCD4 y TCD8N antes y durante el tratamiento con HAART (TCD4/TCD8N pre: r:0.69,  $p < 0.05$ ; TCD4/TCD8N post: r:0.51,  $p < 0.05$ ). La falta de significancia con respecto al grupo control en los niveles de los TCD8N y la tendencia a la disminución de los subsets TCD8 MC y ME luego de un tiempo de tratamiento indicaría la progresiva normalización en la dinámica celular atribuible al HAART.

## PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR II

**0605. (0065) VÍAS APOPTÓTICAS INVOLUCRADAS EN LA ACCIÓN ANTITUMORAL DE UN PÉPTIDO CÍCLICO DEL INTERFERÓN-ALFA2B.** VC Blank, C Peña, LP Roguin

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

En estudios previos caracterizamos un péptido químérico cíclico (PQC) del interferón- $\alpha 2b$  (IFN- $\alpha 2b$ ) que simula la región de la citoquina que se une a sus receptores e induce apoptosis en células WISH. Con el propósito de investigar los mecanismos moleculares responsables de la acción apoptótica del PQC, se evaluó la activación de las caspasas 3, 8 y 9. Luego de incubar las células WISH durante 72 h con IFN- $\alpha 2b$  o PQC se observó un incremento de un 90% y 50%, respectivamente, en la actividad de caspasa 3, y un aumento de la actividad de las caspasas 8 y 9 (caspasa 8: 1.5 ± 0.1, IFN- $\alpha 2b$  y 1.6 ± 0.1, PQC; caspasa 9: 1.6 ± 0.3, IFN- $\alpha 2b$  y 1.7 ± 0.3, PQC). También se determinó el porcentaje de hipodiploidía en presencia de inhibidores de caspasas 8 y 9. Después de tratar las células por 72 h con IFN- $\alpha 2b$  se obtuvo un 28% de apoptosis. Este valor disminuyó ~30% al añadir inhibidores de caspasas. Cuando las células se incubaron con PQC e inhibidores, la población de células hipodiploides se redujo ~20-40%. Además, por ensayos de Western Blot se evaluó la expresión de los receptores Fas (FasR) y TRAIL y del ligando Fas (FasL) luego de incubar las células durante 48 h con IFN- $\alpha 2b$  o PQC. Los resultados mostraron un incremento de la expresión de FasR tanto en presencia de IFN- $\alpha 2b$  como de PQC (2,1 ± 0,9, IFN- $\alpha 2b$  y 3,8 ± 0,9, PQC), mientras que no se observaron cambios en la expresión de TRAIL o FasL. Cuando se estudió el efecto de un anticuerpo monoclonal neutralizante de FasR sobre la acción antiproliferativa de IFN- $\alpha 2b$  y PQC, se observó que la actividad de PQC disminuyó ~20%, mientras que no se alteró la acción del IFN- $\alpha 2b$ . Los resultados sugieren que la apoptosis inducida por IFN- $\alpha 2b$  o PQC está mediada por la activación tanto del receptor Fas como de la vía mitocondrial. El efecto diferencial del bloqueo del FasR sobre la acción antiproliferativa del PQC y del IFN- $\alpha 2b$ , sugiere una mayor relevancia de la vía del receptor Fas en la acción antitumoral del derivado peptídico.

**0606. (0709) EFECTO DIFERENCIAL DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS SOBRE CÉLULAS EN ETAPA DE DIFERENCIACIÓN ERITROIDE.** D Vota, ME Chamorro, M Callero, A Nesse, D Vittori

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

La anemia de enfermedades crónicas se encuentra asociada a procesos inflamatorios caracterizados por la producción aumen-

tada de citoquinas proinflamatorias. En trabajos previos hemos demostrado que la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  induce apoptosis de células K562 cuando se encuentran en etapa de diferenciación eritroide. El objetivo del presente trabajo es investigar si la IL-1 $\beta$  produce el mismo efecto y avanzar en el estudio de los mecanismos de acción de ambas citoquinas sobre células diferenciadas. La hemina (H) 30  $\mu$ M resultó ser un buen inductor de diferenciación eritroide, determinada por recuento diferencial con tinción por DAF (57,0 $\pm$ 5,6%, 48 h), proceso que no fue afectado por TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . La IL-1 $\beta$  produjo, al igual que el TNF- $\alpha$  un efecto diferencial sobre la línea celular K562. Mientras que la IL-1 $\beta$  (30-100  $\mu$ g/ml) incrementó la apoptosis (Hoechst) de células diferenciadas, no afectó a las indiferenciadas (H-IL 20,3 $\pm$ 1,8%, IL 9,3 $\pm$ 1,8%; P<0.05, n=3). Se corroboró que los efectos observados fueron causados por la acción de la citoquina y no por la hemina (H-IL 20,3 $\pm$ 1,8%, H 11,0 $\pm$ 1,8%; P<0.05, n=3). Los resultados de la actividad de caspasa 3 (clivaje de Ac-DEVD-pNA) en tratamientos con TNF- $\alpha$  o con IL-1 $\beta$  concuerdan con los obtenidos por la técnica de Hoechst, confirmando la inducción de apoptosis vía caspasas. La diferenciación eritroide fue acompañada de una significativa disminución de los niveles de ARNm de c-FLIP, proteína supresora de señales apoptótica, determinados por Real Time PCR (H 1,23 $\pm$ 0,04 vs. C 0,77 $\pm$ 0,04 u. a., P<0.001, n=4). Se puede concluir que el proceso de diferenciación eritroide aumenta la sensibilidad de las células K562 a la acción proapoptótica de distintas citoquinas producidas durante el proceso inflamatorio. La disminución de la expresión de c-FLIP explicaría el efecto atribuido a TNF- $\alpha$  y a IL-1 $\beta$  en presencia de H, sugiriendo la participación de c-FLIP en los mecanismos de la acción de las citoquinas proinflamatorias.

**0607. (0707) ESTUDIO POR MICROARRAYS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA SEÑAL DE SUPERVIVENCIA MEDIADA POR GLUCOCORTICOIDES EN EL EPITELIO MAMARIO IN VIVO.** E Hoijman<sup>1,2</sup>, EC Kordon<sup>1</sup>, S Kalko<sup>3</sup>, A Pecci<sup>1,2</sup>

1 IFIBYNE-CONICET, 2 Depto de Qca Biológica, FCEN-UBA, Buenos Aires, 3 IDIBAPS, Hospital Clínico, Barcelona, España

La administración de glucocorticoides in vivo previene la apoptosis del epitelio mamario durante la involución post-lactancia. Sin embargo, se desconoce el mecanismo utilizado. El objetivo de este trabajo fue identificar genes que respondan a glucocorticoides durante la prevención de la involución. Ratones hembra de la cepa BALB/c fueron separados de sus crías en el día 5 de la lactancia para inducir la involución. A las 0, 24 y 48 horas luego del destete, se aplicó una inyección subcutánea de Dexametasona 0.5 mg/100g de masa corporal o vehículo. 24 horas después de la última inyección, se extrajo la glándula mamaria N<sup>o</sup>4, y se preparó ARN total. El transcriptoma fue analizado mediante el uso del microarray "Affymetrix oligonucleotide GeneChip Mouse Genome 430 2.0" y los valores de expresión fueron calculados por RMA. El análisis con el software limma de Bioconductor indicó que 492 genes estaban expresados diferencialmente entre las dos condiciones experimentales. 137 fueron inducidos y 355 reprimidos por la dexametasona (entre 1.5 y 32.8 veces de inducción y entre 1.5 y 8.3 veces de represión). La búsqueda de términos de ontología genética sobrerrepresentados realizada con el software EASE, mostró como categoría más relevante la de "supresor de tumores", incluyendo 5 genes reprimidos por los glucocorticoides. La modulación de 14 de los genes regulados diferencialmente fue validada por RT-PCR en tiempo real. El efecto de los glucocorticoides podría ser directo sobre las células epiteliales, ya que algunos de estos genes fueron modulados por la dexametasona en la línea celular de epitelio mamario HC11. Un gen candidato que fue regulado in vivo e in vitro, es el inhibidor del ciclo celular p21. Los glucocorticoides redujeron los niveles de expresión del ARNm de p21 a la mitad. Este trabajo permite postular a este y otros genes estudiados como mediadores del efecto antiapoptótico de los glucocorticoides en la glándula mamaria.

**0608. (0021) MECANISMO DE ACCIÓN DE PROGESTERONA SOBRE LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES VASCULARES.** P Cutini<sup>1,2</sup>, V Masheimer<sup>1,2</sup>

1 Cátedra de Análisis Clínicos II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, 2 CONICET

La disfunción endotelial ocurre en una fase temprana de la generación de la lesión ateromatosa, viéndose comprometida la función arterial. Frente a una injuria, el endotelio responde a través de cambios entre otros en la migración y proliferación celular y en la síntesis de compuestos vasoactivos. El riesgo de aterosclerosis se incrementa en mujeres posmenopáusicas, período en el cual declinan los niveles circulantes de estrógenos y progesterona (Pg). En el presente trabajo nos propusimos investigar el mecanismo de acción por el cual, Pg regula la proliferación y la migración de células endoteliales (CE) obtenidas por cultivo primario a partir de explantes de anillos aórticos de ratas Wistar. Empleamos la técnica de incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en cultivos sincronizados. El estudio dosis respuesta revela que 24 h de tratamiento con Pg inhibe significativamente la síntesis de DNA en todo el rango de concentraciones ensayadas (1-100nM), siendo máxima la inhibición con 10nM Pg (185.4 $\pm$ 21.8 vs 68.6 $\pm$ 6.7 cpmx10<sup>3</sup>/mg prot, control vs Pg, respectivamente; p<0.02). Este efecto antiproliferativo desaparece luego de 48 y 72 h de cultivo. Ya que previamente hemos mostrado que Pg activa en forma no genómica el sistema PLC/PKC, estudiamos la participación de PKC en la acción de Pg sobre la proliferación. Empleando un inhibidor de esta enzima (Chelerythrine) vimos que se anula el efecto del esteroide (185.0 $\pm$ 18.6 vs 86.9 $\pm$ 11.3; 116.8 $\pm$ 15.2 vs 119.8 $\pm$ 2.4 cpmx10<sup>3</sup>/mg prot, control vs 10nM Pg -/+ Chel. (1  $\mu$ M), 24 h, p<0.001). Demostramos también que el efecto inhibitorio de Pg sobre la proliferación celular es abolido por el antagonista del receptor de Pg RU486 (53% vs 3% de inhibición, Pg vs Pg+RU486 (10nM), p<0.001). En ensayos de migración celular observamos que Pg estimula significativamente la migración de CE (115% s/control, p<0.05). Concluimos que la hormona inhibe la proliferación y estimula la migración de CE a través de un mecanismo en el que participarían PKC y el receptor de Pg.

**0609. (0364) LA INTERACCIÓN ENTRE VMP1 Y BECLIN 1 ES NECESARIA PARA LA FORMACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA.** D Grasso, A Ropolo, R Pardo, MI Vaccaro

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

VMP1 es una proteína de membrana caracterizada por su fuerte expresión durante la pancreatitis. VMP1 es necesaria en la autofagia, y su expresión induce la formación de autofagosomas. Beclin 1 participa en los primeros eventos moleculares de la autofagia. El objetivo de nuestro trabajo fue demostrar que VMP1 interacciona con Beclin 1 para promover autofagia. En modelos celulares utilizando proteínas fluorescentes mostramos que VMP1-EGFP colocaliza con CFP-Beclin 1 y RFP-LC3, un marcador específico de autofagosomas. Esto sugiere que Beclin 1 se localiza en las vacuolas inducidas por VMP1. En ensayos "pull-down" con lisados de células HeLa expresando VMP1-His<sub>6</sub>, se detectó Beclin 1 en los eluatos. En los mismos lisados, el anticuerpo para Beclin 1 precipitó VMP1. Estos resultados indican una interacción entre VMP1 y Beclin 1. En células sometidas a ayuno y tratadas con rapamicina para inducir autofagia, ambas proteínas endógenas inmunoprecipitaron, indicando que la interacción VMP1-Beclin 1 tiene relevancia fisiológica. Utilizando proteínas recombinantes encontramos que el dominio carboxilo-terminal (Atg) de VMP1 interacciona con Beclin 1. Mediante una delección específica, se obtuvo un plásmido de expresión de la proteína deficiente en el dominio Atg (VMP1<sup>ΔAtg</sup>). Comprobamos que, si bien VMP1<sup>ΔAtg</sup> es también una proteína trans-membrana, ésta no fue capaz de retener a Beclin 1 en el ensayo "pull-down". Por otro lado, la expresión de VMP1<sup>ΔAtg</sup> no indujo reclutamiento de Beclin 1 ni de LC3, probando que la mutante no es capaz de inducir autofagia. Final-

mente, estudios utilizando un modelo de pancreatitis experimental permitieron comprobar que VMP1 y Beclin 1 colocalizan *in vivo* en los autofagosomas. En conclusión, la interacción VMP1-Beclin 1 a través del dominio Atg de VMP1 es esencial para la formación del autofagosoma. Proponemos que VMP1 interactúa con Beclin 1 para promover el proceso autofágico y que esta interacción tendría relevancia fisiopatológica.

**0610. (0400) EL AUMENTO DE MTNOS CONTRIBUYE AL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ENVEJECIMIENTO.** DP Converso, DM Levisman, MC Carreras, JJ Poderoso

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

El proceso de envejecimiento se debe a un aumento en la producción de radicales libres junto a una pérdida de las defensas antioxidantes. Por otra parte se sabe que el óxido nítrico (NO) tiene una importante acción sobre la función mitocondrial, y que son estas organelas las mayores productoras de radicales en las células. Con esto presente se quiere establecer si un aumento de NO en la mitocondria durante el envejecimiento contribuye a este proceso, como se regula dicho aumento y cual sería su efecto sobre las células. Se utilizó hígado de ratas Wistar de 3 (C) y 24 (O) meses. Se midió la actividad de óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) por conversión de [H<sup>3</sup>L-Arg a [H<sup>3</sup>L-Cit, observándose un aumento del 100% a los 24 meses (C:24+3 vs O:44+6 pmoles/min.mgprot, p<0.05), acompañado por un incremento en la expresión de la enzima. Ese hecho concuerda con la disminución a los 24 meses en la expresión de hemoxigenasa I, enzima que regula negativamente a la mtNOS. La funcionalidad mitocondrial se evaluó mediante la actividad de los complejos de la cadena respiratoria, seguida por reducción u oxidación de citocromo c. Se observó una pérdida de actividad del 40% (C:341+48 vs O:203+19 nmoles/min.mgprot, p<0.05) en el complejo I-III. Así mismo, la actividad de la superóxido dismutasa (MnSOD) mitocondrial se encontró disminuida a los 24 meses (C:1394+95 vs O:921+11 pmoles/min.mgprot, p<0.05). Estos hallazgos contribuyen al aumento de anión súper óxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), el cual se puede combinar con NO produciendo peroxinitrito (ONOO) capaz de nitrar proteínas. Mediante western blot se observó un aumento en la nitración de proteínas mitocondriales en los animales añosos, identificándose la nitración del complejo I y de MnSOD. Con estos resultados se concluye que en el envejecimiento hay un aumento en la producción de NO y O<sub>2</sub><sup>-</sup> que no puede ser revertido por las defensas antioxidantes, favoreciendo la formación de ONOO- que modifica a proteínas mitocondriales perdiendo funcionalidad.

**0611. (0482) DIFERENTES DOMINIOS DE P21 REGULAN LA REPLICACIÓN Y PROCESOS RELACIONADOS A LA REPARACIÓN DEL ADN LUEGO DE IRRADIACIÓN UV.** G Soria<sup>1</sup>, J Speroni<sup>1</sup>, O Podhajcer<sup>1,2</sup>, C Prives<sup>3</sup>, V Gottifredi<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica. Fundación Instituto Leloir- CONICET, Buenos Aires, Argentina, 2 Laboratorio de Terapia Celular y Molecular. Fundación Instituto Leloir- CONICET, Buenos Aires, Argentina, 3 Dept of Biological Sciences, Columbia University, New York, USA*

Mientras que diversos tratamientos de estrés genotóxico inducen la acumulación de p21, provocando arresto del ciclo celular, la irradiación UV promueve la proteólisis de p21. El significado biológico de éste fenómeno aún no es claro, pero podría estar ligado a procesos relacionados con la reparación del ADN. Aunque el rol de p21 en la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) es controversial, dos reportes recientes sugieren su participación en la Síntesis de ADN por Translesion (TLS), un proceso que evita el bloqueo de la horquilla durante la replicación de ADN dañado en la fase S. El primero, revela que la ubiquitinación de PCNA, una modificación post-traduccional de PCNA relevante para TLS, requiere la degradación de p21. El otro, demuestra que células p21<sup>-/-</sup> presentan mutagénesis elevada asociada a

TLS. En este trabajo, estudiamos el efecto de p21 sobre diferentes procesos orquestados por PCNA, tales como la replicación de ADN, NER y TLS. Encontramos que el dominio de p21 de unión a CDKs es el único responsable del arresto del ciclo celular en células no tratadas; mientras que, ni el dominio de unión a CDKs ni el de unión a PCNA son capaces de bloquear las etapas tempranas o tardías de NER. Además, observamos que la interacción de p21 con PCNA inhibe el reclutamiento de la polimerasa de TLS, pol $\eta$ , a los focos de PCNA luego UV. Este bloqueo del acceso de pol $\eta$  a las horquillas atascadas se correlaciona con acumulación del marcador de daño al ADN,  $\gamma$ H2AX, y con aumento de apoptosis luego de UV. En conjunto, nuestros datos refuerzan el vínculo entre la degradación de p21 luego de UV y la eficiencia de TLS. Este efecto de p21 sobre la actividad de pol $\zeta$  sería también de importancia en otros escenarios biológicos, dado que varios trabajos recientes sugieren la participación de esta polimerasa en procesos celulares como conversión génica, recombinación homóloga y modulación de la respuesta celular a agentes quimioterapéuticos.

**0612. (0553) DEHIDROLEUCODINA INHIBE LA EXPRESIÓN DE CICLINA B1 EN CÉLULAS HELA.** VV Costantino, MV Bertoldi, LA López

*Instituto de Histología y Embriología IHEM-CONICET. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza.*

Dehidroleucodina (DhL) es una lactona sesquiterpénica aislada y purificada de la hierba medicinal Artemisia douglasiana. **Resultados** de nuestro laboratorio mostraron que DhL retrasa la proliferación de células Meristemáticas de raíces de la Allium cepa y de células de músculo liso vasculares. En ambos tipos celulares DhL arresta las células en la fase G2. El objetivo de este trabajo es analizar si DhL es capaz de inhibir la proliferación de células tumorales y analizar proteínas del ciclo celular que pueden ser afectadas. Para ello se utilizaron células HeLa en cultivo. Metodología: 1x10<sup>4</sup> células HeLa en quiescencia por 24 h fueron estimuladas con 10% de SFB en presencia de 0-4  $\mu$ M de DhL por 96 h. Se determinó el índice de crecimiento (IC  $\pm$  ESM) cada 24 h y los resultados fueron analizados por el test de la Varianza. Para el análisis de proteínas del ciclo celular se realizó western blot utilizando anticuerpos específicos. **Resultados:** A las 96 h de cultivo el control (0  $\mu$ M de DhL) presentó un IC de 11,8  $\pm$  0,48, con 1  $\mu$ M de DhL 8,3  $\pm$  0,52, con 2  $\mu$ M 8,03  $\pm$  0,21, con 3  $\mu$ M 6,3  $\pm$  0,74, y con 4  $\mu$ M 2,3  $\pm$  0,09. El análisis estadístico indicó diferencia significativa entre el control y los tratamientos con 2, 3 y 4  $\mu$ M DhL, a su vez mostró diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3  $\mu$ M con respecto a 4  $\mu$ M. El western blot de las proteínas mostró una significativa reducción de los niveles de Ciclina B1 en las células tratadas con 4  $\mu$ M de DhL. De estos resultados se desprende que DhL es muy efectiva en inhibir la proliferación de las células HeLa y posiblemente esté arrojando a las células en la fase G2.

## ONCOLOGÍA VII

**0613. (0321) PROGRESIÓN Y TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD (TLE) DE PACIENTES CON CÁNCER DE VÉJIGA (CAV) EN RELACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE (iNOS) Y RECEPTORES ACTIVADORES DE LA PROLIFERACIÓN DE PEROXISOMAS GAMMA (PPARG).** E Sandes, C Lodillinsky, R Cwrenbaum, L Marino, L Giménez, A Casabe, AM Eijan

*Instituto de Oncología "Angel H Roffo" - UBA*

El CaV se clasifica por el grado histológico en GI-GII y GIII-GIV y según la invasión en superficiales e invasores, estos últimos de peor pronóstico. Hemos demostrado por western blot que la expresión de iNOS, enzima productora de óxido nítrico, es marcador independiente de recurrencia tumoral en CaV. PPARG

son receptores nucleares que regulan la expresión de iNOS y están asociados con la diferenciación celular. **Objetivo:** estudiar por inmunohistoquímica la expresión y localización de iNOS y de PPARg en CaV humanos y correlacionarlo con G, invasión y TLE. Se analizó PPARg en 52 cortes histológicos: 20 invasores y 32 superficiales (16 GI-II y 16 GIII-IV) y la iNOS en 36 muestras: 10 invasores y 26 superficiales (11 GI-II y 15 GIII-IV). **Resultados:** El 72% (26/36) de las muestras expresan iNOS: localización citoplasmática 11/36 y nuclear 15/36. La expresión nuclear fue menor en superficiales GI-II: 9% (1/11), que en GIII-IV: 47%(7/15) o en invasores: 70% (7/10)  $X^2 p=0,0494$  y  $p=0,0067$  respectivamente. Vemos disminución de la expresión citoplasmática asociado con peor pronóstico: superficial GI-II: 45% (5/11), GIII-IV: 27% (4/15) e invasores: 20% (2/10). El 69% de los CaV presentan expresión nuclear de PPARg. Hay disminución del número de muestras con expresión alta de PPARg (>40% células +) asociado a peor pronóstico 80, 44 y 42% para superficiales GI-II, GIII-IV e invasor respectivamente. Cuando el diagnóstico es superficial GI-II y PPARg negativo existe un Riesgo Relativo de presentar TLE < 24 meses de 6, vs los PPARg positivos ( $p=0.0238$ , Fisher). **Conclusiones:** los tumores más agresivos muestran aumento de la localización nuclear de iNOS con disminución de la citoplasmática junto con disminución del número de células que expresan PPARg. La ausencia de PPARg en tumores superficiales se asocia a menor TLE. La iNOS nuclear podría generar NO con capacidad mutagénica y la disminución de PPARg alteraría la diferenciación celular promoviendo un fenotipo más agresivo.

**0614. (0464) RECEPTORES DE ESTRÓGENO ALFA ACTIVADOS EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS, SU FUNCIÓN EN EL CRECIMIENTO TUMORAL.** S Giulianelli, R Soldati, C Lanari

*Instituto de Biología y Medicina Experimental*

Los receptores de estrógeno alfa (REa) juegan un papel importante en la regulación del crecimiento del cáncer de mama. En carcinomas mamarios murinos que expresan REa y receptores de progesterona (RP) demostramos que el 17- $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y los antiprogéstágenos (RU486) inhiben el crecimiento tumoral. Paradójicamente, el antiestrógeno puro ICI 182780 (ICI) tuvo el mismo efecto. Postulamos que los REa son necesarios para el crecimiento tumoral porque a) inducen la síntesis de RP o b) interactúan con el RP. Con el objetivo de discernir entre ambas hipótesis evaluamos en tumores C4-HD y C4-HI: a) el nivel de fosforilación del REa en pSer118 y pSer167; b) el efecto del bloqueo de REa sobre la expresión de RP y la incorporación de  $^3H$ -timidina; c) la interacción de REa y RP a nivel nuclear. Por inmunohistoquímica, Western blot e inmunofluorescencia (IF) de tumores HD creciendo con MPA, y HI, demostramos alta expresión de pSer118 y pSer167. Los resultados fueron similares en cultivos primarios de células epiteliales creciendo en ausencia de MPA (estado de quiescencia) y en presencia de MPA (estado proliferativo), indicando que la activación de REa no es suficiente para estimular la proliferación. El tratamiento con ICI (1  $\mu M$ ) o con RNAi-REa disminuyó los niveles de REa y no afectó los de RP evaluados por Western blot. Sin embargo, hubo una disminución de la proliferación celular inducida por MPA (ICI 0.5  $\mu M$   $p<0,001$ ; RNAi-REa; HD 33.5 $\pm$ 2.1%, HI 35.15 $\pm$ 11.5% de inhibición  $p<0,05$ ). Estudios de co-inmunoprecipitación (tumores) y de microscopía confocal (IF, en tumores y en cultivos), sugieren una interacción nuclear de ambos receptores. Los resultados demuestran que la activación de REa es insuficiente para el crecimiento tumoral. La interacción física entre ambos receptores a nivel nuclear, parecería como un mecanismo novedoso en la proliferación mediada por RP en este modelo.

**0615. (0590) FACTORES GENÉTICOS Y AMBIENTALES EN CÁNCER DE MAMA/OVARIO.** AR Solano<sup>1</sup>, G Aceto<sup>2</sup>, I Neuman<sup>1</sup>, A Marchetti<sup>2</sup>, S Veschi<sup>3</sup>, A Morgano<sup>3</sup>, M Lombardi<sup>4</sup>, S Salvatore<sup>2</sup>, JP Anchezar<sup>5</sup>, RD Chacon<sup>6</sup>, SA Puparelli<sup>6</sup>, L Lugo<sup>7</sup>, F Buttitta<sup>2</sup>, P Battista<sup>3</sup>, A Cama<sup>3</sup>, R Mariani-Costantini<sup>3</sup>, EJ Podesta<sup>1</sup>

1 Laboratorio HRDC, Depto de Bioquímica, Fac de Medicina, UBA, 2 CRC-Unit of Molecular Pathology CeSI, University of Chieti, Italy, 3 Unit of Molecular Pathology and Genomics, 4 Svcio de Oncología, Htal de Niños "Dr. R. Gutiérrez", 5 Svcio de Patología Mamaria, Htal de Clínicas, 6 Instituto Alexander Fleming, 7 Svcio de Oncología, Htal Italiano de Bs As

El objetivo de la presentación es analizar los factores genéticos, ambientales y somáticos hallados en pacientes con cáncer de mama (CaM) diagnosticado a edad temprana sin selección por la historia familiar de cáncer. El CaM es una de las principales causas de muerte en la mujer, siendo la Argentina el país con una incidencia dentro de las más altas. El CaM es frecuente luego de los 50 años de vida, sin embargo existen evidencias de aparición temprana de CaM (<40 años) tan joven como a los 12 años. Las causas más conocidas son las genéticas (se estima, según los autores en distintas poblaciones, que del 5 al 7% de la población con CaM es hereditario y de ellos el 70% presentan mutaciones en los genes BRCA1-2) y ambientales. Hemos analizado 18 pacientes con CaM <40 años por PCR y secuenciación directa de los exones de los genes BRCA1-2 y p53 en ADN extraído de sangre periférica; los tacos parafínicos de tumor se analizaron por PCR y por inmunohistoquímica. Se encontró 44.4% de las pacientes <40 años con alteraciones germinales en algunos de los genes y 66.6% en <25 años. Analizadas causas ambientales como el virus del papiloma humano (HPV), en las pacientes con CaM antes de los 25 años se ha detectado HPV 16/18 de alto riesgo en sangre y en tumor (y en uno de los casos en la metástasis). Además en el análisis histológico se detectaron las proteínas oncogénicas E6 y p16; 2 de estas pacientes además presentaron mutación germinal en p53 (codón 72). **Concluimos:** 1) las mutaciones en BRCA1-2 en pacientes con CaM <40 años y <25 años es 8 y 12 veces, respectivamente, más frecuente que en la población general. 2) Ello indica la necesidad de evaluar la indicación del estudio genético en las pacientes jóvenes. 3) La presencia de HPV en adolescentes podría estar indicando una coadyuvancia entre factores ambientales y genéticos. Además la presencia de HPV puede contribuir a diseñar campañas de prevención en este tipo de enfermedad de aparición muy temprana.

**0616. (0372) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD METASTÁSICA DE TUMORES QUE HAN REVERTIDO LA RESISTENCIA A MIFEPRISTONA (MIF) IN-VIVO Y ESTUDIO DE LA RESPUESTA HORMONAL IN-VITRO DE LA VARIANTE RESISTENTE AL ANTIPROGESTÁGENO.** V Wargon, M Gorostiaga, J Bolado, C Lanari

*IByME*

A partir de un carcinoma mamario murino hormono-independiente (C4-HI) sensible al tratamiento con Mif, desarrollamos por presión selectiva, una variante resistente (C4-HIR) que es más metastásica y expresa menores niveles del receptor de progesterona A (RPA) y del receptor de estrógenos alfa (REa) que la variante parental C4-HI. El fenotipo resistente pudo ser revertido, generándose una nueva variante tumoral: C4-HIRrev, que recuperó la expresión de RPA y REa. El objetivo de este trabajo es a) evaluar el papel de los fibroblastos asociados a tumor (CAF) en la hormono-resistencia, b) evaluar si el fenotipo metastásico puede revertirse, c) estudiar la activación de Akt (p-Akt) y Erk, (p-Erk) en las tres variantes tumorales. Se realizaron cultivos primarios purificados de células epiteliales (EPI) o de CAF de C4-HI y C4-HIR y co-cultivos de los mismos tumores o combinados. Curiosamente C4-HIR y C4-HI fueron inhibidos por Mif en forma similar y los CAF C4-HIR no confirieron resistencia al cultivo de EPI C4-HI. Estos resultados correlacionaron con la expresión similar de RP y RE en células en cultivo de ambos tumores, sugiriendo que el cultivo en plástico regula la expresión de los receptores hormonales. Por otro lado, el porcentaje de metástasis axilares de C4-HIRrev fue similar al de C4-HIR, y superior al de C4-HI ( $p<0,05$ ), al igual que los niveles de MMP-9. Además, por *western-blot* se observó que la expresión de p-Akt fue mayor ( $p<0,05$ ) en

C4-HI que en C4-HIR y C4-HIRrev; y con p-Erk se obtuvo lo contrario. Estos resultados sugieren que, mientras la resistencia hormonal es un fenómeno reversible, la adquisición de un fenotipo más agresivo es un camino unidireccional. La pérdida de la resistencia hormonal en cultivo, no restaurada por co-cultivo con CAF C4-HIR, sugiere que otros factores del microambiente tumoral serían responsables de inhibir *in-vivo* la expresión de RPA en el tumor C4-HIR.

**0617. (0188) ANALISIS DE DELECCIONES EN GENES RELACIONADOS CON CANCER DE COLON HEREDITARIO POR LA METODOLOGIA MOLECULAR CUANTITATIVA MLPA.**

L Gomez<sup>1</sup>, D Marseze<sup>1</sup>, J Adi<sup>2</sup>, D Bertani<sup>2</sup>, A Vargas<sup>3</sup>, G De Marchi<sup>1</sup>, M Roqué<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Biología Celular y Molecular-IHEM-CONICET, Departamento de MorfoFisiología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, Mendoza, 2 Hospital Lagomaggiore, Mendoza, 3 Instituto de Genética, Facultad de Ciencias Medicas, UNCuyo, Mendoza*

La detección de mutaciones en genes relacionados con el cáncer colorrectal HNPCC y FAP permiten aplicar estrategias de prevención para estas enfermedades. De todas las mutaciones registradas las deleciones de uno o más exones cubren un porcentaje mayor al 50%. El inconveniente de este tipo de alteraciones es que no son detectables por métodos basados en PCR, como la secuenciación directa. Nuestro objetivo fue aplicar una estrategia molecular cuantitativa (MLPA) para la detección de deleciones en los genes *apc*, *mlh1* y *msh2*. El ADN de trece pacientes con cáncer de colon ha sido analizado a la fecha. En breve, 40 sondas distintas fueron hibridadas con el ADN, ligadas, y amplificadas en conjunto por PCR. Posteriormente, los productos fueron separados por electroforesis capilar en un secuenciador automático y analizados con el software GeneMarker. En un paciente con cáncer colorrectal se detectó una deleción en el exón 19 del gen *mlh1*. A partir de este resultado se realizó el mismo diagnóstico en familiares de primer grado, y se halló la misma deleción en un pariente que había desarrollado un tumor colónico maligno. Los resultados obtenidos permiten proyectar la aplicación de un nuevo método de diagnóstico genético para familias afectadas y aportar de esta manera a la prevención de la enfermedad. Proponemos una estrategia diagnóstica que conste en primera instancia del análisis por MLPA para detectar posibles cambios en el número de copias de uno o varios exones y en una segunda instancia un análisis de cada exón por secuenciación directa en los casos que no presenten alteraciones cuantitativas. De esta manera se podrá abordar el diagnóstico genético molecular completo del cáncer colorrectal hereditario.

**0618. (0334) CARACTERIZACION DE UN MODELO ORTOTÓPICO DE CANCER DE VEJIGA CON DIFERENTE GRADO DE INVASION.** C Lodillinsky, V Rodriguez, E Sandes, A Casabé, AM Eiján

*Instituto de Oncología "Angel H Roffo" - UBA*

Desarrollamos un modelo ortotópico de cáncer de vejiga murino con diferente comportamiento invasor. A través de la inoculación de la línea MB49 en el flanco de ratones C57BL/J6 y posterior trasplante con trocar durante 13 ciclos fue generado el tumor MB49-I con alta capacidad de invasión muscular cuando se lo inocula en forma ortotópica. Mientras que la inoculación de la línea MB49 genera tumores superficiales. **Objetivo:** Estudiar características de las células que forman ambos tumores. Para esto trabajamos con el cultivo primario (CP) generado a partir de tumor luego del pasaje 13 y con la línea MB49 mantenida en cultivo. Evaluamos a) actividad enzimática de MMP-9 por zimografía, uPA por caseinólisis radial y cathepsina B a través de un método colorimétrico. b) capacidad metastásica, por inoculación iv y c) expresión de marcadores epiteliales (citoqueratina 18) y mesenquimáticos (vimentina) por inmunofluorescencia. El CP tiene mayor capacidad de generar metástasis experimentales comparado con MB49 cuando se inyectan 5x10E4 células en ratones

singlecitos (mediana (rango) 152 (107-250) vs. 53 (7-76) nódulos metastásicos por ratón evaluadas a los 7 días  $p < 0.0001$ ). El CP presenta mayor actividad de MMP-9 liberada al medio condicionado comparado con la línea (79.3 vs. 2.2 UA/10E4cel/24h) y de uPA. (2.8 vs. 0.172 UI/10E6cel/24h). La vejiga inoculada con el CP presenta mayor actividad de Cathepsina B comparado con la vejiga inoculada con MB49 (33.65+/-4.31vs24.08+/-3.01 UI/ug proteína,  $p < 0.05$ ). MB49 presenta una marcación intensa para citoqueratina 18 que se pierde en el CP. Una población del CP es Vimentina positiva mientras que su expresión no se evidencia en MB49. **Conclusión:** Las células que originan el tumor MB49-I presentan mayor producción de enzimas proteolíticas, disminución de citoqueratina y aumento de vimentina, conjunto de cambios que sugieren una transición epitelio-mesenquimática que explicaría el mayor potencial invasor y metastático de ese tumor.

**0619. (0204) MICRODELECCIONES DE AZF Y OTRAS INESTABILIDADES DEL CROMOSOMA Y EN PACIENTES CON TUMORES DE TESTÍCULO.** SM Richard<sup>1</sup>, WH Pavicic<sup>1</sup>, R Lothe<sup>2</sup>, NO Bianchi<sup>1</sup>

*1 1-Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC-CONICET, La Plata, 2 2-Department of Genetics, Institute for Cancer Research, The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway.*

En el cromosoma Y humano (Yq11), se encuentran 4 regiones funcionales AZF a-d (azoospermic factor) asociadas a la espermatogénesis. En un trabajo anterior demostramos que los TGCTs (Tumores de células germinales de testículo) exhiben una alta inestabilidad del cromosoma Y evidenciada como microdeleciones en el dominio AZF. El objetivo de este trabajo fue ampliar el número de STS analizados en este dominio y en dos regiones de Yp, para poder realizar un mapa más detallado de las deleciones en los pacientes con tumores de testículo. Se analizaron 47 loci en AZF (a-d) en 9 reacciones de PCR en multiplex y tres loci ubicados en Yp (SRY; AMELY/X; ZFY/X) en 102 pares de tejidos tumoral/ no tumoral, de TGCTs: 71 de origen noruego; 17 finlandés y 14 argentinos. Se detectó presencia de deleciones en 13/102 pares (2-5 loci involucrados); 4/102 tejidos normales (1-2 loci); 15/102 tejidos tumorales (1-7 loci); 4 de estos últimos presentaron deleciones mosaico en SRY y ZFY. No se observaron deleciones en AMELY y dos casos presentaron deleción de AMELX. La inestabilidad del Y es parte de un amplio patrón de inestabilidades cromosómicas que producen susceptibilidad a padecer TGCTs. En este estudio pudimos observar este evento en Yq11, Yp y en una región del cromosoma X. Las microdeleciones de AZF en células tumorales y no tumorales de pacientes con tumores testiculares exhiben un patrón disperso que contrasta con el patrón de deleciones extensas observadas en los pacientes con infertilidad, esto permitiría utilizarlas como marcador de riesgo a padecer TGCT.

**0620. (0293) ESTUDIO DEL SILENCIAMIENTO EPIGENÉTICO DE GENES SUPRESORES TUMORALES EN CÁNCER DE MAMA.** DM Marzese<sup>1</sup>, FE Gago<sup>2,3</sup>, JI Orozco<sup>2,3</sup>, B Menciondo<sup>3</sup>, FM Real<sup>3</sup>, O Tello<sup>4</sup>, LM Vargas Roig<sup>5</sup>, M Roqué<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, 2 Area de Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo, 3 Servicio de Ginecología y Obstetricia - Hospital Italiano de Mendoza, 4 Laboratorio Privado de Anatomía Patológica - Mendoza, 5 Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, CRICYT - CONICET*

El silenciamiento de genes supresores tumorales (GST) por hipermetilación de sus promotores es una alteración frecuente en tumores. La detección de estas alteraciones epigenéticas, además de su gran valor diagnóstico y pronóstico, contribuye a entender el proceso tumorigénico. Existen diversas metodologías para analizar la metilación aberrante, pero a excepción del microarray todas ellas se limitan a estudiar pocos genes. Nuestro objetivo ha sido utilizar la metodología Methylation Specific-

Multiplex Ligation Probe Amplification (MS-MLPA) para caracterizar el perfil de metilación de 25 GST de tejido tumoral, ganglio axilar y sangre periférica pre-quirúrgica de pacientes con cáncer de mama. Brevemente esta técnica se basa en la hibridación de 40 sondas, 15 específicas de regiones no metilables y 25 de regiones promotoras de GST frecuentemente metiladas en cáncer de mama. Para estos ensayos, algunas muestras se analizaron por las técnicas Methyl-Specific PCR (MSP) y Bisulfite Sequencing PCR (BSP). Nuestros resultados indican que la metodología MS-MLPA fue efectiva para detectar perfiles de metilación aberrante en distintos tipos de muestras. Se detectó la presencia de metilación de varios GST (como RASSF1A, APC, BRCA1, DAPK1, CDH13 y TIMP3) en todos los tumores (n=11) y ganglios axilares (n=3) analizados. A su vez, en 2 de 6 muestras de sangre periférica pre-quirúrgica se hallaron perfiles de metilación aberrante, sugiriendo la presencia de células tumorales circulantes. No hemos observado metilación en tejido mamario histológicamente normal ni en fibroadenomas. La utilización de estas herramientas nos permite proyectar la posibilidad de establecer perfiles de metilación aberrante en tumores de diferentes estadios y orígenes histológicos, como así también la detección de células tumorales circulantes. De esta manera se espera aportar a la detección precoz y al seguimiento de las pacientes oncológicas.

### TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES III

#### 0621. (0242) CONTRIBUCIÓN DE 15DPGJ2 A LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CARDÍACA. E

Hovsepian, NB Goren

CEFYO-CONICET

Los desórdenes cardiovasculares constituyen una de las principales causas de muerte para el hombre. Por ello, uno de los mayores desafíos en la actualidad consiste en el diseño de estrategias que sean capaces de minimizar la necrosis y reparar el tejido luego de un fallo cardíaco. En el transcurso de una sepsis o de una endotoxemia el estímulo inflamatorio conduce a la expresión de genes de enzimas proinflamatorias como NOS-2, COX-2 y metaloproteinasas (MMPs) contribuyendo al daño cardíaco. El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de un ligando endógeno de PPAR $\gamma$ , 15-deoxi- $\Delta$ 12,14-PGJ2 (15dPGJ2) para regular la expresión de genes inflamatorios en corazón. Para ello fueron aisladas células cardíacas de corazones de neonatos Balb/c de 1-5 días de vida y fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia. Luego fueron tratadas con 1  $\mu$ g/ml de LPS y mediante Western blot (WB) se evaluó la activación de la vía de las MAPK, detectando la fosforilación de p38 y de Erk luego de 5 y 10 minutos. Cuando las células fueron estimuladas por 24 h con 1  $\mu$ g/ml de LPS, se observó mediante Wb y RT-PCR cuantitativa la expresión de NOS2 y COX2, así como un aumento significativo en la expresión de MMP9 respecto a las células control no tratadas con LPS. Con el objeto de evaluar una posible modulación de la respuesta inflamatoria por parte de 15dPGJ2, las células fueron pretratadas con 2  $\mu$ M de 15dPGJ2 y luego estimuladas por 24 h con 1  $\mu$ g/ml de LPS. Por medio de Wb pudimos comprobar que 15dPGJ fue capaz de inhibir la expresión de NOS-2 y COX-2 así como también el nivel de sus respectivos metabolitos. La liberación de NO se inhibió un 58% (p<0,05) y el nivel de PGE2 un 60% (p<0,05) en las células tratadas con 15dPGJ2. Además comprobamos una clara inhibición de la expresión de MMP9 por Wb. Estos resultados ponen de manifiesto la regulación negativa sobre la respuesta inflamatoria cardíaca, del ligando endógeno de PPAR $\gamma$ .

#### 0622. (0585) LA FALLA DEL CFTR EN FIBROSIS QUÍSTICA REDUCE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL.

AG Valdivieso, TA Santa Coloma, GL Taminelli

Universidad de Buenos Aires, CONICET y Fundación Instituto Leloir. Buenos Aires, Argentina

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad genética producida por la falla del canal de cloruro CFTR. Previamente

(Valdivieso et al. BBRC 356:805, 2007), hemos confirmado que en FQ existe una regulación negativa del ARNm de *MTND4*, un componente fundamental para la correcta actividad del Complejo I mitocondrial (CIm). El objetivo de este trabajo era determinar si la regulación negativa del ARNm de *MTND4*, observada previamente en células y tejidos FQ, podría inducir una disminución en la actividad del CIm. La actividad del CIm se midió mediante Blue Native-PAGE a partir de mitocondrias aisladas de líneas celulares derivadas de pacientes con FQ (CFDE y IB-3), de las mismas células que expresan ectópicamente wt CFTR (CFDE/6RepCFTR y S9), y de células T84 de cáncer de colon (wt CFTR). Se trataron estas células con glibenclamida y CFTR(inh-172), ambos inhibidores del CFTR, para modular la expresión de ND4. También diseñamos un ARN de interferencia (siARN) de CFTR, con el fin de reducir la expresión del CFTR en células T84 y confirmar los resultados obtenidos con inhibidores. **Resultados:** Se observó una disminución significativa de la actividad del CIm (NADH-ubiquinona oxidorreductasa) en células CFDE y CFDE/6RepCFTR tratadas con glibenclamida, en comparación con la actividad de las células CFDE/6RepCFTR. Estas observaciones fueron confirmadas en células IB-3 y S9, como así también en células T84 tratadas con siRNA de CFTR y con los inhibidores arriba mencionados. La reducción en la actividad del CIm observada, probablemente se debe a la disminución de la proteína ND4 mitocondrial ocurrida por la regulación negativa del ARNm de *MTND4*. La falla en la actividad del CIm en FQ podría explicar el aumento de apoptosis y de especies reactivas de oxígeno (ROS) en FQ, observado por otros autores y tener quizá un rol importante en la definición del fenotipo FQ.

#### 0623. (0264) INTERACCIÓN ENTRE LAS VÍAS DEL INTERFERÓN ALFA-2B (IFN- $\alpha$ 2B) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA-1 (TGF- $\beta$ 1) EN HEPATOCITOS DE HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA: PARTICIPACIÓN DEL COACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL P300. ML Alvarez, AD Quiroga, JP Parody, MT Ronco, DE Francés, CE Carnovale, MC Carrillo

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR)

La activación de la vía del IFN- $\gamma$  suprime varias respuestas celulares estimuladas por TGF- $\beta$ 1 en células normales y neoplásicas. Se postula que esta modulación negativa se debe a que ambas vías compiten por interactuar con cantidades limitantes del coactivador p300. Por otra parte, en nuestro laboratorio observamos que en hepatocitos de hígados preneoplásicos el IFN- $\alpha$ 2b estimula la producción de TGF- $\beta$ 1 y que entre ambas vías se da una interacción positiva. Con el objetivo de evaluar el rol de p300 en dicho modelo, trabajamos con hepatocitos de ratas sometidas a un modelo de preneoplasia experimental. Las células se cultivaron a 1, 4, 7, 15, 20 y 24 horas, sin y con IFN- $\alpha$ 2b y además con IFN- $\alpha$ 2b más inhibidores de la vía del TGF- $\beta$ 1 (SB431542 y anti-TGF- $\beta$ 1). Confirmamos la activación de la vía del IFN- $\alpha$  con el aumento del transductor intracelular Stat1 fosforilada (+150%\*) a partir de 1 hora de cultivo. Los niveles de Smad2/3 fosforiladas (mediadores intracelulares de TGF- $\beta$ 1) aumentaron desde las 15 horas (+85%\*) en hepatocitos tratados con IFN- $\alpha$ 2b, indicando activación de la vía. Los inhibidores utilizados bloquearon completamente dicha activación. En membranas plasmáticas de hepatocitos tratados con IFN- $\alpha$ 2b no se observaron cambios en los niveles del receptor para el IFN- $\alpha$ , pero sí un aumento del receptor para TGF- $\beta$ 1 (+60%\*, desde las 15 horas), junto con un aumento de su mensajero (+100%\*). Los estudios de inmunoprecipitación con p300 mostraron que en células tratadas con IFN- $\alpha$ 2b, p300 es capaz de interactuar con Stat1 y Smad2/3, no mostrándose como factor limitante para la activación de las vías. La medición de los niveles celulares de p300 en lisados de hepatocitos provenientes de hígados normales y preneoplásicos mostró un incremento de la proteína en estos últimos (+130%\*, \*p<0,05). En conclusión, los resultados demuestran que p300 no resulta ser un factor limitante, dado que en la preneoplasia la abundancia de la proteína permite la activación de ambas vías.

**0624. (0093) ACCIÓN DIFERENCIAL DE LOS FACTORES INVOLUCRADOS EN LOS COMPLEJOS DEL TRANSDUCTOR DE BMP-4 Y TGF- $\beta$  (SMADS) Y EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (ER).** D Giacomini<sup>1</sup>, M Paez-Pereda<sup>2</sup>, GK Stalla<sup>2</sup>, E Arzt<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Depto. de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEN, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Miembro IFYBINE-CONICET, 2 Max-Planck Institute of Psychiatry, Kraepelinstr. 10, 80804 Munich, Germany.*

Anteriormente demostramos que la naturaleza de los complejos proteicos ER-Smads depende del estímulo agregado (BMP-4, E2 o TGF- $\beta$ ). Decidimos estudiar su posible acción diferencial en regular la señalización de la vía de BMP-4, estrógenos o TGF- $\beta$ . Para estudiar la capacidad de BMP-4 en regular la actividad transcripcional de los estrógenos, células GH3 fueron transfectadas con una construcción reportera ERE-LUC. Observamos que BMP-4 es capaz de inhibir tanto la actividad basal del receptor de estrógenos como así también la inducida (40%,  $p < 0.05$ ). También estudiamos la posible existencia de un crosstalk entre BMP-4 y los estrógenos a nivel de la vía de señalización de BMP-4. Las células GH3 fueron transfectadas con una construcción reportera BMP-RE. Se observó un efecto aditivo de BMP-4 y estrógenos sobre la vía de señalización de BMP-4 (25%-56%,  $p < 0.05$ ). Dicho crosstalk también se observó sobre un blanco fisiológico como el promotor de prolactina, y el mismo se bloqueó al sobreexpresar una forma dominante negativa para la proteína Smad-1 (48%,  $p < 0.05$ ). Contrariamente los estrógenos no afectan la actividad transcripcional inducida por TGF- $\beta$ . Sin embargo TGF- $\beta$  es capaz de inhibir la actividad transcripcional de los estrógenos (40%,  $p < 0.05$ ). A su vez, TGF- $\beta$  inhibe la actividad transcripcional tanto de los estrógenos como de BMP-4 sobre el promotor de prolactina (70%,  $p < 0.05$ ). Una mutación dirigida del sitio ERE del promotor de prolactina no afectó el crosstalk entre BMP-4 y los estrógenos ( $p < 0.05$ ), demostrando que el mismo es independiente del sitio ERE y que actuaría a través de un posible sitio de unión a Smads. Por medio de deleciones consecutivas del promotor de prolactina observamos que el posible sitio de acción de Smads se encuentra entre la región -2000/-1500 del mismo. Estos resultados demuestran como los factores dentro del complejo Smad/ER afectan de distinta manera las vías de señalización estimuladoras de BMP-4 e inhibitorias de TGF- $\beta$ .

**0625. (0498) EXPRESIÓN DIFERENCIAL EN FIBROSIS QUÍSTICA DE UNA NUEVA PROTEÍNA NUCLEAR DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DENOMINADA CISD1.** GL Taminelli, AG Valdivieso, TA Santa Coloma

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, IIBBA-CONICET y Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires.*

Hemos caracterizado parcialmente y analizado los niveles de expresión de un gen dependiente del canal de cloruro (CFTR), denominado CISD1, el cuál codifica una proteína de función desconocida. Recientemente se ha reportado que posee un dominio de unión a hierro (Wiley y col, PNAS 104:5318, 2007). 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>). Transfectando células CFDE con una quimera de la proteína CISD1 unida a EGFP y comparando dichas células con y sin tratamiento con TMRE (marcador mitocondrial), hemos comprobado en imágenes obtenidas por microscopía confocal que la predicción de su localización es correcta. El ARNm de CISD1 está modulado negativamente en células CFDE y los niveles son restaurados en células CFDE que expresan ectópicamente el CFTR wt (células CFDE/6RepCFTR). Los resultados fueron confirmados mediante FISH Confocal, hibridización *in situ* en cortes de tejidos de pulmón, RT-PCRs semi-cuantitativas y RT-PCR en tiempo real de RNA proveniente de células CFDE y CFDE/

6RepCFTR. El tratamiento con glibenclamida (50  $\mu$ M) en las CFDE/6RepCFTR, produjo una reducción en los niveles del ARNm de CISD1. Actualmente realizamos experimentos con un inhibidor más específico del canal de cloruro CFTR(inh)-172 y con RNA de interferencia expresado en pSilencer 1.0-U6 (Ambion Inc. Austin, TX) diseñado específicamente contra CFTR. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que CISD1 tendría una localización mitocondrial, una probable función en el Complejo I de la cadena respiratoria y que su expresión se encontraría disminuida en FQ, como ocurre con la actividad del Complejo I mitocondrial (ver resumen de Valdivieso y col). Agradecimientos: Universidad de Buenos Aires (subsido X156) y ANPCyT (sub. PICT 13907).

**0626. (0480) SECUESTRO MOLECULAR DE PROTEÍNAS G. INTERFERENCIA EN LA SEÑALIZACIÓN DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G POR LA SOLA EXPRESIÓN DE OTROS GPCRS QUE TRANSDUCEN SU SEÑAL A TRAVÉS DE LA MISMA VÍA.** MR Tubio<sup>1,2</sup>, SD Santiago<sup>1</sup>, C Shayo<sup>2</sup>, C Davio<sup>1</sup>, F Monczor<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA, 2 Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME*

El receptor H2 a histamina (rH2) pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), transduciendo su señal a través de la proteína Gs. Previamente, hemos descrito que la sola expresión del rH2 disminuye la señalización mediada por el receptor a calcitonina (rCt) también acoplado a Gs. Este efecto es revertido mediante la sobreexpresión de proteína Gs, sugiriendo la existencia de una especie del receptor inactiva pero acoplada a proteína G capaz de secuestrar a la misma, y en consecuencia atenuar la señalización de otros receptores acoplados a la misma vía. Nuestro objetivo es determinar si dicho mecanismo de interferencia es un fenómeno más general y recíproco sobre el rH2. Para ello, transfectamos células CHO (sin rH2 ni receptor  $\beta$  adrenérgico - $\beta$ A- endógenos) con cDNA para rH2 en forma estable y/o con cDNA para  $\beta$ A en forma transiente. En estos sistemas evaluamos la interferencia de dichos receptores en su señalización recíproca y en la del rCt y del receptor a prostaglandina E2 (rPGE2), expresados endógenamente. La respuesta de cada receptor fue estudiada a través de ensayos concentración-respuesta de AMPc con los ligandos específicos para cada uno. Determinamos que la expresión del rH2 afecta la capacidad de respuesta del  $\beta$ A, rCt y rPGE2 (54%, 47%, y 70% de disminución respectivamente,  $p < 0,01$ ). De forma recíproca, determinamos que la presencia del  $\beta$ A es capaz de atenuar la señalización del rH2, rCt y rPGE2 (40%, 62% y 56% de disminución respectivamente,  $p < 0,01$ ). Estos resultados indican que la sola expresión del rH2 atenúa la señalización mediada por los rCt, rPGE2 y  $\beta$ A, y que a su vez este último es capaz de modular recíprocamente la señalización del rH2, rCt y rPGE2. En base a esto, podemos afirmar que la existencia espontánea de una especie de receptor acoplada a proteína G en forma inactiva es un fenómeno no exclusivo del rH2, y que el mecanismo de secuestro molecular de la proteína G podría generalizarse a otros receptores.

**0627. (0101) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL Y FUNCIONAL DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CREB POR RSUME.** J Druker<sup>1,2</sup>, J Gerez<sup>1</sup>, A Carbia-Nagashima<sup>1</sup>, E Arzt<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Dep. de FBMC, FCEN, UBA, IFIByNE-CONICET, 2 Beca José. A. Estenssoro, Fundación YPF.*

CREB es un factor de transcripción que se une a sus elementos de respuesta CRE presentes en numerosos genes. La fosforilación de CREB en serina 133 en respuesta al AMPc promueve una serie de eventos, que dan lugar al inicio de la transcripción. En este contexto estudiaremos la función de RSUME, un gen recientemente clonado y descrito en el laboratorio, que participa en la regulación de procesos transcripcionales e interviene en el proceso de sumoilación. RSUME es regulado por hipoxia. Dado que CREB se sumoila bajo condiciones de hipoxia prolongada

gada y que la sobreexpresión de SUMO-1 estabiliza a CREB y aumenta su actividad reportera, decidimos estudiar el efecto de RSUME sobre la actividad transcripcional de CREB. Se transfectoron células GH3 con un vector reportero 16-CRE-LUC y se observó que la presencia de RSUME aumenta significativamente la activación de la construcción reportera por AMPc (80%  $p < 0.05$ ). A fin de determinar si existe una interacción entre RSUME y CREB, se utilizó el sistema de doble-híbrido en células de mamífero. Observamos un aumento de la actividad de pG5-LUC cuando Gal4-CREB y RSUME-VP16 fueron co-transfectados indicando una posible interacción. Este resultado fue confirmado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación en la línea celular COS-7 ya que CREB coimmunoprecipita con RSUME-V5. Sabiendo que RSUME aumenta la actividad transcripcional de CREB decidimos estudiar a que nivel de la cascada de activación de CREB, RSUME ejerce su efecto. Se analizó por ensayos de Western Blot los niveles de fosfo-CREB a diferentes tiempos de estimulación por AMPc en presencia o ausencia de RSUME. Pudimos observar que la sobreexpresión de RSUME aumenta la forma fosforilada de CREB, indicando una correlación con los resultados observados a nivel transcripcional. El aumento de la actividad transcripcional y sumoilación de CREB constituye un punto central en la regulación de los genes blanco de este factor por RSUME.

**0628. (0451) GRK2 REGULA AL RECEPTOR H2 A HISTAMINA EN FORMA DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE SU ACTIVIDAD DE QUINASA.** NC Fernández<sup>1,2</sup>, F Gottardo<sup>2</sup>, C Shayo<sup>1</sup>, C Davio<sup>2</sup>

*1 Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME, 2 Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA*

El receptor H2 a histamina (rH2) pertenece a la familia de receptores de siete pasos transmembrana y media su acción a través de la activación de la proteína G $\alpha$ s incrementando los niveles de AMPc. Luego de ser fosforilado y desensibilizado por GRK2 es internalizado y reciclado a la membrana celular. Reportes recientes indican que GRK2 puede modular a los GPCRs en forma independiente de su actividad quinasa, sugiriendo la acción del dominio regulador de proteínas G (RGS) presente en las GRKs. El objetivo de este trabajo es discriminar los procesos dependientes e independientes de la fosforilación por GRK2 en la regulación del rH2. Para ello, evaluamos la desensibilización, internalización y reciclado del rH2 en células COS7-rH2 y U937, transfectadas con una construcción dominante negativa para GRK2 (GRK2K220R) que carece de actividad quinasa pero presenta el resto de los dominios intactos. En células COS7-rH2 observamos que GRK2K220R disminuye en un 30% la respuesta de AMPc frente a 10  $\mu$ M de amthamina (agonista H2). Luego de 60 min de tratamiento con amthamina la capacidad de respuesta del rH2 a un nuevo estímulo con el agonista fue del 25%, y del 5% en presencia de GRK2K220R. Por otro lado, observamos una menor respuesta de AMPc a amthamina en COS7-rH2 transfectadas con RGS2. Al evaluar los procesos de internalización y recuperación de sitios activos en membrana, observamos mediante ensayos de unión que GRK2K220R bloquea la internalización del rH2 y en consecuencia la resensibilización del mismo. **Resultados** similares fueron obtenidos cuando las células U937 que expresan endógenamente rH2 y GRK2 fueron transfectadas con GRK2K220R. Estos resultados indican que la fosforilación del rH2 es necesaria para la internalización y reciclado del mismo. Sin embargo, GRK2K220R es capaz de bloquear la respuesta del rH2 en forma similar a la proteína RGS2. En base a esto proponemos que la desensibilización del rH2 es mediada por el dominio RGS de GRK2.

**0629. (0102) INTERACCIONES LÍPIDO-PROTEÍNA EN LA BOMBA DE CALCIO DE MEMBRANA PLASMÁTICA.** IC Mangialavori, AM Villamil Giraldo, JP Rossi

*IQUIFIB. Departamento de Química Biológica. Universidad de Buenos Aires*

La Bomba de Ca<sup>2+</sup> de Membrana Plasmática (PMCA) es una P-ATPasa que transporta Ca<sup>2+</sup> contra gradiente electroquímico,

cumpliendo un papel fundamental en el mantenimiento de las concentraciones fisiológicas intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. La PMCA es una proteína de 134 KDa, cuya zona hidrofóbica contiene diez segmentos transmembránicos y la citoplasmática tres dominios definidos. El dominio C-terminal incluye el sitio de unión a calmodulina (CaM). En condiciones basales la bomba se encuentra autoinhibida. Cuando CaM se une a la bomba, se produce un cambio conformacional que produce la máxima afinidad y velocidad de transporte de Ca<sup>2+</sup>. Para estudiar si esto cambia la relación de la enzima con su entorno lipídico utilizamos dos técnicas diferentes: fotomarcación con [<sup>125</sup>I]TID-PC/16 y FRET entre la proteína marcada con Isotiocianato de eosina (EITC-PMCA) y Rodamina-PE, para estudiar el dominio transmembrana y el citoplasmático, respectivamente. Ambas estrategias incluyen la reconstitución de PMCA purificada de eritrocitos humanos en micelas de detergente. Nuestros resultados muestran que la unión de Ca<sup>2+</sup> aumenta 80% la exposición de restos hidrofóbicos en los segmentos transmembrana y que esta exposición disminuye a menos del 50% cuando se une CaM. La transferencia de energía entre EITC-PMCA y RhoPE aumenta ligeramente al unirse Ca<sup>2+</sup> a la PMCA pero no cambia significativamente al unirse CaM, sugiriendo que el segmento citoplasmático no modifica la región hidrofóbica. La transferencia disminuye en forma similar cuando la sonda es diluida con distintos lípidos, sugiriendo que la zona estudiada no presenta afinidad diferencial por los lípidos. Estos resultados indican que los movimientos conformacionales de la zona citoplasmática al unirse los distintos efectores se traducen en movimientos de los segmentos transmembrana. Con subsidios de ANPCYT, CONICET y UBACYT.

**0630. (0094) COMPONENTES MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAPK MEDIADA POR CRH EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.** S Silberstein<sup>1</sup>, JJ Bonfiglio<sup>1</sup>, D Giacomini<sup>1</sup>, D Refojo<sup>1</sup>, Holsboer<sup>2</sup>, E Artz<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires e IFIBYNE-CONICET, 2 Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich.*

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) juega un rol clave en la respuesta del organismo frente al estrés. La desregulación de la función del receptor de CRH de tipo 1 (CRHR1) en estructuras límbicas se asocia a patologías como depresión/ansiedad. Demostramos previamente en ratones que la administración icv de CRH causa, a través de CRHR1, la activación de ERK1/2 en áreas límbicas específicas (hipocampo y amígdala). Decidimos caracterizar las vías de señalización de CRH en líneas celulares hipocámpales, y a desarrollar estudios orientados a la identificación de blancos fisiológicos de la acción de CRH que podrían ser explotados para el desarrollo de tratamientos farmacológicos para disfunciones de CRH/CRHR1 en el sistema nervioso central. Generamos líneas celulares hipocámpales (HT22) que expresan CRHR1, en las cuales CRH estimula la transcripción de CRE-LUC (90%,  $p < 0.01$ ) e incrementa los niveles de pERK1/2 de manera tiempo y dosis-dependiente. Caracterizamos el interactoma de B-Raf, la MAPKKK responsable de la cascada B-Raf-MEK1/2-ERK1/2 en neuronas. Coimmunoprecipitados con anti-B-Raf se resolvieron por SDS/PAGE y las bandas de proteína se analizaron por espectrometría de masa. De esta manera se identificó vimentina en lisados de células estimuladas con CRH. Dado que B-Raf y 14-3-3 son abundantes en cerebro, decidimos investigar su posible interacción. Inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti-14-3-3 y análisis por western blot demostraron que 14-3-3, vimentina y B-Raf forman un complejo en células estimuladas por CRH. Por inmunofluorescencia y microscopía confocal, se comenzó el análisis témporo-espacial de ERK1/2 activado por CRH y su localización subcelular en relación a la internalización de CRHR1 activado. A tiempos de activación de ERK1/2 por CRH, pERK1/2 se encontró principalmente localizado en el citosol. El conjunto de estos estudios aportan a la comprensión de la relevancia de este complejo en la señalización de CRH en células hipocámpales.

**0631. (0525) MECANISMO DE RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS RECEPTORES H1 Y H2 DE HISTAMINA.** C Notcovich<sup>1</sup>, C Davio<sup>1</sup>, C Shayo<sup>2</sup>

*1 Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA, 2 Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME*

Los receptores a histamina pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). El rH1 transduce su señal vía Gq incrementando la producción de inosítoles fosfato (IP<sub>x</sub>), el rH2 conduce a un aumento en los niveles de AMPc. Numerosos trabajos han sugerido la existencia de mecanismos de regulación cruzada (crosstalk) entre ambos receptores, de forma tal que la activación de uno de ellos modula la respuesta del otro. Si bien el crosstalk ha sido ampliamente estudiado para diversos GPCRs, aún no se conocen los mecanismos para el rH1 y el rH2. Por lo tanto, nuestro objetivo es evaluar la regulación recíproca entre el rH1 y rH2 en células CHO transfectadas con ambos receptores (CHOH1-H2). Se evaluó la capacidad de respuesta de los rH1 o rH2 en células CHOH1-H2 pretratadas durante distintos tiempos con agonista H1 100 μM (2, 3-trifluorometilfenilhistamina) o agonista H2 10 μM (amtamina). Observamos una disminución en la respuesta de AMPc del rH2 dependiente del tiempo de incubación con agonista H1 (35±3%, t=1h). A su vez, el pretratamiento con amtamina redujo la acumulación de IPs en respuesta al agonista H1 (44±4%, t=1h). Este efecto no fue revertido por el inhibidor de PKA, KT5720. Por otro lado, el aumento de AMPc provocado por forskolina no modificó la respuesta del rH1, indicando que el AMPc no es responsable del crosstalk observado entre el rH2 y el rH1. Ha sido descrito que tanto el rH1 como el rH2 son internalizados luego de ser activados. Para analizar si este proceso está involucrado en el crosstalk entre el rH1 y el rH2, las células fueron tratadas durante 1 h con agonista H1 o H2 y los receptores fueron evaluados por ensayos de unión. El pretratamiento con amtamina redujo el número de rH1 en membrana en un 51±4% mientras que el agonista H1 redujo el número de rH2 en un 40±2%. Estos resultados indican que la cointernalización de los receptores H1 y H2 es al menos uno de los mecanismos involucrados en el crosstalk existente entre estos receptores.

**0632. (0117) CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE UN POSIBLE INTERMEDIARIO DE TRANSPORTE DE CA<sup>2+</sup> EN LA CA<sup>2+</sup>-ATPASA DE MEMBRANA PLASMÁTICA EXPRESADA EN UN SISTEMA DE BACULOVIRUS.** MS Ferreira Gomes, MC de la Fuente, RM González-Lebrero, RC Rossi, JP Rossi

*IQUIFIB-Departamento de Química Biológica, FFyB, UBA.*

La existencia de un gradiente de potencial electroquímico para el Ca<sup>2+</sup> en las células, permite que el flujo de este ión en respuesta a señales extracelulares se constituya en un segundo mensajero. La bomba de Ca<sup>2+</sup> de membrana plasmática (PMCA) es fundamental para el mantenimiento de este gradiente. La PMCA es una P-ATPasa cuyo mecanismo catalítico consiste en un ciclo de reacciones que involucran transiciones conformacionales, tanto en las formas fosforiladas (E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P) como en las desfosforiladas (E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub>). En el proceso de transporte de Ca<sup>2+</sup>, este ión se une a sitios citoplasmáticos de la enzima (E<sub>1</sub>) para luego ser liberado en la transición E<sub>1</sub>P-E<sub>2</sub>P. Se postula que la fosforilación de la enzima sería simultánea con la oclusión de Ca<sup>2+</sup>. Hemos desarrollado una metodología para medir el estado ocluido del Ca<sup>2+</sup> a partir de la sobreexpresión de la proteína en Baculovirus, que permite obtener preparaciones microsomales enriquecidas en distintas isoformas tanto fisiológicas como patológicas de la PMCA. Determinamos la oclusión Ca<sup>2+</sup> mediante la combinación de un aparato de mezclado rápido y una cámara de filtración con un tiempo de resolución de 3.5 ms. La unión de Ca<sup>2+</sup> se midió en presencia o ausencia de 2 mM o 25 μM ATP, 37.4 μg/ml de proteína, 100 μM (<sup>45</sup>Ca)Ca<sup>2+</sup>, 3 mM Mg<sup>2+</sup> y con y sin 50 μM La<sup>III</sup>. La unión de Ca<sup>2+</sup> en función del tiempo presentó un comportamiento bifásico: una primera fase rápida (180 ms) que estaría describiendo el proceso de oclusión; y una segunda fase lenta que representaría la

acumulación de Ca<sup>2+</sup> dentro de las vesículas. En conclusión nuestros resultados preliminares indican que la metodología implementada permite medir la desaparición transitoria del catión durante el transporte a través de la membrana. Esto permitirá el estudio de diversas isoformas de PMCA y postular el mecanismo detallado del transporte de calcio a través de la membrana. Con subsidios de ANPCYT, CONOCET y UBACYT.

**0633. (0398) ACCIÓN FOTOBIOLOGICA DEL LÁSER DE HELIO-NEÓN SOBRE LA HISTOMORFOMETRÍA Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA MITOCONDRIAL EN MIOPATÍA EXPERIMENTAL.** J Simes<sup>1</sup>, N Servetto<sup>1</sup>, M Moya<sup>1</sup>, O Evequoz<sup>2</sup>, J Palma<sup>1</sup>, V Campana<sup>3</sup>

*1 Cátedra de Física Biomédica - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba, 2 FAMAFA, 3 Universidad Nacional de La Rioja*

Se estudió la acción del láser de Helio-Neón sobre la histología de la miopatía inducida por inyección de adrenalina en ratas, la ultraestructura de la mitocondria y su función a través de la actividad enzimática de la citrato sintasa y de los complejos (I a IV) de la cadena respiratoria. Se estudiaron 4 grupos de ratas hembras, cepa Suquia: (A) control; (B) inyectadas con 0.1 mg/rata/día de adrenalina durante 5 días; (C) inyectadas con adrenalina e irradiadas con láser (8 J.cm<sup>-2</sup>) durante 5 días; y (D) sólo irradiadas. El músculo afectado y/o tratado fue observado por microscopía óptica y electrónica y parte procesado a pellet y realizado el aislamiento mitocondrial para el estudio enzimático por espectrofotometría. La actividad enzimática (μM/min/cm) analizada por MANOVA, estableciendo un nivel de significación p<0.01 y la cuantificación por test para datos categóricos (p<0.05). No hubo diferencia significativa de la actividad de citrato sintasa entre los 4 grupos. Se encontró un incremento de la actividad de los complejos I y III, tanto en los grupos C 9.28±1.20 y 65.84±10.53 respectivamente como en el D (11.38±1.76 y 46.53±3.24) comparando con los grupos A (1.65±0.29 y 5.03±0.77) y B (1.31±0.09 y 4.27±0.73) (p<0.001). No hubo diferencia en la actividad de los complejos II y IV entre los 4 grupos. El grupo C mostró recuperación de la organización estructural muscular, abundancia de retículos sarcoplásmicos, polirribosomas y glucógeno. El 71,43% de las mitocondrias fueron normales y de configuración morfofuncional "condensada", la mayoría de tamaño normal, aumentadas en número, muchas en proceso de división, tendencia a la regeneración y reorganización de crestas. El láser de He-Ne en el modelo experimental de miopatía por inyección con adrenalina en ratas, tendría efecto regenerativo a nivel muscular, estimulador de la recuperación y reorganización mitocondrial, y aumento de la actividad enzimática de los complejos I y III de la cadena respiratoria.

## METABOLISMO Y NUTRICIÓN II

**0634. (0286) EXPRESIÓN HETERÓLOGA, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALAD RECOMBINANTE HUMANA.** L Varela<sup>1</sup>, JP Rossi<sup>2</sup>, A Battle<sup>1</sup>, E Gerez<sup>1</sup>

*1 CIPYP - CONICET - Htal. de Clínicas - UBA, 2 IQUIFIB - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA*

El primer paso común de la biosíntesis del hemo, es la condensación asimétrica de dos moléculas de ALA, catalizada por la enzima delta-aminolevulinato dehidratasa (ALAD) (E.C.4.2.1.24). Esta enzima de 280 kDa, está compuesta por ocho subunidades idénticas. Estudios realizados en una población diabética demostraron que la actividad del ALAD está disminuida en sangre de diabéticos respecto a los controles normales. Los mecanismos moleculares que llevan a la inactivación del ALAD podrían deberse a la glicación no enzimática del residuo de lisina del sitio activo que forma una base de Schiff con la primera molécula de ALA, o a la oxidación de los residuos cisteína esenciales para la actividad enzimática. Una hipótesis complementaria es la combinación de ambos fenómenos (glicooxidación). El objetivo de este trabajo fue

la obtención y caracterización del ALAD humana (ALADh) recombinante in vitro. A partir de sangre humana se aisló el ARN total y por la técnica de RT-PCR se obtuvo el ADNc del ALADh. El ALADh se clonó en el plásmido pGEX-3X y se sobreexpresó en la cepa de *Escherichia coli* BL21 como una proteína de 62 kDa fusionada a un fragmento de 26 kDa de la glutatión-S-transferasa. Para ello se indujeron cultivos de *E. coli* BL21 con 0.1mM IPTG a temperatura ambiente con crecimiento durante la noche. La actividad residual de la proteína recombinante se determinó a distintas temperaturas: 4, 25, y 37 °C, siendo la vida media de 44.5, 10.6 y 2.14 días respectivamente. A mayores temperaturas: 45, 55 y 65 °C se observó un aumento de la actividad enzimática de hasta un 60% (control:  $49,14 \pm 15,00$  U/mg). La proteína recombinante se purificó a homogeneidad por columna de afinidad obteniéndose una proteína activa. Con esta ALADh recombinante, de elevada actividad específica y pureza se harán estudios estructurales y cinéticos y se determinará cual es el mecanismo de inactivación enzimática.

#### 0635. (0106) FERRITINA Y LA GENERACIÓN DE RADICALES OXIDATIVOS. I Rousseau, S Puntarulo

*Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956 (C1113AAD) Buenos Aires, Argentina. e-mail: ivanr@ffybu.uba.ar*

La unión de Fe a la ferritina (Ft) es considerada una forma segura de almacenar Fe a nivel celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la suplementación de Ft sobre la generación por hígado de rata de radicales ascorbilo (A) e hidroxilo ( $\cdot$ OH). La Ft aislada se filtró por columna Sephadex G25 para eliminar trazas de Fe adventicio. En muestras de hígado de rata Wistar macho (200 g) homogenizadas en buffer fosfato de potasio 40 mM, pH 7,4 e incubadas durante 1 min con DMSO se detectó una señal de espectroscopía de resonancia electrónica (EPR) característica de la presencia de A ( $g=2,0054$ ,  $a_{\parallel}=1,88G$ ), con una velocidad de generación de  $2,2 \pm 0,3$  pmol/mg peso fresco (sistema basal). La adición de 0,1 mM NADPH o 50  $\mu$ M Fe<sup>2+</sup> no afectó significativamente la producción de A, sin embargo la suplementación con 50  $\mu$ M Fe-EDTA (1:2) incrementó 6 veces la velocidad. La suplementación del sistema basal con 100  $\mu$ M EDTA incrementó la producción de A en un 73%, debido a la producción de Fe-EDTA con el Fe endógeno. La adición al sistema basal de 0,2  $\mu$ g de Ft incrementó la generación de A a  $6,6 \pm 0,8$  pmol/mg peso fresco, pero la adición de NADPH o EDTA no mostró efecto sobre la generación de A en presencia de Ft. Microsomas aislados de hígado de rata, suplementados con el atrapador de spin DMPO, mostraron por EPR, una velocidad de generación de  $\cdot$ OH de  $4 \pm 1$  UA.s<sup>-1</sup>. La velocidad de generación de  $\cdot$ OH en presencia de 1 mM DF fue de  $3 \pm 1$  UA.s<sup>-1</sup>, sin registrar cambios por la adición de Ft ( $4 \pm 1$  UA.s<sup>-1</sup>). La velocidad de generación basal de  $\cdot$ OH fue incrementada a  $16 \pm 1$  UA.s<sup>-1</sup> en presencia 1 mM EDTA y la adición simultánea de Ft (30  $\mu$ g) y EDTA mostró una producción de  $\cdot$ OH de  $28 \pm 2$  UA.s<sup>-1</sup>. Los resultados presentados sugieren que a pesar de considerarse a la Ft una forma inocua de almacenamiento de Fe, la movilización intracelular de Fe desde la Ft está asociada a la generación de radicales oxidativos. La relevancia de este efecto depende de la naturaleza de los quelantes celulares.

#### 0636. (0386) EFECTO DE ANTIOXIDANTES Y ACIDOS BILIARES EN UN MODELO MURINO DE PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA INDUCIDA POR GRISEOFULVINA. MC Martínez<sup>1,2</sup>, SG Afonso<sup>1</sup>, AMC Batlle<sup>1</sup>

*1 CIPYP - CONICET- Hospital de Clínicas José de San Martín - UBA, 2 Departamento de Química Biológica - FCEN-UBA*

La Protoporfirina Eritropoyética (PPE), es una enfermedad asociada con una deficiencia en la Ferroquelatasa, que produce acumulación de protoporfirina IX (PP) en eritrocitos, hígado y piel. La manifestación más grave es la falla hepática progresiva, colestasis y depósitos de PP en los canalículos biliares. El antimicótico Griseofulvina (Gris), desarrolla en animales un modelo de PPE con

manifestaciones hepáticas. En trabajos previos demostramos que la administración de Gris a ratones indujo estrés oxidativo y severo daño hepático. El tratamiento con un polifenol, como el ácido Clorogénico (AC), protegió al hígado de la peroxidación lipídica, en tanto que el ácido desoxicólico (AD) disminuyó la acumulación de PP en hígado. El objetivo de este trabajo, fue evaluar el posible efecto protector de antioxidantes y ácidos biliares, sobre parámetros marcadores del daño hepático y estrés oxidativo, en nuestro modelo murino de PPE. Los animales alimentados con 0,5% de Gris recibieron antioxidantes en el agua de bebida: Trolox (Tx) (2mg/100ml), Acido Ascórbico (As) (12mg/100ml), Melatonina (5mg/kg) y la combinación de AC (50mg/l)+AD(0,33% p/p en la dieta) o de AC+Acido Ursodeoxicólico (AU) (0,2% p/p en la dieta). Los antioxidantes disminuyeron 50% la inducción del ALA-S. El Tx y el As, redujeron 20% la peroxidación lipídica. El As sólo o con Tx redujo 50% los niveles de glutatión y 27% la Glutacion-S-Transferasa. El Tx disminuyó las actividades de Glutacion Reductasa(33%) y Superóxido Dismutasa(26%). La combinación de AC+AD revirtió 95% la acumulación de PP hepática y evitó la inducción de algunos parámetros del sistema antioxidante, la combinación de AC+AU actuó únicamente a nivel del estrés oxidativo. Estos resultados indicarían que el tratamiento con antioxidantes o con ácidos biliares solamente pueden proteger parcialmente del daño hepático producido por la Gris, disminuyendo el estrés oxidativo, aumentando la excreción de porfirinas o a nivel de regulación del hemo.

#### 0637. (0569) HIERRO Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA MANIFESTACIÓN DE LA PORFIRIA CUTÁNEA TARDÍA Y SU ASOCIACIÓN CON OTRAS PATOLOGÍAS. MJ Teijo<sup>1</sup>, AM Buzaleh<sup>1,2</sup>, SG Afonso<sup>2</sup>, A Batlle<sup>2</sup>, VE Parera<sup>1,2</sup>

*1 Departamento de Química Biológica - FCEN-UBA, 2 CIPYP (CONICET)*

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) es causada por una deficiencia de la Uroporfirinógeno decarboxilasa (UROD) provocando la acumulación de porfirinas altamente carboxiladas en hígado y plasma y una típica fotosensibilidad cutánea. Entre los factores requeridos para su manifestación, se encuentran la sobrecarga de hierro e infecciones por virus hepatotrópicos. Se sabe que el hierro es necesario para la inactivación de la UROD y en estos pacientes se encuentra con frecuencia un aumento de los depósitos de hierro. El objetivo de este trabajo fue determinar si los parámetros de hierro circulante en pacientes PCT se encuentran elevados y si la manifestación clínica asociada a otras patologías (HIV, HCV y afecciones renales severas) puede estar mediada por efectos del estrés oxidativo. Se determinó la ferremia y la saturación de transferrina en 84 pacientes PCT y 56 sujetos normales (Kits de Wiener Lab. Argentina). Los niveles de estrés oxidativo se midieron en sangre de 29 de los pacientes PCT mediante la determinación de radicales libres de oxígeno (ROS) provenientes de peróxidos totales (FORT TEST, Italia). Los pacientes PCT presentaron ferremia ( $113,7 \pm 51,3$   $\mu$ g/dl) y saturación de transferrina ( $39,4 \pm 14,1\%$ ) elevados respecto de los sujetos normales (ferremia:  $83,7 \pm 28,6$   $\mu$ g/dl y saturación:  $31,3 \pm 10,7\%$ ), ( $p < 0,05$ ). En los pacientes PCT- hemodializados tanto ferremia ( $63,1 \pm 20,8$   $\mu$ g/dl) como saturación ( $22,2 \pm 7,4\%$ ) estaban disminuídos, ( $p < 0,05$ ). El grupo PCT-HCV mostró valores muy elevados de ferremia ( $154,7 \pm 70,6$   $\mu$ g/dl), saturación ( $45,1 \pm 16,8\%$ ) y niveles de ROS ( $132,3 \pm 90,2$  mg/lH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ( $p < 0,05$ ) al igual que los pacientes PCT-HIV ( $120,1 \pm 29,8$  mg/lH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,  $p < 0,05$ ). Estos resultados permiten inferir un posible rol del hierro circulante en la manifestación cutánea de la PCT a través de la producción de ROS, o alternativamente por oxidación del sustrato de la UROD, intensificando así los signos clínicos de la PCT.

#### 0638. (0223) PORFIRIA DUAL: PORFIRIA CONGENITA ERITROPOYÉTICA Y PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE. PRIMER CASO DETECTADO A NIVEL MUNDIAL. VA Melito<sup>1,2</sup>, MV Rossetti<sup>1,2</sup>, A Batlle<sup>2</sup>, VE Parera<sup>1,2</sup>

*1 Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA, 2 Centro de Investigación*

nes sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas - UBA

En la Porfiria Dual (PD) coexisten sintomatología clínica y bioquímica correspondiente a la deficiencia simultánea de dos enzimas del camino del Hemo. Hasta el presente, se han descrito 15 casos de familias con PD. En la mayoría de ellos están involucradas la Porfiria Cutánea Tardía (PCT) y la Porfiria Aguda Intermitente (PAI), ambas de carácter autosómico dominante y de alta frecuencia en la población porfirica. Se han observado únicamente 3 casos en los que una de las Porfirias es de carácter recesivo. En el CIPYP diagnosticamos 3 familias PD: 1 PCT-PV (SAIC 2003) y 2 PCT-PAI (SAIC 2006). Presentamos el primer caso de asociación entre Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE), recesiva, y PAI. La paciente manifestó a partir de los 15 años trastornos abdominales, síntomas cutáneos leves, eritrodondia y esplenomegalia. La sintomatología clínica y los parámetros bioquímicos indicaron la coexistencia de PCE y PAI: ALA: 3,4 mg/24 h (VN:  $\leq 4$  mg/24h); PBG: 15,5 mg/24 h (VN:  $\leq 2$  mg/24h); Porfirinas: 8459  $\mu$ g/24 h (VN:  $\leq 250$   $\mu$ g/24h); Copro: 19%, Penta: 6%, Hexa: 1%, Hepta: 4%, Uro: 70%, (VN: 100% Copro) en orina; IPP: 5,30 a  $\lambda$  619 nm (VN:  $\leq 1,30$ ); Hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S): 49,37 U/ml GR (VN: 81,51  $\pm$  11,96 U/ml GR); Porfirinas Totales: 427  $\mu$ g/100 ml GR (VN: 150  $\pm$  40  $\mu$ g/100 ml) en sangre; Porfirinas Totales en materia fecal: 655  $\mu$ g/g seco (VN: 30-130  $\mu$ g/g seco). Se están identificando las mutaciones en los genes de la HMB-S (PAI) y Uroporfirinógeno III sintetasa (PCE), enzimas afectadas en estas Porfirias. La PCE se caracteriza por presentar sintomatología severa como consecuencia de la acumulación masiva de porfirinas de la serie I en tejidos. En este caso la deficiencia conjunta de HMB-S llevaría a una menor formación y acumulación de éstas lo cual explicaría la sintomatología leve en esta paciente. Es fundamental determinar con exactitud que tipo de Porfirias coexisten para aplicar el tratamiento adecuado sin riesgo de desencadenar ataques agudos.

**0639. (0406) PARTICIPACIÓN DE LOS METALES DE TRANSICIÓN (FE, CU, CO Y NI) EN LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS MEDIADA POR ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO.**  
NF Ferrerotti, A Carozzo, MG Repetto

*Cátedra de Química General e Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Físicoquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.*

La exposición de los sistemas biológicos a los iones metálicos Cu, Co y Ni produce citotoxicidad y daño oxidativo a lípidos por un mecanismo similar a la reacción de Haber-Weiss catalizada por Fe. El objetivo de este trabajo es estudiar la participación de estos metales en la peroxidación de lípidos mediada por las especies reactivas del oxígeno. Se utilizaron liposomas compuestos por fosfolcolina (PC) y fosfo-L-serina (PS), PC/PS= 60:40, incubados a 37 °C durante 90 min para promover la generación de hidropéroxidos, y expuestos a soluciones de cationes Fe, Cu, Co y Ni (5 a 200  $\mu$ M), en presencia y ausencia de peróxido de hidrógeno. La peroxidación de lípidos fue evaluada mediante la generación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La estimulación de la peroxidación de lípidos fue calculada mediante la relación: TBARS de cada ion con Fe/TBARS Fe. Los resultados obtenidos mostraron que los cationes Fe y Cu intervienen en la peroxidación de lípidos mediante dos mecanismos: ruptura homolítica de los lipohidropéroxidos en ausencia de peróxido de hidrógeno (343% de aumento por Fe y 210% por Cu) y la descomposición de peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton/Haber-Weiss. El Co inhibe el efecto catalítico del Fe (inhibición competitiva), el Cu y el Ni lo potencian (sinergismo positivo). Los cationes Fe y Cu inducen la descomposición de peróxido de hidrógeno, sugiriendo una cinética de segundo orden para la reacción catalizada por Fe, y de primer orden para el Cu. El Co y el Ni no producen la descomposición de peróxido de hidrógeno, el Ni en presencia de Fe actúa en forma sinérgica con el Fe, el Co la inhibe. El tiempo que el Co requiere para inhibir al 50% la actividad catalítica del Fe es menor que el requerido por el Cu y el Ni para potenciarla. El control de la etapa iniciación de la ox-

dación de lípidos mediante la regulación de la concentración de metales de transición, puede prevenir el daño oxidativo que produce la muerte celular.

**0640. (0485) EFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO Y SALINO EN JUVENILES DE LA LANGOSTA DE AGUA DULCE, CHERAX QUADRICARINATUS.** NC Prymaczok, EM Rodríguez

*Dept. de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEyN, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, Pab. II. C1428EHA Buenos Aires, Argentina.*

La langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* es una especie de clima subtropical cuyo cultivo comercial en Argentina se encuentra en plena expansión. Dado que las condiciones ambientales en nuestro país son marginales para el crecimiento óptimo de esta especie, nos propusimos como objetivo evaluar el efecto de la aclimatación a temperaturas relativamente bajas, aunque tolerables para la especie en estudio. Se consideró además a la salinidad como un segundo factor experimental, aclimatando a los animales a diferentes combinaciones de temperatura y salinidad. Se utilizaron langostas juveniles de 5 a 6 grs. de peso corporal, asignándose 10 animales a cada combinación de las temperaturas 27 (óptima para la especie) o 20 °C y las salinidades 0 (agua dulce), 5 o 10 g/L. Los animales fueron expuestos a dichas condiciones durante un período de 30 días, durante el cual se alimentaron diariamente con alimento balanceado para peces y *Elodea* sp. El fotoperíodo se mantuvo constante en 14:10 (L:O). Al finalizar el ensayo se extrajeron 100 a 200  $\mu$ l de hemolinfa de cada animal, a fin de determinar los niveles de sodio, potasio y glucosa. A 27 °C no se observaron diferencias ( $p > 0,05$ ) en los niveles de sodio entre las distintas salinidades, mientras que sí se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de sodio a 20 °C con el incremento de la salinidad. Los niveles de potasio se mantuvieron esencialmente constantes. Por otro lado, si bien la glucemia aumentó a ambas temperaturas al aumentar la salinidad, la glucemia se incrementó en más del 100% ( $p < 0,05$ ) a 20 °C en comparación con 27 °C, a cualquiera de las salinidades ensayadas. Se concluye que los adultos de *C. quadricarinatus* son capaces de enfrentar con éxito el estrés salino cuando la temperatura es óptima, manteniendo en consecuencia la homeostasis de sodio, pero que tal capacidad ya no se verifica a temperaturas menores, que representan niveles de estrés no compensables por la especie en estudio.

**0641. (0433) INGESTA DE DIETAS RESTRICTIVAS EN GRASA Y/O CALCIO: EFECTO SOBRE EL TAMAÑO Y COMPOSICIÓN CORPORALES, DURANTE EL CRECIMIENTO.** C Suárez, E Macri, S Zeni, P Rodríguez, S Friedman

*Cátedra de Bioquímica General y Bucal - Facultad de Odontología - Universidad de Buenos Aires*

Una alimentación inadecuada durante el crecimiento podría conducir a alteraciones en el mismo y en la composición corporal, con riesgosas consecuencias en los tejidos óseo y adiposo. **Objetivo:** relacionar las variaciones en el consumo de dietas bajas en grasa y/o calcio con el tamaño y composición corporales. Al destete 200 ratas Wistar hembra se dividieron en 4 grupos que recibieron ad libitum una de 4 dietas con relación calórica carbohidratos:lípidos (CH:L) 1:1 o 3:1 y Ca 0.6% o 0.3%: a) grupo de referencia R1:1 0.6, b) E1:1 0.3, c) E3:1 0.6, d) E3:1 0.3. Se evaluaron: peso (P, g) y longitud (L, cm.) corporales, %grasa (%G), contenido mineral óseo total (CMO, DXA Lunar DPX) y consumo diario de dieta (CD, g dieta/100g peso/día) a 35 y 49 días de edad. **Resultados:** (Media  $\pm$  DE; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA- Test de Dunnett): 1) a T35 sólo d modificó P (90.3 $\pm$ 9.7\*\* vs. 101.4 $\pm$ 14.1) y L (15.4 $\pm$ 0.6\*\* vs. 16.0 $\pm$ 0.7) mientras que a T49 se modificaron b y d en P (158.2 $\pm$ 13.7\* y 148.0 $\pm$ 11.8\*\*, respectivamente vs. 171.2 $\pm$ 17.9) y en L (19.0 $\pm$ 0.7\* y 18.6 $\pm$ 0.4\*\*, respectivamente vs. 19.5 $\pm$ 0.7); 2) %G disminuyó en d a T35 (6.91 $\pm$ 1.0\*\*\* vs. 9.15 $\pm$ 1.5) y T49 (6.73 $\pm$ 1.47\*\* vs. 9.26 $\pm$ 2.04); 3) CMO disminuyó en b y d a T35 (0.165 $\pm$ 0.01\*\*\* y 0.186 $\pm$ 0.04\*\*\* vs. 0.353 $\pm$ 0.05) y T49 (0.243 $\pm$ 0.03\*\* y 0.257 $\pm$ 0.04\* vs. 0.649 $\pm$ 0.05); 4) CD aumentó en las dietas restrictivas c y d

en grasa a T35 ( $14.77 \pm 1.41^{**}$  y  $14.39 \pm 1.20^{**}$  vs.  $11.65 \pm 0.82$ ) y a T49 ( $12.46 \pm 1.28^{**}$  y  $15.74 \pm 1.39^{**}$  vs.  $9.49 \pm 0.76$ ). El aumento en el consumo en los grupos con restricción de grasa protegió el tamaño y composición corporales sólo en el grupo sin restricción de calcio. **Conclusión:** Durante el crecimiento, la restricción en la ingesta de grasa y calcio impactaría negativamente sobre los tejidos adiposo y óseo. UBACyT O 003 y O 004.

**0642. (0294) EFECTOS DE LA DEFICIENCIA DE N3 PUFA SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y DENSIDAD MINERAL ÓSEA DURANTE EL CICLO REPRODUCTIVO EN UN MODELO EXPERIMENTAL.** A Ferreira Monteiro, E Macri, S Zeni, P Rodríguez, S Friedman

*Cátedra de Bioquímica General y Bucal - Facultad de Odontología - Universidad de Buenos Aires*

La cantidad y calidad de los lípidos ingeridos durante el ciclo reproductivo incide en el progreso del embarazo y desarrollo del niño. Un patrón de ingesta de dieta con bajo contenido graso se acompaña generalmente con una deficiente ingesta de lácteos. Nuestro objetivo fue evaluar el impacto del consumo de dietas bajas en grasa y/o calcio sobre la composición corporal y densidad mineral ósea (DMO) durante un ciclo reproductivo en progenitoras (M) y sus crías (C). 40 ratas Wistar hembra se dividieron al destete en 4 grupos, cada uno de los cuales recibió 1 de 4 dietas con una relación hidratos de carbono: lípidos 1:1 o 3:1 y adecuación (0.6%) o restricción (0.3%) de calcio: R11-06 (control), E11-03, E31-06 y E31-03. La fuente dietaria de lípidos fue el aceite de maíz con relación PUFA n6/n3: 47.3. A los 70 días de edad se determinó % contenido mineral óseo (CMO) y DMO total y columna lumbar de M por DXA, y se aparearon. Al destete se evaluó % grasa (%Gra, método químico) y CMO de M y C y DMO de M. Se calculó la variación de CMO y DMO ( $\Delta$ ) durante el ciclo reproductivo (CR). **Resultados** (media  $\pm$  DE) Test de Dunnett: no se observaron diferencias en el peso corporal de M y C. Se observó correlación en %Gra de M y C con el contenido de lípidos de las dietas. CMO de M y C al destete en E11-03 y E31-03 fueron significativamente menores ( $p < 0.05$ ). M E31-06 transcurrió CR con CMO y DMO sin diferencias significativas (DS) respecto a R11-06; sin embargo,  $\Delta$ CMO fueron:  $-0.868 \pm 0.401$  vs.  $-0.299 \pm 0.337$  ( $p < 0.05$ ). En M,  $\Delta$ DMO total disminuyó cuando se sumaron ambas restricciones ( $-0.01 \pm 0.01$  vs.  $0.024 \pm 0.04$ ,  $p < 0.05$ ). Nuevamente, el hueso trabecular fue el más afectado en E31-06 ( $\Delta$ DMO:  $-0.05 \pm 0.03$  vs.  $-0.007 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). **Conclusión:** la mayor variación de DMO en E31-06, sin deficiencia de calcio pero sí de n3 PUFA, haría peligrar la calidad ósea luego del ciclo reproductivo, probablemente vía aumento de PGE2. UBACyT O 003 y 004.

**0643. (0159) LOS MARCADORES DE MODELACION Y REMODELACION OSEA DEL TIPO CTX Y LA RELACIÓN ENTRE AMBOS SON AFECTADOS POR EL ESTADO NUTRICIONAL RESPECTO DEL CALCIO EN NIÑOS ENTRE CINCO Y NUEVE AÑOS DE EDAD.** ME Rio<sup>1</sup>, NM Piazza<sup>2</sup>, G Pellegrini<sup>3</sup>, J Somoza<sup>3</sup>, SN Zeni<sup>3</sup>

*1 Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. CONICET, 2 Dirección de Epidemiología. Vicente López, 3 Sección de Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas J de San Martín. UBA*

Los telopéptidos del colágeno tipo I carboxilo terminal (CTX) son indicadores de la resorción ósea y pueden evaluarse por inmunoensayo utilizando muestras de orina. El colágeno nativo se sintetiza con una secuencia aminoácídica susceptible de modificaciones pos-traslacionales en la forma  $\alpha$ -CTX, pero se transforma en el isómero  $\beta$ -CTX durante el envejecimiento del hueso. La relación entre ambos CTX determina la edad biológica del hueso degradado. Durante el crecimiento el cociente  $\beta$ -CTX/ $\alpha$ -CTX es bajo ya que el hueso degradado es joven y debería aumentar con la edad. La deficiencia nutricional de calcio es un factor con alta probabilidad de afectar dicho proceso. En este trabajo estudiamos los niveles de  $\alpha$ -CTX y  $\beta$ -CTX y la relación entre ambos sobre muestras de orina basal de 172 niños (5 a 9 años)

concurrentes a escuelas primarias públicas del Municipio de Vicente López. GBA. Se determinaron CTX- $\alpha$  y  $\beta$  (ug/mg Creatinine  $\pm$  DS) (ELISA, Nordic Bioscience Diag, Dinamarca); calcio (espectrofotometría de absorción atómica) y creatinina (WienerLab). Los resultados se analizaron por edad y en función del estimador de la adecuación respecto del calcio (Ca/Cr) por rangos:  $< 0.07$ , deficiente (D);  $> 0.07$ , adecuado (A). El  $\alpha$ -CTX, mostró la tendencia normal a decrecer entre los 5 y los 9 años de  $21.3 \pm 10.7$  a  $17.9 \pm 7.3$  (NS); el  $\beta$ -CTX se mantuvo en un valor constante de alrededor de 1.370 con elevados DS (550 a 400) NS. Al introducir la variable estado respecto del Ca y analizar la variación de la relación entre ambos marcadores pudo observarse que los niños más pequeños (5 y 6 años) no la modificaban con el nivel del indicador para el calcio, ( $72.4 \pm 34.1$  para D y  $72.95 \pm 42.6$  para A (NS); a partir de los 7a la situación cambió, haciéndose dependiente del calcio ( $78.0 \pm 21.1$  en D vs  $91.3 \pm 32.3$  en A, alcanzando  $101.7 \pm 16.1$  a los 9a. Estos resultados confirman la importancia de estado nutricional cálcico para la normal evolución del hueso, en esta etapa de la vida. UBACyT B/703.

**0644. (0445) IMPACTO DE DIETAS RESTRINGIDAS EN CALCIO Y/O LÍPIDOS SOBRE EL CARTILAGO EPIFISARIO EN RATAS.** C Suárez<sup>1</sup>, M Gonzales Chaves<sup>1</sup>, P Boyer<sup>2</sup>, P Rodríguez<sup>1</sup>, S Zeni<sup>1</sup>, S Friedman<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Bioquímica General y Bucal - Facultad de Odontología - Universidad de Buenos Aires, 2 Cátedra de Fisiología - Facultad de Odontología - Universidad de Buenos Aires*

Existen factores extrínsecos que determinan la adquisición de la masa ósea y su mantenimiento en el tiempo, entre los cuales el factor nutricional es de prevalencia. Poco se ha investigado acerca de la relación carbohidratos - lípidos dietarios en el desarrollo y mantenimiento de la masa ósea y menos aún, cuando esta distorsión ocurre en forma simultánea con la deficiencia de calcio. **Objetivo:** evaluar las consecuencias del consumo de dietas isocalóricas pero restringidas en grasa y/o calcio sobre el crecimiento corporal global y óseo, en particular, en etapas de la vida donde los requerimientos de energía y nutrientes son elevados. Se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar al destete ( $n=40$ ), las que se dividieron en 4 grupos, uno de referencia (R) y 3 experimentales (Ex): R 1:1 0.6, Ex 1:1 0.3, Ex 3:1 0.6 y Ex 3:1 0.3 según recibieron durante 14 días una de 4 dietas con una relación carbohidratos: lípidos (CH:L) y un porcentaje de calcio de: 1:1 y 0.6% Ca, 1:1 y 0.3% Ca, 3:1 y 0.6% de Ca y 3:1 y 0.3% Ca, respectivamente. Se evaluaron: peso y longitud corporales, morfometría e histomorfometría de tibia y contenido mineral óseo total (CMO, DXA Lunar DPX). **Resultados** (media  $\pm$  DE de R 1:1 0.6, Ex 1:1 0.3, Ex 3:1 0.6, Ex 3:1 0.3, respectivamente): No se observaron diferencias significativas en la armonía corporal ni en las variables morfométricas óseas entre grupos postrestricción individuales y combinada respecto del grupo R. La CMO (mg) fue de  $0.353 \pm 0.05$ ,  $0.165 \pm 0.01^{***}$ ,  $0.342 \pm 0.07$  y  $0.186 \pm 0.04^{***}$ , respectivamente ( $p < 0.001$ ). El ancho de cartilago hipertrófico fue de  $79.4 \pm 18.3$ ,  $119.9 \pm 11.3^{**}$ ,  $110.8 \pm 21.1^*$  y  $112.3 \pm 7.87^*$ , respectivamente ( $p < 0.01$ ). **Conclusión:** los resultados del presente trabajo sugieren que la modificación de la composición de la dieta a predominio de CH y/o calcio resulta en un retardo en el proceso de osificación y/o mineralización durante la etapa de elevado crecimiento. UBACyT O 003 y O004.

**0645. (0693) EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN MACRÓFAGOS ALVEOLARES. EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE ZINC.** V Biaggio, V Nollac, N Gomez, MS Giménez

*Lab. de Biología Molecular, Fac. Química Bioquímica y Farmacia (UNSL)*

El Zinc es un nutriente indispensable para el organismo y posee múltiples funciones tales como la de participar en el sitio catalítico de numerosas enzimas, estabilizador de membranas biológicas, entre otras. Por otra parte, los macrófagos alveolares (MAs) son células fagocitarias mononucleares esenciales en la respuesta inflamatoria. Nuestro objetivo fue conocer cual es la participación de los MAs en un proceso inflamatorio producido por

una deficiencia moderada de Zinc (ZD) y además si se revierte el daño oxidativo cuando los animales son realimentados (Ral). Para ello se utilizaron ratas Wistar macho de (200 ± 20g), separados en tres lotes: Grupo Control (Co) con un contenido de Zn de 30 mg/Kg de dieta, un lote con una dieta deficiente de Zinc 5mg/Kg y un tercer lote (Ral) que recibió una dieta ZD y se realimentaron luego por 10 días con una dieta Control. Se obtuvieron los MAs a través de lavados broncoalveolares (BAL) y a partir de los cuales se determinó la expresión de iNOS, NOX-2, SOD, GPX-1 y CAT. El RNA total fue obtenido usando Trizol y las alícuotas se amplificaron por PCR, usando β-actina como gen control. Además, las proteínas de los MAs se separaron en SDS-PAGE 8% y se identificaron por western blot. La expresión de iNOS y NOX-2 (p<0,001) contribuyen al estrés oxidativo al incrementar significativamente en ZD (p<0,01). SOD-2 incrementó significativamente en ZD (p<0,001) y los valores no se revierten en Ral. En ZD aumentó GPx (p<0,05) al igual que CAT (p<0,001), mientras que al realimentarlas alcanza los valores controles CAT ya que GPx (p<0,01) no se recupera al comparar con grupo Co. Se concluye que los MAs participarían activamente en el cuadro inflamatorio aumentando su producción de radicales libres en pulmón ZD. No obstante, al realimentar ZD se revierten los niveles de mRNA de algunas de las enzimas del sistema de defensa antioxidante, por lo que en los Ral se mantendría el ambiente prooxidante y proinflamatorio en estas cond. experimentales.

**0646. (0316) INTERLEUQUINA-6 Y RECEPTOR DE INTERLEUQUINA-6 EN PACIENTES CRÍTICOS CON NUTRICIÓN PARENTERAL TOTAL: SU RELACIÓN CON EL ZINC DE LAS FÓRMULAS Y CON ZINC PLASMÁTICO.** SN Zeni<sup>1</sup>, AM Menéndez<sup>2</sup>, H Montemerlo<sup>2</sup>, ME Guidoni<sup>2</sup>, AR Weisstaub<sup>1</sup>, ML Pita Martín de Portela<sup>1</sup>

*1 Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, 2 Instituto Argentino de Educación e Investigación en Nutrición*

La Interleuquina 6 (IL-6), citoquina producida en la fase aguda de procesos inflamatorios, puede circular libre o unida al receptor soluble (IL6sR). El Zinc (Zn) juega un rol importante en su liberación y su exceso exacerba la fase aguda del proceso inflamatorio. Se aconseja suministrar a pacientes con Nutrición Parenteral Total (NPT) entre 1.5 y 5 mg/día, pero las cantidades administradas suelen ser mayores. El objetivo del trabajo fue estudiar la respuesta de la IL-6 sérica y del IL6sR en relación a los niveles de Zn en plasma (ZnPI) y al Zn administrado en la NPT. Se estudiaron 12 pacientes adultos, con pancreatitis aguda o luego de una cirugía abdominal mayor (cáncer o fístula intestinal). Al inicio de la NPT (To) y a su finalización (Tf) (10-14 días) se determinó en suero: IL-6 y IL-6 sR, por ELISA (EASIAM, BioSource International, USA); PCR ultrasensible (PCR us) (inmunoturbidimetría, CRP Latex HS); ZnPI y en las NPT (Espectrometría de Absorción Atómica). El aporte de Zn (mg/día) fue de 6.9±1.7 (rango 4.8 a 10.8). Los resultados (promedio±DS y rangos) fueron: To y Tf, respectivamente: Zn PI (µg/dl) 118±59 (35-226); 122±57 (39-225). IL-6 (pg/mL) 134±98 (48-465); 101±30 (49-150); IL6sR: 1369±861 (589-4385); 1408±542 (635-2993). PCR us (mg/L): 86±63 (0.3-196); 76±84 (18-312). No existió correlación entre IL6, IL6sR, PCR, Zn PI y Zn en TPN (mg/d), pero la variación de la suma IL6+IL6 sR presentó una tendencia a incrementarse en función del Zn administrado (p=0.08). Un paciente falleció. En los 11 con evolución favorable la IL6 correlacionó inversamente con las variaciones de Zn PI (r=0.883; p=0.00014). Conclusiones: en los pacientes estudiados no se produjo un incremento indeseable de la respuesta de la IL-6, del IL6sR ni de la PCR; sin embargo, la variación de [IL6+IL6 sR] presentó un incremento en la respuesta al administrar cantidades superiores a 8 mg/d de Zn, cifra que sería aconsejable no sobrepasar en la NPT. Financiado por SubCyT, UBA, B 103.

**0647. (0325) VARIACIÓN DE LOS MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA.** SM Ferreira, F Lerner, PA Evelson, SF Llesuy

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

El objetivo de trabajo fue evaluar marcadores de daño oxidativo en función del tiempo en un modelo de glaucoma. Se utilizaron ratas Wistar generándose glaucoma por cauterización de dos venas episclerales del ojo izquierdo. Los parámetros evaluados fueron: capacidad antioxidante (TRAP), sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y nitritos. Los nitritos y TBARS se determinaron por espectrofotometría. El TRAP se determinó por luminiscencia. En el nervio óptico los valores de TBARS fueron 6,9 ± 0,5 nmoles/ mg proteína\* (7 días), 9,4 ± 0,4 nmoles/ mg proteína\* (15 días), 18,0 ± 1,2 nmoles/ mg proteína\* (30 días) 43,1 ± 5,3 nmoles/ mg proteína\* (60 días) (control 1,9 ± 0,1 nmoles/mg proteína \* p < 0,001). En el nervio óptico la concentración de nitritos fue 37,0 ± 1,8 mM\* (7 días) 21,9 ± 0,8 mM\* (15 días), 57,6 ± 2,3 mM\* (30 días) 18,0 ± 0,9 mM\* (60 días) (control 9,5 ± 0,8 mM \*p < 0,01). En el humor vítreo los valores de TRAP fueron 248 ± 24 µM Trolox (7 días), 240 ± 16 µM Trolox (15 días), 196 ± 14 µM Trolox (30 días) 92 ± 8 µM\* Trolox (60 días) (control 219 ± 24 µM Trolox \*p < 0,01). En el humor acuoso los valores de TRAP fueron 75 ± 7 µM Trolox\* (7 días), 96 ± 14 µM Trolox\* (15 días), 56 ± 9 µM Trolox\* (30 días), 142 ± 7 µM Trolox\* (60 días), (control 192 ± 4 µM Trolox \*p < 0,01). Estos resultados sugieren que en estadios tempranos, el daño oxidativo es compensado por la disminución de antioxidantes en el humor acuoso que dejarían a la cámara anterior desprotegida lo que se traduciría en mayor daño y muerte de células del trabeculado generando hipertensión ocular. En estadios tardíos hay una disminución significativa de antioxidantes en el humor vítreo, dejando a la retina desprotegida, situación reflejada por un aumento del contenido de óxido nítrico y un aumento de la peroxidación lipídica en la cabeza del nervio óptico.

**0648. (0544). ADENOSINA DEAMINASA: UTILIDAD EN LOS ESTUDIOS DE NUTRICIÓN.** MS Feliu, P Perris, N Slobodianik

*Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*

**Introducción:** Algunos investigadores señalan la estrecha interrelación entre el desarrollo y funcionamiento de los linfocitos T con la actividad de Adenosina Deaminasa (ADA). Trabajos previos de nuestro grupo, en modelo experimental, han demostrado que el estrés nutricional causado por la distorsión de nutrientes en la dieta provoca incremento en la actividad de ADA en timo de rata; además, se ha demostrado aumento en la actividad de esta enzima en suero y otros fluidos biológicos de pacientes con patologías que comprometen los mecanismos de defensa. El objetivo de este trabajo es analizar si la determinación de la actividad de ADA en suero podría considerarse parámetro bioquímico funcional en el seguimiento de poblaciones en riesgo nutricional. Para ello se analiza la actividad sérica de ADA en individuos, en diferentes situaciones fisiopatológicas, en los cuales se observó compromiso del estado nutricional, evaluado a través de diferentes indicadores. **Materiales y Métodos:** Se estudiaron mujeres con Anorexia Nerviosa (AN, 14-32 años, Índice de masa corporal Kg/m<sup>2</sup>: 17.9±1.8); niños obesos de ambos sexos (O, 5-13 años, Índice de masa corporal Kg/m<sup>2</sup>: 27.4+4.3) y niños con fibrosis quística (FQ, 5 meses-9 años). Se extrajo sangre en ayunas y en el suero se determinó la actividad de ADA, por método de Giusti y Galante. Los valores de cada grupo fueron comparados, aplicando el test de Student, con los obtenidos en individuos sanos de igual edad (C). Los resultados se expresaron en X ± DE (UI/L). **Resultados y Discusión**

Pacientes	AN	C	O	C	FQ	C
n	26	22	33	48	16	48
ADA	25.7±8.2*	21.0±4.6	27.1±9.1*	23.0±5.6	36.3±15.8*	23.0±5.6

\* (p<0.02) con respecto a C.

Los resultados de este trabajo muestran incremento en la actividad de ADA, en los grupos estudiados. El análisis integral de los hallazgos refuerzan la hipótesis de proponer la determinación de la actividad sérica de ADA, como un indicador funcional relacionado con los mecanismos de defensa en los estudios de nutrición. Parcialmente financiado por UBA (B060).

**0649. (0170) EFECTOS EN YEYUNO DEL AGREGADO DE FIBRA EN LA DIETA DE RATAS MACHO LINEA BETA DESDE EL DESTETE A LOS 80 DIAS DE EDAD.** MF Podestá<sup>1</sup>, N Hisano<sup>1</sup>, C Martínez<sup>2</sup>, M Posadas<sup>3</sup>, MC Olguin<sup>4</sup>

*1 Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, 2 Área Estadística y Procesamiento de Datos, FCByF, UNR, 3 Cátedra de Biología, FCM, UNR, 4 Cátedra de Bromatología, FCByF, UNR*

Se analiza la estructura del Plexo de Auerbach y la histomorfometría del yeyuno de ratas macho a las cuales se les agregó fibra insoluble en su dieta. 12 ratas macho Sprague Dawley postdestete fueron separadas en 'a' 4 ratas alimentadas con alimento balanceado comercial, 'b' 4 ratas con dieta con fibra de soja, y 'c' 4 ratas se les adicionó celulosa, desde el destete a la autopsia (80 días de edad). Sus intestinos fueron disecados, lavados con PBS, pesados y medidos. Un segmento fue fijado en paraformaldehído 4% en PBS para la técnica histoquímica del NADPH para proceder al recuento neuronal. Otros segmentos fueron fijados en Carnoy para estudio histomorfométrico, coloreados con H-E y alcian blue al 2.5%. Se midieron: peso corporal, espesor de pared intestinal, mucosa y muscular, ancho y longitud vellositaria, profundidad de la cripta y cantidad de enterocitos y células caliciformes por vellosidad, cantidad de neuronas NADPH+. Los resultados se expresan en media  $\pm$  SEM. Fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis encontrándose solamente resultados levemente significativos para cantidad de enterocitos por vellosidad ( $p=0.077$ ). Luego de aplicar los contrastes de Dunn, se concluye que 'a' ( $109.5 \pm 3.83$ ) > 'b' ( $93.22 \pm 0.57$ ), encontrándose 'c' ( $106.67 \pm 2.22$ ) en una posición ambigua con respecto a las anteriores. Se detectó también una diferencia significativa para cantidad de células caliciformes por vellosidad ( $p=0.024$ ), encontrándose que 'b' ( $33.87 \pm 4.79$ ) > 'a' ( $21 \pm 1.68$ ), ocupando 'c' ( $29.55 \pm 6.28$ ) una posición ambigua. Se puede concluir entonces que en las ratas con dieta con fibra de soja se encontró menor cantidad de enterocitos y mayor cantidad de células caliciformes por vellosidad.

## ENDOCRINOLOGÍA VI

**0650. (0182) EFECTOS DE LA DIETA RICA EN FRUCTOSA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO Y LA FUNCIÓN ENDOCRINA DEL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL.** A Alzamendi<sup>1</sup>, A Giovambattista<sup>1</sup>, A Raschia<sup>2</sup>, C Marra<sup>3</sup>, E Spinedi<sup>1</sup>, OR Rebollo<sup>2</sup>

*1 IMBICE (CONICET-CICPBA), 2 GENEXA (UNLP-CONICET), 3 INIBIOLP (UNLP-CONICET)*

**Objetivo:** evaluar cambios en el metabolismo lipídico y la función endocrina del tejido adiposo visceral (TAV) de ratas con síndrome metabólico (SM) inducido por dieta rica en fructosa (DRF) (10% en el agua de bebida [F10]) durante tres semanas. Metodología: sacrificamos ratas Wistar macho normales (F0) y F10 en condición basal, recogiendo sangre del tronco corporal y removiendo TAV para determinar composición (HPLC) y liberación *in vitro* de ácidos grasos libres (AGL) de triglicéridos (TG) y aislar adipocitos. Los adipocitos se incubaron (30 min) sin y con insulina (0,1; 1 y 10 nM). **Resultados:** las ratas F10 aumentaron significativamente sus niveles circulantes de TG (F10 vs. F0:  $0,99 \pm 0,07$  vs.  $0,74 \pm 0,06$  g/l;  $p < 0,05$ ) y leptina ( $6,29 \pm 0,64$  vs.  $3,37 \pm 0,52$  ng/ml;  $p < 0,05$ ), sin cambios significativos en los de colesterol total, glucosa e insulina. En el TAV de las ratas F10 aumentó la liberación de AGL *in vitro* (F10 vs. F0:  $0,821 \pm 0,083$  vs.  $0,503 \pm$

$0,065$  mg AGL/g TAV;  $p < 0,02$ ) y la proporción de AG saturados ( $71,0 \pm 1,1$  vs.  $50,9 \pm 1,0$ ;  $p < 0,001$ ) con disminución de la de AG poliinsaturados ( $30,7 \pm 1,1$  vs.  $56,1 \pm 2,0$ ;  $p < 0,001$ ). La expresión de ARNm (qRT-PCR) de leptina en TAV fue 70% mayor en ratas F10 ( $p < 0,05$  vs. F0), mientras que la de IRS-1 e IRS-2 disminuyó a 8 y 21%, respectivamente ( $p < 0,05$  vs. F0). Adipocitos aislados de TAV de ratas F10 incubados liberaron espontáneamente mayor cantidad de leptina (F10 vs. F0:  $0,36 \pm 0,02$  vs.  $0,22 \pm 0,01$  ng/ml;  $p < 0,05$ ). La respuesta de los adipocitos F10 a la insulina disminuyó significativamente (ANOVA,  $p < 0,05$  vs. F0). **Conclusión:** la DRF administrada por tres semanas induce el desarrollo precoz de hipertrigliceridemia e hiperleptinemia y cambios en el TAV: composición y liberación de IRS-1 e IRS-2, y disminución de la sensibilidad a la insulina y de sus mediadores intracelulares. Los cambios del TAV contribuirían a inducir la disfunción endocrino-metabólica característica del SM presente en estos animales.

**0651. (0631). FACTORES DE INHIBICIÓN LIPÍDICA SECRETADOS POR CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS: EFECTO SOBRE DIFERENCIACIÓN DE ADIPOCITOS Y METABOLISMO OXIDATIVO.** D Sapochnik<sup>1</sup>, G Piwien<sup>2</sup>, M Croce<sup>1</sup>, JC Calvo<sup>1,3</sup>, LN Guerra<sup>1</sup>

*1 Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, 2 Fundación Instituto Leloir, 3 IBYME*

Factores proteicos derivados de células epiteliales mamarias murinas (NMMG) inhiben la acumulación de lípidos en adipocitos 3T3-L1. Aquí estudiamos su efecto temporal sobre 3T3-L1 y preadipocitos primarios de ratón CF1, como también la expresión del factor de transcripción c/EBP beta y metabolismo oxidativo. Medio condicionado de NMMG (MC), se obtuvo en SFB al 1%. Los preadipocitos se cultivaron hasta 80% confluencia y diferenciaron (isobutilmetilxantina, dexametasona e insulina) en presencia o ausencia de MC y/o en presencia o ausencia de N-acetilcisteína (NAC). Control positivo (CP): células diferenciadas. Los triglicéridos (Tg) fueron índice de diferenciación. La diferenciación de 3T3-L1 produjo  $2.74 + 0.49$  ugTg/ug prot (basal  $0.45 + 0.21$  ug Tg/ug prot). Tratamiento con MC al momento de comenzar la diferenciación (to) o después de 24h (t24) provocó inhibición ( $p < 0.01$ ) de la producción de Tg ( $0.49 + 0.02$  y  $0.61 + 0.02$  ug Tg/ug prot respectivamente). La diferenciación del cultivo primario produjo una acumulación significativa de Tg (CP:  $0.18 + 0.02$  vs control basal:  $0.08 + 0.01$  ugTg/ug prot  $p < 0.01$ ). MC inhibió la acumulación lipídica (61% vs CP), mostrando efecto temporal en su inhibición (to: 53% y t24: 64% de inhibición). **Resultados** muestran que la expresión de c/EBP beta disminuye en presencia del factor (Western blot). El tratamiento con NAC inhibió la acumulación de lípidos a 10uM: CP vs CP + NAC:  $46.7 + 2.3\%$ ,  $p < 0.05$ ; a 5uM de NAC o en conjunto con MC no se observaron diferencias versus CP. MC actuaría tempranamente sobre la acumulación lipídica, posiblemente modificando expresión de factores de transcripción. Si bien NAC evitaría la acumulación de lípidos no se observó efecto sinérgico con MC, sugiriendo otra vía de acción.

**0652. (0041) EL TRATAMIENTO *IN VIVO* CON CROMO VI INDUCE ESTRÉS OXIDATIVO EN ADENOHIPOFISIS DE RATA.** FA Quinteros, LI Machiavelli, SI Nudler, EA Miler, BH Duvilanski

*Departamento de Química Biológica, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junin 956, Buenos Aires, Argentina. neuroend@ffyba.uba.ar*

**Resultados** previos de nuestro laboratorio muestran que el cromo VI (Cr VI), administrado *in vivo*, se acumula en hipófisis. Los estudios *in vitro* demuestran que el metal produce apoptosis de las células adenohipofisarias, posiblemente debido a la generación de estrés oxidativo. **Objetivo:** investigar si el Cr VI administrado *in vivo* genera estrés oxidativo en la glándula pituitaria. Ratas macho Wistar de dos meses de edad fueron expuestas a 100 ppm de Cr VI en el agua de bebida durante 30 días. La ad-

ministración de Cr VI indujo un aumento de la peroxidación lipídica (TBARS) en la adenohipófisis de las ratas expuestas con respecto al control (nmoles MDA/mg prot, % del control, Cr VI:  $163.5 \pm 17.5$   $p < 0.05$ ). Entre las enzimas antioxidantes, la actividad de la glutatión reductasa (GR) exhibió un aumento de un 30% en relación al control. La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa no se vio modificada significativamente con el tratamiento (métodos espectrofotométricos). Nuestros resultados demuestran que la administración *in vivo* de Cr VI induce estrés oxidativo que se manifiesta a través de un aumento de la peroxidación lipídica y una respuesta antioxidante por parte de la GR. Estos resultados validan los resultados obtenidos *in vitro* y sugieren que la hipófisis puede ser un blanco de toxicidad del metal lo cual podría estar relacionado con los efectos adversos observados a nivel de sistema reproductivo.

**0653. (0379) EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO MODERADO SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA DIABÉTICA Y SU RESPUESTA INMUNE.** R Rubinstein, AM Genaro, MR Wald

CEFYBO - CONICET-UBA

Clínicamente se sugiere una asociación entre el estado diabético y la inmunosupresión, así como también la participación de factores psicosociales en el desarrollo y evolución de la diabetes. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del estrés sobre la instauración y evolución de la patología diabética y su correlación con la respuesta inmune. La diabetes tipo I se indujo mediante la administración de estreptozotocina (45 mg/kg) en ratones BALB/c, caracterizado por hiperglucemias leves y buena sobrevida. Los mismos fueron sometidos a un modelo de estrés crónico moderado (CMS) comenzando su exposición antes o después de la inducción del estado diabético. La exposición previa al CMS resultó en un significativo retardo en la instauración del estado diabético respecto al control (c) (tiempo (días):  $c = 15 \pm 3$ ,  $+CMS = 45 \pm 6$ ,  $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ). Contrariamente, la exposición a CMS después de inducida la diabetes condujo a un importante incremento en las glucemias (mg/dl, día 15:  $c = 159 \pm 14$ ,  $+CMS = 202 \pm 20$ ; día 86:  $c = 168 \pm 21$ ,  $+CMS = 360 \pm 18$  ( $p < 0.01$ ),  $n = 15$ ). Los niveles de hemoglobina glicosilada se correlacionaron con los niveles de glucemia. No hubo una diferencia significativa en la sobrevida de ambos grupos. Por otra parte, el estrés afectó la respuesta proliferativa de linfocitos T (LT) y B (LB) inducida por mitógenos y determinada por incorporación de  $^3H$ -Timidina. El estado diabético disminuyó la proliferación linfocitaria, situación agravada por la exposición posterior al CMS, siendo el efecto más significativo luego de 3 y 6 semanas de la exposición a CMS para LT y LB respectivamente (% respecto normal, LT: diabético( $d$ ) =  $91 \pm 2$ ,  $d+CMS = 49 \pm 12$ ; LB:  $d = 65 \pm 8$ ,  $d+CMS = 49 \pm 7$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ). Los resultados demuestran que el estrés influencia la evolución de la patología diabética en cuanto a su glucemia como así también en su respuesta inmune. Estas evidencias sentarían las bases de considerar al estrés como un importante factor de riesgo en la patología diabética.

**0654. (0692) EFECTO DE LA INMUNOFILINA PP5 SOBRE EL MECANISMO DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES.** MG Davies Sala, MD Galigniana

Fundación Instituto Leloir

El receptor de glucocorticoides (GR) forma un complejo con hsp90, hsp70, p23 y una inmunofilina. GR no está estáticamente confinado en un compartimiento celular sino que transita dinámicamente entre el citoplasma y el núcleo. En ausencia de hormona, GR es primariamente citoplasmático. Entre las inmunofilinas asociadas al complejo, FKBP52 y PP5 son capaces de interactuar con dineína vía el dominio PPI, el que posee actividad de peptidil-prolil isomerasa. PP5 se une al complejo GR•hsp90 por su dominio TPR. PP5 también posee actividad de Ser/Thr-fosfatasa. La función de PP5 en el complejo con GR es aún desconocida, por lo que estudiamos si podría estar involucrada en la localización

celular de GR. La sobreexpresión de PP5 retardó tanto la velocidad de importación como la de exportación de GFP-GR. Notablemente, en ausencia de esteroide, la relación GR nuclear/GR citoplasmático es mayor que en células que no sobreexpresan PP5. El inhibidor de fosfatasa ácido okadaico y el inhibidor de la actividad de isomerasa FK506 no afectan la distribución de GR. La sobreexpresión del dominio TPR de PP5 hace que la importación de GR no sólo sea más lenta al desacoplarse el complejo hsp90•inmunofilina•dineína, sino que en ausencia de esteroide, el 100% de la población de GFP-GR se excluya del núcleo. Por otra parte, el "knock-down" de PP5 con un siRNA específico hizo que aún en ausencia de hormona, PP5 sea constitutivamente nuclear. Esta observación no parece estar relacionada con una inhibición masiva e inespecífica de la importación nuclear de proteínas ya que otros factores nucleares no se ven afectados. Estos estudios son los primeros que se han realizado hasta el presente en donde se evidencia la participación activa de esta inmunofilina en el mecanismo de localización subcelular de GR, siendo aparente que tal propiedad es debida a interacciones proteína-proteína de PP5 con otros factores antes que debidas a sus actividades enzimáticas intrínsecas.

**0655. (0636) EL OLIGONUCLEÓTIDO IMT504 MEJORA LA GLUCEMIA Y LA RECUPERACIÓN DE ISLOTES EN UN MODELO DE DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA.** MS Bianchi<sup>1</sup>, A Hernando-Insúa<sup>2</sup>, J Rodríguez<sup>2</sup>, F Elías<sup>2</sup>, C Mirabelli<sup>3</sup>, N Lago<sup>3</sup>, J Zorzopulos<sup>2</sup>, NA Chasseing<sup>1</sup>, A Montaner<sup>2</sup>, C Libertun<sup>1,4</sup>, V Lux Lantos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET). Buenos Aires, Argentina., <sup>2</sup> Immunotech S.A. Buenos Aires, Argentina., <sup>3</sup> Gemma Biotech. Buenos Aires, Argentina, <sup>4</sup> Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

El prototipo de oligonucleótidos inmunomoduladores de la clase PyNTTTTGT (ODN): IMT504 estimula la expansión de Células Madres Mesenquimales (MSC) "in vitro" e "in vivo". Aquí evaluamos el efecto de la administración del IMT504 en un modelo de diabetes inducido por estreptozotocina (STZ) en ratas macho Sprague-Dawley de 200 g de peso. Se inyectaron ratas con STZ (60 mg/kg, ip en buffer citrato) o diluyente como control (C). La glucemia (Gluc) en C es  $120 \pm 10$  mg/dl. Los animales con Gluc  $\geq 200$  mg/dl (rango: 200-500 mg/dl) 3 días post STZ, considerados diabéticos, recibieron 10 dosis de ODN (40mg/dosis/día, sc: STZ-ODN) o salina como control (STZ). También se inyectaron C con las mismas dosis de ODN (C-ODN). La Gluc fue medida periódicamente durante 30 días en sangre de cola con un glucometer. Al finalizar se realizó un test de tolerancia a la glucosa (GTT, glucosa 2 g/kg ip y se midió la Gluc a los 0, 30, 60 y 120 min) en C y STZ-ODN. Se sacrificaron los animales y se recolectaron los páncreas para estudios histológicos. El ODN no modificó la Gluc en C-ODN. El tratamiento con ODN indujo una sensible disminución de la Gluc (día 8, Gluc (mg/dl)= STZ:  $341 \pm 21$  vs STZ-ODN:  $203 \pm 42$ ,  $p < 0.05$ ), manteniéndose esta diferencia a lo largo del estudio. Al analizar separadamente el efecto de ODN en animales diabéticos con Gluc iniciales  $\leq 350$  mg/dl (STZ baja-ODN), se observó que luego de 5 dosis de ODN la Gluc disminuyó a valores de C ( $128 \pm 18$  mg/dl), manteniéndose estable posteriormente. Sin embargo, los GTT mostraron diferencias a los 30 min post-glucosa (C:  $284 \pm 20$  vs STZ baja-OND:  $389 \pm 35$   $p < 0.05$ ), normalizándose posteriormente. Análisis histomorfológicos de secciones pancreáticas mostraron severos daños en los islotes de Langerhans en STZ y un recupero de los mismos en STZ-ODN. Concluimos que el tratamiento sistémico con IMT504 puede atenuar la condición diabética inducida por STZ, señalando la posibilidad de este abordaje terapéutico en la diabetes. (CONICET, UBA, ANCYPT).

**0656. (0438) EFECTO DE LA INDOMETACINA SOBRE LA INDUCCIÓN DE LA ÓXIDO NITRICO SINTASA (NOS) Y LA GENERACION DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATAS TRATADAS CON LIPOPOLISA-**

**CÁRIDO BACTERIANO (LPS).** JM Di Gruccio<sup>1</sup>, EM Repetto<sup>1</sup>, JM Cipelli<sup>1</sup>, F Astort<sup>1</sup>, R Sanchez<sup>1</sup>, C Martinez Calejman<sup>1</sup>, M McCormick<sup>1</sup>, P Arias<sup>2</sup>, CB Cymeryng<sup>1</sup>

1 Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. UBA. CEFYBO-CONICET, 2 Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina.UBA

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron la inducción de los sistemas de hemo oxigenasa y NOS por LPS en corteza adrenal de rata. Se ha sugerido que, además del NO y del CO, también las prostaglandinas modularían la respuesta adrenal al LPS. **Objetivos:** evaluar el efecto de la indometacina (Ind), inhibidor de la ciclo oxigenasa (COX) sobre la actividad de NOS y sobre parámetros oxidativos en corteza adrenal de ratas tratadas con LPS. **Metodología:** ratas Wistar macho adultas fueron tratadas con vehículo (controles, C), LPS (500 µg/kg ip), Ind (12.5 mg/kg sc), o LPS+Ind. A las 12 h de la inyección fueron sacrificadas, las suprarrenales fueron extraídas y se disecó la corteza, midiéndose actividad de NOS, niveles de TBARS y mecanismos de citoprotección (glutación reducido o GSH, catalasa). **Resultados:** el aumento en la actividad de NOS inducido por LPS fue prevenido por el tratamiento con Ind. El tratamiento con LPS disminuyó además los niveles de GSH tanto en ausencia como en presencia de Ind. Los niveles de lipoperoxidos (TBARS) no fueron afectados por LPS pero disminuyeron en los grupos que recibieron Ind. La actividad de catalasa aumentó únicamente en el grupo tratado con LPS. **Conclusión:** en el modelo estudiado el LPS produce un incremento del estrés oxidativo, con mayor consumo de GSH y actividad de catalasa, mecanismos destinados a evitar fenómenos ulteriores como la lipoperoxidación. Como en otros tejidos/sistemas celulares, el sistema de la COX interviene en la regulación de la actividad de NOS por LPS.

	C	LPS	Ind	LPS + Ind
NOS	8.1	41.7*	17.3	19.5+
GSH	106.7	73.2\$	114.7	75.7**
TBARS	365.8	377.7	231.8&	225.0&

\* p< 0.001 vs. C + p< 0.01 vs. LPS \$ p< 0.01 vs. C \*\* p< 0.01 vs. Ind & p< 0.05 vs. C LPS

**0657. (0362) EFECTO DIFERENCIAL DE LA LEPTINA SOBRE SUS RECEPTORES DURANTE EL PROCESO OVULATORIO DE LA RATA.** MP Di Yorío<sup>1</sup>, MG Bilbao<sup>1</sup>, AG Faletti<sup>1,2</sup>

1 CEFYBO-CONICET, 2 DTO. QCA biológica, FCEyN-UBA

La leptina, proteína codificada por el gen de la obesidad, es capaz de ejercer efectos bifásicos sobre la función ovárica, dosis dependiente. En este trabajo estudiamos si el efecto de la leptina estaba relacionado con la expresión de sus receptores en el eje hipotálamo-adenohipófisis-ovario (HAO). Utilizamos ratas estimuladas con eCG/hCG para inducir su primera ovulación. Por Western Blot, evidenciamos la expresión de ambos tipos de receptores (OB-R), isoforma larga y corta. eCG aumentó la expresión de ambos OB-R en los tejidos ensayados a distintos tiempos: en H aumentó (74%) a las 24 h post eCG (p<0.01) retornando luego a sus valores basales; en A y O aumentaron también a las 24 h pero se mantuvieron elevados incluso después de la hCG (A: 119%, O: 94%, p<0.01). Para estudiar la acción de leptina sobre la expresión de sus OB-R se realizaron cultivos de los distintos tejidos obtenidos de ratas estimuladas con gonadotrofinas, en ausencia (C) y presencia de leptina (L0.3-500 ng/ml). Ambas isoformas mostraron un perfil similar dentro del mismo tejido pero diferente en cada uno de ellos. En H se observó que disminuye a bajos y aumenta a altos niveles de leptina (p<0.05). La concentración de LHRH en el medio de incubación, determinada por RIA, mostró la misma respuesta bifásica (C: 10±1, L1ng/ml: 18±2; L500ng/ml: 6±2 pg/H, p<0.05). En A se observó aumento de expresión de OB-R sólo a concentraciones intermedias (p<0.01). Los ovarios presentaron mayor expresión en casi todas las concentraciones ensayadas (p<0.05 vs C) pero se observó una respuesta bifásica sobre la producción de progesterona, determinada por RIA en el medio de incubación (C: 18±2, L10ng/ml: 31±2; L300ng/ml: 8±2 ng/mg prot, p<0.05). Estos resultados revelan que la leptina es capaz de modular en forma diferencial la expresión de sus

receptores en el eje reproductivo durante el proceso ovulatorio, y de ello dependería, al menos en parte, la respuesta generada en cada tejido.

**0658. (0028) EFECTO DEL ESTRÉS SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO.** ME Altuna<sup>1,2</sup>, MB Mazzetti<sup>2</sup>, LF Rago<sup>2</sup>, LC San Martín de Viale<sup>1,2</sup>, MC Damasco<sup>1,2</sup>

1 CONICET., 2 Departamento de Química Biológica, FCEyN. UBA.

En trabajos previos observamos que el estrés incrementaba la actividad de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 (HSD1) hepática produciendo alteraciones en el metabolismo hidrocarbonato y que la administración de ácido glicirretínico (AG), un potente inhibidor de la HSD1, disminuía su actividad en animales estresados y controles (sin estresar), y en la glucemia. El objetivo del presente trabajo es estudiar el efecto del AG sobre la actividad de la HSD1, y su relación con el metabolismo hepático, para ello medimos las actividades de la HSD1 mediante la interconversión de corticosterona en 11 dehidrocorticosterona, la PEPCCK, enzima reguladora de la gluconeogénesis, mediante la cinética de desaparición de NADH por espectrofotometría, la glucógeno fosforilasa (GP), enzima involucrada en la glucólisis, por método colorimétrico y su relación con la glucemia (mediante un kit enzimático), en ratas estresadas y controles. Utilizamos 4 grupos: Grupo Control; Grupo Control+AG; Grupo HCl (estresado) y Grupo HCl+AG. El tratamiento con AG produjo: disminución de la actividad de HSD1 en todos los grupos, en Controles en un 24% y en estresados (HCl) en un 26% vs. Control (p<0.01) y en un 53% vs. HCl (p<0.001); en la PEPCCK una disminución de un 35% en el grupo HCl+AG vs. HCl (p<0.001), y una diferencia del 20% entre los controles y los HCl+AG (p<0.001); en la actividad de la GP se observó una disminución de la actividad del 27% en el grupo HCl+AG vs. grupo estresado (p<0.001), y una diferencia del 31% entre los controles y los HCl+AG (p<0.001). La glucemia disminuyó en el grupo HCl+AG un 33% vs. HCl (p<0.001), retornando a los valores controles. Los resultados sugieren que el aumento de la actividad de la HSD1 hepática producida por estrés es responsable del incremento de las enzimas gluconeogénicas y glucogenolíticas, con el consecuente incremento de la glucemia.

**0659. (0575) ES VALIDO EXTRAPOLAR DATOS OBTENIDOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION A HUMANOS? PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MUJERES Y RATAS HIPOTIROIDEAS.** MJ Coria<sup>1</sup>, AI Pastrán<sup>2</sup>, MS Giménez<sup>1</sup>

1 Universidad Nacional de San Luis, 2 Hospital San Luis

Es común usar animales de laboratorio para simular modelos de enfermedad en humanos y luego extrapolar los resultados. Nuestro objetivo fue verificar si existe relación entre los resultados obtenidos en ratas hipotiroideas midiendo en suero parámetros de estrés oxidativo y defensa antioxidante y los obtenidos en mujeres hipotiroideas de edad fértil. **Materiales y métodos:** en el suero de 12 ratas Wistar controles (rC) y 12 hipotiroideas (rHT) (por agregado de propiltiouracilo, 1mg/l, en el agua de bebida por un mes) y en el de 28 mujeres controles (C), 20 hipotiroideas (HT) y 33 hipotiroideas subclínicas (HS) se determinó TSH y T4L (por quimioluminiscencia), óxido nítrico (NO) por el método de Griess, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y paraoxonasa (arilesterasa) (PON-1). **Resultados:** Los niveles de TSH (µUI/ml) y T4L (ng/dl) fueron en rC 1.138 ± 0.2300 y 2.848 ± 0.2850, en rHT 33.86 ± 5.104 y 0.1150 ± 0.01190, en mujeres C 2.291 ± 0.1689 y 1.106 ± 0.03757, en HT 65.98 ± 17.88 y 0.5989 ± 0.04351 y en HS 11.46 ± 1.908 y 1.102 ± 0.04242 respectivamente. En rHT no se modificaron significativamente los niveles séricos de TBARS ni NO en relación a rC, pero sí disminuyeron los niveles de PON-1 (rC 1726.1 ± 39.09 U/min y rHT 355.5 ± 37.25, p<0.0001). En mujeres HT los niveles de NO aumentaron significativamente con respecto a C e HS (20.72 ± 2.500 µM/mg proteínas vs 11.75 ± 1.526 p < 0.01 y vs 12.11 ± 1.496 p < 0.01 respectivamente). En el grupo C los TBARS disminuyeron

significativamente en relación a HT e HS ( $0.856 \pm 0.765$  nm/mg prot vs  $5.575 \pm 4.961$  p < 0.01 y vs  $5.647 \pm 4.537$  p < 0.001 respectivamente). La PON-1 no mostró diferencias entre los tres grupos. **Conclusiones:** a pesar de que este modelo en ratas simula eficientemente el hipotiroidismo humano, en cuanto a valores hormonales, no sería válido extrapolar a humanos los cambios a nivel de los parámetros séricos de estrés oxidativo y defensa antioxidante medidos.

**0660. (0370) LUZ CONSTANTE CRÓNICA PRENATAL Y COMPORTAMIENTO A LARGO PLAZO: EFECTO DE MELATONINA DURANTE LA GESTACIÓN.** M: V Compagnucci<sup>2</sup>, NR Conti<sup>4</sup>, AM Vaquero<sup>3</sup>, CD Cisternas<sup>1</sup>, RH Ponce<sup>3</sup>, NT Vermouth<sup>3,4</sup>

*1 Facultad de Ciencias Médicas, UNC. Córdoba, 2 Facultad de Ciencias Médicas, UNC. Córdoba., 3 Facultades de Odontología y Ciencias Médicas, UNC. Córdoba., 4 Facultades de Ciencias Médicas, UNC. Córdoba.*

Condiciones adversas experimentadas por la madre durante la gestación afectan, entre otras, el funcionamiento rítmico del eje hipotalámico-pituitario-adrenal de la cría y ocasionan masculinización incompleta del sistema nervioso central. Por otro lado existen numerosas evidencias del papel antioxidante que posee melatonina (Mel) en diferentes tejidos. En este trabajo se estudió el efecto de la luz constante crónica (LL), como condición adversa, sobre la conducta copulatoria y el índice de ansiedad en crías adultas de ratas. Además, se investigó el posible efecto preventivo de Mel exógena durante la gestación. El tratamiento con LL a madres preñadas se efectuó entre los días 10-20 de gestación. La Mel fue administrada entre los días 17-21 de gestación. Los resultados del test de ansiedad (elevated plus maze) en ratas machos de 60 días de edad mostraron un grado de ansiedad aumentado (p<0,001). Asimismo, el test de conducta copulatoria, efectuado en el día 120 de vida, reveló un incremento en la latencia y una disminución en el número de monta, intromisión y eyaculación, con respecto a los controles (p<0,01). Por el contrario, la administración de Mel a madres LL previno significativamente las alteraciones en los parámetros estudiados. Los resultados sugieren que el estímulo adverso LL, experimentado por la madre en forma crónica durante la gestación, incidiría sobre el deterioro a largo plazo de la conducta copulatoria y del índice de ansiedad en crías de ratas. La administración de Mel a la madre previene los efectos descriptos e indicaría que la hormona posiblemente desencadene un mecanismo antioxidante con acción neuroprotectora, restaurando las conductas estudiadas.

**0661. (0587) MECANISMOS DE ACCIÓN DE AGES (PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA) Y ALENDRONATO SOBRE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS EN CULTIVO: ROL DEL CALCIO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO.** MV Gangoiti, V Arnol, JI Felice, MJ Tolosa, AM Cortizo, AD McCarthy

*Cátedra Bioquímica Patológica – Facultad de Cs Exactas-UNLP*

Previamente demostramos que los AGEs (productos de glicación avanzada) producen efectos nocivos sobre los osteoblastos en cultivo, como acción pro-apoptótica, aumento del estrés oxidativo, disminución de la proliferación y de la diferenciación osteoblástica. El Alendronato (un bisfosfonato), al ser coincubado con los AGEs, es capaz de bloquear tales efectos. En este trabajo profundizamos el estudio sobre los mecanismos de acción de AGEs y Alendronato, analizando el rol del calcio y de la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS) en células MC3T3E1. Para ello los osteoblastos se cultivaron a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> en presencia de albúmina sérica bovina (BSA) o AGE-BSA (100ug/ml), con o sin Alendronato (10-8M) durante 24hs y en presencia de distintos agentes. (Vitaminas C y E, Nifedipina, BAPTA, EGTA). Los AGEs indujeron un incremento en la formación de ROS (114% basal, p<0.01) (ensayo con dihidrorrodamina 123), el cual fue bloqueado por coincubación con Alendronato. La incubación con vitaminas y Alendronato no alteró la producción

basal de ROS. Sin embargo, la co-incubación de vitaminas C y E, y Alendronato, o la presencia de vitaminas solas previno el estrés oxidativo inducido por los AGEs. Esto sugiere que el Alendronato actuaría evitando la generación de ROS de la misma manera que lo hacen las vitaminas C y E. Por otra parte los AGEs producen una disminución (83% basal, p<0.01) en la proliferación celular (ensayo con Cristal violeta), la cual es prevenida al preincubar las células con Alendronato. La nifedipina (inhibidor de los canales de calcio tipoL) no alteró la acción deletérea de los AGEs, mientras que la co-incubación de nifedipina con Alendronato bloqueó el efecto protector del Alendronato. Estos datos sugieren que los canales tipoL-Ca juegan un rol en el mecanismo de acción del Alendronato pero no en la acción de los AGEs sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo.

**0662. (0282) HOSPITALIZACIONES POR INSUFICIENCIA CARDIACA EN PERSONAS CON DIABETES. LOS COSTOS DE SU PREVENCIÓN VS. LOS DE SU TRATAMIENTO.** JE Caporale<sup>1</sup>, G Pfirter<sup>1</sup>, J Elgart<sup>1</sup>, P Martinez<sup>2</sup>, G Viñes<sup>2</sup>, JJ Gagliardino<sup>1</sup>

*1 CENEXA, Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (UNLP-CONICET, Centro Colaborador OPS/OMS), La Plata, 2 Hospital Privado de Comunidad de Mar del Plata*

**Objetivo:** Comparar el costo real de hospitalizaciones de personas con diabetes tipo 2 (DMT2) por insuficiencia cardíaca (IC) con los de su prevención, según evidencia internacional y simulación, mediante optimización del tratamiento previo. Metodología: Registramos los eventos por IC de personas con DMT2 en el Hospital de Comunidad de Mar del Plata, determinando sus costos y su grado de control metabólico y costo de tratamiento 6 meses antes y después del evento. Simulamos tratamientos farmacológicos intensivos de la hiperglucemia en el período previo (PRE, 6 meses), en personas con HbA1c  $\geq$  7% para verificar su posible beneficio clínico-económico. El análisis de sensibilidad mediante simulación de Montecarlo (10.000 iteraciones) se aplicó a la reducción porcentual del riesgo de IC, al costo del tratamiento farmacológico y al costo del evento de IC con un nivel de confianza del 95%. **Resultados:** Registramos 63 eventos por IC (tasa de mortalidad total: 27%). En el momento PRE, el 49% de los pacientes tenía HbA1c  $\geq$  7% y de éstos el 87% seguía tratamiento farmacológico para su hiperglucemia. El NNT para prevenir un evento de IC fue 3,57 (IC 95%: 2,00-16,67). La Tabla resume los resultados de la simulación:

Tratamiento propuesto <sup>1</sup>	Costo adicional anual/persona (A)	Prob [(A) > \$1.500]
PRE I + POST	\$1.469	36%
PRE II + POST	\$1.554	51%
PRE III + POST	\$1.180	2,3%

1 Metformina, Glibenclámda, Insulina NPH/Corriente (dosis según estándares internacionales de buena práctica clínica ALAD, UKPDS). La variación del costo adicional anual/persona se explica por: 1) costo modulado del evento (coeficiente de correlación (CC): -0,65/-0,71); 2) costo de tiras reactivas (CC: 0,49/0,52); 3) costo de la insulina (CC: 0,32/0,40); y 4) reducción porcentual del riesgo de IC (CC: -0,31/-0,33). **Conclusiones:** El empleo de terapias que controlan efectivamente la hiperglucemia, permitiría prevenir con una pequeña inversión monetaria el desarrollo de eventos de IC en personas con DMT2.

**0663. (0304) ACCION DEL TNFALFA SOBRE EL PROMOTOR DE LA 3BETAHSDII Y LA ESTEROIDOGÉNESIS EN H295R.** N Saraco<sup>1</sup>, C Pepe<sup>1</sup>, MS Baquedano<sup>1</sup>, E Berensztein<sup>1</sup>, MA Costas<sup>2</sup>, MA Rivarola<sup>1</sup>, A Belgorosky<sup>1</sup>

*1 Endocrinología, Hospital de Pediatría Garrahan, 2 Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, IDIM-A Lanari*

El TNF $\alpha$  ha sido detectado en el humano en la corteza adrenal fetal y en la zona reticularis (ZR) de la adrenal adulta. Se ha

descripto que el TNF $\alpha$  en cultivo de células de adrenal fetal humana, en presencia de ACTH, estimula la síntesis de DHEA y DHEAS mientras que disminuye la respuesta del cortisol. Dado que la enzima 3 $\beta$ HSDII no se expresa en la ZR se ha sugerido un rol en el mecanismo de inicio de la adrenarca humana que se caracteriza por el aumento de los niveles séricos de DHEA y DHEAS. Hipótesis: TNF $\alpha$  regularía el promotor de 3 $\beta$ HSDII. Se estudió el efecto del TNF $\alpha$  sobre el promotor de 3 $\beta$ HSDII y la esteroidogénesis en células H295R en cultivo. La transfección de construcciones conteniendo fragmentos del promotor (CI: -698; CII: -297; CIII: -107pb) y la luciferasa como gen reportero mostró que el TNF $\alpha$  (10 ng/ml) disminuye significativamente la actividad del promotor inducida por AMPc(0.5mM): AMPc y AMPc+TNF $\alpha$  (24h): 3,5 y 2,7; 2,9 y 1,3; 2,1 y 0,9 veces del basal, CI; CII; CIII resp. En el medio condicionado bajo estímulo con TNF $\alpha$  y AMPc se observó a las 24 hs un descenso significativo de la relación Cortisol/DHEAS,  $p < 0,05$  (Basal: 1,79 $\pm$ 0,54, AMPc: 4,41 $\pm$ 0,60, AMPc+TNF $\alpha$ : 1,20 $\pm$ 0,33). La expresión del ARNm de 3 $\beta$ HSDII en H295R (Northernblot) disminuyó bajo AMPc y AMPc+TNF $\alpha$  a las 3 hs, mientras que a las 12 hs el TNF $\alpha$  disminuye la respuesta al AMPc. La preincubación con TNF $\alpha$  (20 hs) no modifica la respuesta del promotor (CIII) al AMPc (4hs). La cotransfección de la CIII con RelA o con el superrepressor I $\kappa$ B no modifica la respuesta a AMPc. La mutación en el promotor CIII de sitios AP1 no modifica la respuesta a TNF $\alpha$ . Se concluye que el TNF $\alpha$  regula el promotor de 3 $\beta$ HSDII la cual no sería ni a través de la activación de la vía del NF $\kappa$ B, ni por unión a sitios AP1. La disminución de la expresión de la 3 $\beta$ HSDII por acción del TNF $\alpha$  estaría implicada en la regulación de la síntesis de androgenos adrenales.

## NEUROCIENCIAS V

### 0664. (0251) ALTERACIÓN DEL OLFATO Y HERENCIA EN LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON. M Otero Losada

CONICET

**Introducción.** La enfermedad de Huntington es un trastorno neurodegenerativo progresivo, genético, autosómico dominante. Se caracteriza por signos motores, demencia y otras manifestaciones psiquiátricas y suele presentarse entre la cuarta y quinta década de la vida. Está bien documentada la estrecha relación entre los trastornos neurodegenerativos y las alteraciones del olfato. La herencia es considerada un factor de riesgo en cuanto incrementa la probabilidad de padecer ciertos deterioros neurodegenerativos. Sin embargo, se desconoce si la alteración olfatoria asociada al trastorno neurodegenerativo está ligada al factor genético y en qué casos. **OBJETIVO:** evaluar el olfato en descendientes de pacientes con enfermedad de Huntington. **Métodos.** Se administró la prueba de identificación olfatoria de la Universidad de Pennsylvania (UPSIT) a: 8 (ocho) sujetos con enfermedad de Huntington (H+), 9 (nueve) sujetos sin enfermedad de Huntington (H-), 10 (diez) sujetos hijos de H+ (h+) y 13 (trece) sujetos hijos de H- (h-). UPSIT es una determinación funcional que utiliza metodología psicofísica (i.e. correlación percepción-estimulación) y consiste en la detección, reconocimiento e identificación de 40 estímulos microencapsulados en fase sólida distribuidos en 4 grupos que conforman un kit. **Resultados.** El puntaje obtenido por cada grupo fue (media $\pm$ SD): 30 $\pm$ 3 (H+), 37 $\pm$ 2 (H-), 36 $\pm$ 3 (h+), 38 $\pm$ 1 (h-) [Fgrupo (24.084;3;36),  $p < 0.001$ ]. **DISCUSIÓN.** Los sujetos con Huntington tuvieron peor desempeño olfatorio en comparación con los sujetos neurológicamente sanos. No se observó diferencia en la respuesta a la prueba de olfato entre los hijos de sujetos con hiposmia asociada a la enfermedad de Huntington y los hijos de sujetos normósicos neurológicamente sanos. **Conclusión.** Estos datos provenientes de una muestra pequeña, sugieren que el deterioro olfativo asociado al proceso neurodegenerativo no estaría determinado por factores genéticos.

### 0665. (0089) ENSAYO ABIERTO DE PROGESTERONA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA.

GM Gargiulo<sup>1</sup>, MC Gonzalez Deniselle<sup>2,3</sup>, GE Rodriguez<sup>1</sup>, M Meyer<sup>2</sup>, AF De Nicola<sup>2,3</sup>, R Sica<sup>1</sup>

1 Hospital Ramos Mejía, 2 Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, 3 Dto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CONICET

**Introducción:** La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa. La etiopatogenia más aceptada es el estrés oxidativo y la excitotoxicidad por glutamato. La progesterona demostró poseer efectos beneficiosos en lesiones del sistema nervioso central y periférico en modelos animales de ELA como el ratón Wobbler. El objetivo fue demostrar la utilidad de la progesterona en pacientes con ELA. **Métodos:** Se reclutaron pacientes con ELA definida o probable, de inicio en miembros y bulbar, con capacidad vital forzada (CVF) > 50%, sin gastrostomía ni silla de ruedas. Se dividieron los pacientes en 3 grupos: 6 recibieron progesterona 300 mg/d durante 22,5 meses, 7 recibieron riluzole 100 mg/d durante 17,12 meses, y 11 ambas drogas (R+P) durante 21,18 meses. Los pacientes se evaluaron a través de: la escala Medical Research Council de fuerza muscular, la escala de Norris y ALSFRS de actividades de vida diaria y de la CVF. Se estimó la sobrevida desde el primer síntoma hasta el fallecimiento o a Junio 2007. Se compararon los tres grupos y se registraron los efectos adversos de la progesterona. **Resultados:** No se observaron diferencias en la evaluación funcional respiratoria ni en las escalas funcionales y de fuerza muscular. La sobrevida en el grupo R+P fue de 60.09  $\pm$  8.46 meses, en el grupo progesterona fue de 55.5  $\pm$  14.6 meses y en el grupo riluzole de 38.14  $\pm$  9.4 meses ( $p=0.12$ ). La sobrevida para el subgrupo de ELA de inicio en miembros fue de 61.50  $\pm$  9.22 meses en el grupo R+P, de 35.50  $\pm$  5.07 meses en el grupo progesterona y de 32.50  $\pm$  10.57 meses en el grupo riluzole ( $p=0.06$ ). La sobrevida demostró una tendencia borderline a ser mayor en el grupo R+P. Los efectos adversos más frecuentes fueron somnolencia e intolerancia digestiva. **Conclusión:** La combinación de riluzole y progesterona mostró una tendencia a prolongar la sobrevida con baja severidad de efectos adversos de la progesterona.

### 0666. (0608) ACTIVACION ENDOTELINERGICA EN LA NEUROGENESIS INDUCIDA POR G-CSF Y LESIONES CORTICALES CEREBRALES. M Castañeda, M López-Vicchi, V Torbidoni, M Iribarne, AM Suburo

Facultad de Ciencias Biomédicas. Universidad Austral.

**Introducción:** La zona subventricular (ZSV) contiene células precursoras neurales (CPNs), cuya proliferación y movilización son alteradas por injuria cerebral. Postulamos que endotelina-1 (ET-1) podría intervenir en la regulación de la neurogénesis post-lesional. Por lo tanto, analizamos la distribución de ET-1 en la ZSV, y las modificaciones inducidas por Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) e injuria isquémica. **Métodos:** Ratonés C57Bl/6 fueron tratados con salina o G-CSF (50mg/kg/día) durante 5 días. Otro grupo de ratones, portadores de lesiones devascularizantes de las áreas corticales M1, M2 y S1, fue sometido a los mismos tratamientos. Los cerebros fueron procesados para detección inmunoenzimática e inmunofluorescente de ET-1, evaluándose su co-localización con prominina-1 y glial fibrillary acidic protein (GFAP), marcadores de CPNs. **Resultados:** La ZSV normal contenía numerosas células ET-1+ de aspecto estrellado. Co-expresaban GFAP y, en menor grado, prominina-1. Las células ET-1+ se aparecían además en el cuerpo calloso y el cíngulo. El número y densidad de células ET-1+ aumentó significativamente después de la administración de G-CSF. En los animales devascularizados, las células ET-1+ disminuían en la ZSV y aumentaban notoriamente alrededor de la lesión. El número de células ET-1+ aumentó aun más después del tratamiento con G-CSF, incrementándose simultáneamente la expresión de GFAP y de prominina-1. Todas las células con inmunoreactividad para GFAP y prominina-1 también exhibían ET-1. Sin embargo, también se observaron otras células que solamente expresaban ET-1. **Conclusiones:** Nuestras observaciones indican que ET-1

se concentraría selectivamente en las CPNs. Las células ET-1+ aumentaron tanto por acción del G-CSF como por la injuria isquémica de la corteza, aumentando aún más en los animales lesionados tratados con G-CSF. G-CSF promovería la activación de CPNs endotelinérgicas derivadas de ZSV.

**0667. (0296) EFECTO DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO SOBRE CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE NEOESTRIADO.** MS Kruse<sup>1</sup>, J Barutta<sup>1</sup>, VR Boti<sup>1</sup>, E Saraceno<sup>2</sup>, F Capani<sup>2</sup>, H Coirini<sup>1</sup><sup>2</sup>

*1 Laboratorio de Neurobiología Instituto de Biología y Medicina Experimental, 2 Laboratorio de Neurobiología, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina UBA*

En trabajos previos hemos demostrado en un modelo animal, efectos bioquímicos y morfológicos provocados por la producción de radicales libres a consecuencia de un fenómeno hipóxico-isquémico. Con el fin de estudiar en detalle los procesos moleculares provocados por este evento, iniciamos la caracterización de cultivos organotípicos de núcleo estriado utilizando cortes coronales de cerebro (500 µm) de ratas Sprague-Dawley de 7 días de edad, que fueron cultivados sobre membranas Millicell y/o sobre porciones de esponja hemostática en medio BME conteniendo 10% suero de caballo durante 7, 14 y 21 días. Al cumplirse estos plazos el medio fue adicionado con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a fin de generar concentraciones finales de 0,1mM y 0,3mM durante 3 horas, luego los tejidos fueron lavados y fijados con paraformaldehído al 4%, inmersos en sacarosa 15% por 18hs y congelados para obtener secciones (16µm) utilizando un criostato. El grado de vulnerabilidad celular fue monitoreado mediante tinción con azul de toluidina, evaluándose además la expresión de GFAP y calbindina por inmunocitoquímica. Los cortes de tejido redujeron su espesor con el tiempo de cultivo manteniendo sus características morfológicas durante las tres semanas. Los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocaron una muerte celular dependiente de la dosis observándose ruptura de la membrana celular a la concentración mayor. La inmunomarcación con GFAP mostró un aumento en la reacción astrogliar de aproximadamente un 15% con un marcado aumento del tamaño (15%) y ramificaciones reactivas (12%) en función a las dosis crecientes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. No se observaron diferencias significativas entre los tejidos controles o tratados para calbindina. Estos resultados sugieren que los cultivos organotípicos de estriado pueden ser de utilidad para evaluar cambios bioquímicos estructurales en fenómenos hipóxico-isquémico in vitro. (PIP5349 y UBACYT M020).

**0668. (0300) INHIBICIÓN DE LA POST-DESCARGA EPILÉPTICA EN EL MODELO DE KINDLING HIPOCAMPAL.** MC Anessi, J Frangella, M Barroso, M Caballero, S Kochen

*Laboratorio de Epilepsia, Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. Dr. E. De Robertis, Facultad de Medicina de la UBA. CEFYBO-CONICET*

El modelo de epilepsia experimental denominado "Kindling", consiste en la estimulación repetida y periódica de estructuras del sistema límbico, que da lugar a la aparición de post-descargas epilépticas (PDE). Este modelo es el que más se asemeja a la epilepsia del lóbulo temporal en humanos. La estimulación eléctrica a nivel de la zona epileptógena (ZE) o de sitios alejados a la misma se ha comenzado a utilizar con el objetivo de inhibir la PDE inducida en diferentes modelos experimentales. En este estudio hemos evaluado el efecto de la estimulación eléctrica aplicada a nivel de la ZE, generada a partir del modelo de kindling en ratas wistar, con el objetivo de inhibir la PDE. **Método:** se implantó un electrodo bipolar en la zona CA1 del hipocampo, para registro y estimulación. Se aplicó el protocolo estandarizado de kindling. Se utilizaron dos modalidades de estímulos inhibitorios (EI): estímulo corto (EC): 50Hz/0.2s/500 µseg y estímulo de baja frecuencia (EBF): 1Hz/30s/500 µseg. Se dividió el estudio en dos fases. En la primera fase, se efectuó el estímulo de kindling (EK), del día 0 al 30, y en la segunda fase, del día 31 al 40 junto con el

EK se aplicó el EC (a posteriori del EK) o EBF (antes del EK). Por medio de una regresión lineal (día vs PD) se analizó la duración de la PDE. Los resultados fueron analizados en un diseño apareado, utilizando el test de Student. **Resultados:** EK ( $\Delta$ seg/día  $\pm$  error)/ EI ( $\Delta$ seg/día  $\pm$  error). Los valores del grupo EK+EC fueron: Rata A (RA):  $4.25 \pm 0.02/-3.06 \pm 0.11$ ; RB:  $1.30 \pm 0.02/-5.2 \pm 0.11$ ; RC:  $2.5 \pm 0.02/ 0.4 \pm 0.13$ . Los resultados del grupo EK+EBF fueron: RD:  $1.6 \pm 0.02/-0.05 \pm 0.13$ ; RE:  $2.7 \pm 0.02/ 0.06 \pm 0.13$ ; RF:  $2.3 \pm 0.02/ -1.1 \pm 0.13$ . Las diferencias observadas fueron significativas ( $p < 0.05$ ) para ambos tipos de estímulo. **Conclusión:** Ambos estímulos inhibitorios son capaces de reducir la duración de la PD. Éste método podría ser un nuevo recurso terapéutico en las epilepsias que no responden al tratamiento farmacológico.

**0669. (0027) VARIACIONES CIRCADIANAS DE LOS NIVELES DE LAS PROSTAGLANDINAS E2 Y F2 $\alpha$  EN LA RETINA DEL HÁMSTER DORADO.** DM Silberman<sup>1</sup>, DC Fernandez<sup>1</sup>, PH Sande<sup>1</sup>, MI Keller Sarmiento<sup>1</sup>, DA Golombek<sup>2</sup>, RE Rosenstein<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina, 2 Laboratorio de Cronobiología, Universidad Nacional de Quilmes.*

El reloj circadiano central de mamíferos se localiza en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) hipotalámicos. Múltiples pruebas experimentales demuestran que la retina contiene un reloj circadiano endógeno capaz de regular diversos parámetros fisiológicos locales. Sin embargo, la localización y organización del reloj retiniano son aún elusivas. Se ha demostrado que la prostaglandina E2 (PGE2) actúa como un agente sincronizador de un reloj periférico en cultivo e in vivo. El objetivo de este trabajo fue estudiar las variaciones circadianas de los niveles retinianos de PGs. Se utilizaron hámsteres dorados macho mantenidos en un fotoperíodo de 14 h de luz-10 h de oscuridad. En algunos experimentos los animales se mantuvieron en oscuridad constante por 48 h. Los animales se sacrificaron a mediodía, medianoche, mediodía subjetivo o medianoche subjetiva. Se determinaron los niveles liberados de PGE2 y PGF2 $\alpha$  por RIA en animales con o sin lesión de los NSQ, así como los niveles de COX-1 y COX-2 por Western blot y la localización de estas enzimas por inmunohistoquímica. La producción de PGE2 y PGF2 $\alpha$  fue significativamente mayor ( $p < 0.01$ ) a medianoche que a mediodía. La variación diaria de estos parámetros persistió en animales expuestos a oscuridad constante ( $p < 0.01$ ) y en animales con lesión de los NSQ ( $p < 0.05$ ). Los niveles de COX-1 fueron mayores a medianoche que a mediodía y en la noche subjetiva que en el día subjetivo. No se observaron diferencias en los niveles de COX-2. La COX-1 se localizó en la capa de células ganglionares, en la nuclear interna, en las plexiformes interna y externa pero no en los fotorreceptores. La COX-2 se localizó en la capa de células ganglionares, limitante interna y plexiformes interna y externa. Estos resultados demuestran que la síntesis circadiana de PGs en la retina es controlada por un reloj local. Asimismo, sugieren la participación de las PGs en los mecanismos que regulan temporalmente la fisiología retiniana.

**0670. (0006) TRATAMIENTO CON AMITRIPTILINA EN ANIMALES SOMETIDOS A SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA Y ESTRÉS CRÓNICO: EFECTO SOBRE CATECOLAMINAS E ÍNDICES DE ANSIEDAD.** EM Cotella<sup>1</sup>, I Mestres Lascano<sup>1</sup>, GM Levin<sup>2</sup>, MM Suárez<sup>1</sup>

*1 Fac. Cs. Exactas Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba, 2 Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)*

Los estímulos estresantes repetidos son procesados a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), el cual desencadena la activación de los sistemas Simpático Médulo Adrenal e Hipotálamo Hipófiso Adrenal. La separación materna temprana, es también

un fuerte estresor que afecta a dichos sistemas, con cambios que se evidencian a largo plazo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el tratamiento con el antidepresivo tricíclico Amitriptilina (5mg/Kg), en ratas macho sometidas a separación materna temprana (SM) y estrés crónico variable (ECV) de adultas, evaluando los niveles de adrenalina, noradrenalina e índices de ansiedad, y esperando disminuir dichos parámetros. La determinación hormonal se realizó por HPLC y para medir los niveles de ansiedad se utilizó el test de laberinto en cruz elevada (Plus Maze), en el cual se registraron los parámetros porcentaje de tiempo de permanencia y de entradas en brazos abiertos. La separación materna temprana y estrés crónico variable provocaron aumento de catecolaminas plasmáticas y de la ansiedad ( $p<0,05$ ) respectivamente. La administración diaria de Amitriptilina por veinticuatro días no tuvo un efecto significativo sobre el estrés, tanto físico como emocional, sobre noradrenalina; aunque provocó una disminución de la adrenalina (no significativa) en animales sujetos sólo al ECV. Por otro lado, dicho estrés provocó aumento de la ansiedad ( $p<0,05$ ), siendo el mismo atenuado por el tratamiento con Amitriptilina. Es decir que el antidepresivo tendría un efecto ansiolítico en esos animales. Esta disminución de la ansiedad no se observó en los animales separados de la madre, ni en individuos sometidos a ambos protocolos simultáneamente (SM y ECV). En conclusión, el tratamiento con Amitriptilina produjo una tendencia al efecto ansiolítico en animales sometidos a ECV, evidenciada en una disminución de la adrenalina plasmática y de los índices de ansiedad.

**0671. (0013) EXPRESIÓN DE AVP, FOS Y RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN EL HIPOTÁLAMO DE RATAS MACHO Y HEMBRA SOMETIDAS A SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA.** GM Renard, MA Rivarola, MM Suárez

*Cátedra de Fisiología Animal - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba*

La Arginina Vasopresina (AVP) junto al CRH, son los ACTH secretagogos más potentes. Las neuronas del núcleo Medial Parvocelular del Paraventricular Hipotalámico (PaMP), productoras de AVP, proyectan a la Eminencia Media y están relacionadas con la secreción de glucocorticoides vía ACTH. Por otro lado, es conocido que la respuesta del eje HPA frente a distintas situaciones de estrés es sexualmente dimórfica. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de la separación materna temprana sobre la expresión de receptores de glucocorticoides (GR), AVP y Fos en dicho núcleo en ratas macho y hembra adultas. Se utilizaron ratas albinas macho y hembra, las cuales fueron separadas de su madre diariamente por 4.5 hs. durante las tres primeras semanas de vida. La determinación de GR, AVP y Fos se realizó por inmunohistoquímica. En ratas hembra se observó una disminución en el número de neuronas inmunoreactivas a AVP ( $p<0,05$ ), así como también una disminución en el número de neuronas vasopresinérgicas activas (Fos-AVP) ( $p<0,05$ ) en el PaMP de hembras sometidas a separación materna. Con respecto a las diferencias sexuales, observamos que los machos criados con la madre presentan menor número de neuronas vasopresinérgicas ( $p<0,05$ ), así como también neuronas vasopresinérgicas activas ( $p<0,05$ ) en el PaMP, con respecto a las hembras criadas con la madre. No se observaron efectos significativos de la separación materna temprana ni efectos dependientes del sexo sobre el número de neuronas inmunoreactivas a GR en el PaMP Hipotalámico. En conclusión, en las diferencias sexuales sobre la regulación del eje HPA mediante GR, en ratas separadas de la madre, no participaría el PaMP Hipotalámico. El PaMP Hipotalámico tiene una actividad vasopresinérgica dependiente del sexo del animal, siendo mayor en las hembras.

**0672. (0095) AMITRIPTILINA Y ESTRÉS CRÓNICO: INCIDENCIA SOBRE LOS NIVELES DE CATECOLAMINAS Y ANSIEDAD EN RATAS MACHOS Y HEMBRAS SOMETIDAS A SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA.** V Díaz Luján<sup>1</sup>, GM Levin<sup>2</sup>, MM Suárez<sup>1</sup>

*1 Cátedra de Fisiología Animal - Facultad de Cs. Exactas, Físicas y Naturales - Universidad Nacional de Córdoba, 2 Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE - CONICET)*

Experiencias tempranas adversas y la exposición crónica al estrés en la adultez, producen alteraciones neuroendocrinas y comportamentales. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del antidepresivo amitriptilina sobre el sistema simpático y las respuestas relacionadas a la ansiedad en ratas machos y hembras, sometidas a separación materna temprana y estrés crónico. Durante los 21 días postnatal, fueron separadas de su madre diariamente durante 4,5 hs. A los 63 días fueron expuestas al modelo de estrés crónico y conjuntamente se inició la administración por vía oral del vehículo o la amitriptilina, con una dosis de 5mg/kg. Se utilizó el test laberinto en cruz elevada para medir ansiedad y la HPLC para medir catecolaminas. Las hembras criadas con la madre sin estrés, tratadas con vehículo, mostraron un aumento significativo de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) ( $p<0,05$ ) respectivamente y un incremento significativo en los niveles de ansiedad ( $p<0,05$ ) en relación a los machos. Esto demuestra una percepción diferencial frente al estímulo novel. El tratamiento con amitriptilina en los machos criados sin estrés, provocó un incremento significativo de NA en relación a los tratados con vehículo ( $p<0,05$ ), mientras que en las hembras disminuyó significativamente la A ( $p<0,05$ ). En las separadas de la madre sin estrés, la droga disminuyó ambas hormonas en relación a las tratadas con vehículo ( $p<0,05$ ). En los machos criados con la madre y estresados, la amitriptilina provocó un aumento significativo en el tiempo de permanencia en brazos abiertos en relación a los tratados con vehículo ( $p<0,05$ ). En las hembras criadas con la madre y separadas de ella, estresadas, la droga disminuyó significativamente los niveles de ansiedad con respecto a los machos de iguales tratamientos ( $p<0,05$ ). Así, hay una respuesta dimórfica frente a las situaciones de estrés físico y/o emocional y la amitriptilina actúa de manera diferencial, con efecto ansiolítico más efectivo en las hembras.

**0673. (0248) EL EFAVIRENZ IMPIDE EL EFECTO DE LA MELATONINA SOBRE PARÁMETROS CIRCADIANOS DE LA ACTIVIDAD DE RUEDAD EN EL HÁMSTER SIRIO.** PA Scacchi Bernasconi<sup>1,3</sup>, C Lopez<sup>2</sup>, M Pedemonte<sup>2</sup>, R Vellutti<sup>2</sup>, RA Cutrera<sup>3</sup>, DP Cardinali<sup>1</sup>

*1 Lab. de Neurociencias. Dpto. Fisiología. Fac. Medicina. Universidad de Buenos Aires, 2 Universidad de la República. Facultad de Medicina. Departamento de Fisiología, Laboratorio de Neurofisiología, 3 Lab. de Ritmos y Biología. Dpto. Fisiología. Fac. Medicina. Universidad de Buenos Aires*

El efavirenz (EFZ) es el principal antirretroviral utilizado en paciente HIV/SIDA. Como efectos colaterales indeseados se hallan los trastornos del sueño. Hemos demostrado que EFZ produce alteraciones cronobiológicas en la actividad en rueda de hámsteres en oscuridad continua (SAIC 2006). La melatonina (MT) es una señal endógena que participa en la regulación de los ritmos circadianos de actividad, en particular el de sueño/vigilia. El objetivo fue verificar si EFZ interfiere con la MT en sus efectos circadianos. Se utilizaron hámsteres sirios alojados en jaulas individuales equipadas con una rueda y un sistema de telemetría durante las 24 horas. Los animales fueron mantenidos en oscuridad continua. La MT (0,1ml de 5 mg MT/ml en una solución de alcohol 20% i.p.) o su vehículo (OH), y EFZ (50mg/ml de EFZ en 0,5% metilcelulosa por administración esofágica) o su vehículo (VEH) fueron administrados bajo una luz roja tenue. Se estudiaron 4 grupos experimentales: OH-VEH; OH-EFZ; MT-VEH; MT-EFZ ( $n=8-10$  por grupo). Ambos tratamientos se realizaron conjuntamente a las 5h del comienzo de la fase de actividad. Se analizaron los siguientes parámetros circadianos: cambio del período (en los 4 días posteriores al tratamiento), avance de fase, amplitud y media de la actividad (en cuentas por min) en relación al pre-tratamiento. Cuando se analizó el período, el grupo MT-VEH ( $24,4\pm 10,07$ ) mostró aumentos respecto de los grupos que reci-

bieron OH y/o EFZ (VEH-OH,  $-3,37 \pm 2,36$ ; EFZ-OH,  $0,39 \pm 1,66$ ; MT-EFZ,  $3,73 \pm 3,07$  ( $p = 0,006$ ; interacción MT x EFZ,  $p = 0,027$ ). Con respecto a la media y amplitud de la actividad, el efecto depresor de la MT ( $0,84 \pm 0,04$  y  $0,87 \pm 0,05$ ) vs. OH ( $1,01 \pm 0,05$  y  $1,03 \pm 0,05$ ,  $p < 0,002$ ) no se observó en presencia de EFZ. El cambio de fase no mostró diferencias significativas. Los resultados indican que el EFZ interfiere con el efecto producido por la MT sobre parámetros circadianos, sugiriendo un posible mecanismo para las alteraciones del ritmo sueño/vigilia observado en la clínica.

**0674. (0008) COMPENSACIÓN EN LAS ÁREAS ANTERIOR Y POSTERIOR DEL LENGUAJE.** AB Merlo<sup>1</sup>, EF Albanese<sup>1</sup>, EE Gómez<sup>1</sup>, JH Miño<sup>1,3</sup>, AV Ingratta<sup>1</sup>, TA Mascitti<sup>2</sup>, AM Albanese<sup>1</sup>

*1 Facultad de Medicina. Universidad del Salvador, 2 Facultad de Medicina. UBA, 3 Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA*

Las áreas corticales anterior y posterior del lenguaje son consideradas de lateralidad izquierda la que enmascara la lateralidad derecha de alguna de sus subáreas. Esto se relaciona con el concepto de compensación desarrollado en nuestro laboratorio. La compensación cuantifica la reducción de lateralidad de un conjunto bilateral formado por dos o más zonas con lateralidades opuestas (Int J Morphol 21 (2): 113-116, 2003). **Objetivo:** Determinar la compensación en la suma de superficies corticales de las regiones anterior y posterior del lenguaje (AP) y su lateralidad remanente. **Material y método:** En 15 cerebros humanos adultos postmortem se midieron (Arch Neurol 46:307-310,1989) las superficies de los giros opercularis y triangularis caudalis y las del planum temporale (PT) y el planum parietale (PP) ambas situadas caudalmente al giro transverso de Heschl en los lóbulos correspondientes. El PP muestra contrariamente al PT y al área de Broca prevalencia de lateralidad derecha (11/15 casos). A la suma de diferencias interhemisféricas de las superficies que forman AP la denominamos SUM y a la diferencia interhemisférica de AP, DIF. Calculamos los porcentajes de compensación (COMP%) y de asimetría (ASIM%) de AP.  $COMP\% = (SUM - DIF) \times 100 / (AP \text{ derecho} + \text{izquierdo})$ .  $ASIM\% = (DIF) \times 100 / (AP \text{ derecho} + \text{izquierdo})$ . **Resultados:** Para AP la media  $\pm$  ES de COMP% ( $7,98 \pm 1,58$ ) y de ASIM% ( $9,58 \pm 1,37$ ) no difieren significativamente ( $p > 0,05$  ANOVA). En 13/15 casos la lateralidad de AP es izquierda. **Conclusión:** La suma de superficies de las regiones anterior y posterior del lenguaje, con lateralidad izquierda, presenta un porcentaje de compensación que no difiere significativamente del de asimetría. La lateralidad derecha del planum parietale es relevante en la compensación.

**0675. (0011) VENTRÍCULOS LATERALES: VARIACIONES LINEALES CON EL AVANCE DE LA EDAD.** EF Albanese<sup>1</sup>, AB Merlo<sup>1</sup>, EE Gómez<sup>1</sup>, JH Miño<sup>1,2</sup>, TA Mascitti<sup>3</sup>, AV Ingratta<sup>1</sup>, AM Albanese<sup>1</sup>

*1 Facultad de Medicina. Universidad del Salvador, 2 Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA, 3 Facultad de Medicina. UBA*

La bibliografía muestra que los volúmenes de los ventrículos cerebrales se incrementan con la edad. Valores lineales relacionados podrían detectar las variaciones en un plano del espacio. **Objetivo:** Determinar en sujetos femeninos, en función de la edad, posibles variaciones lineales anteroposteriores y ventrodorsales de los ventrículos laterales. **Material y método:** Mediante el programa Scion Image for Windows en imágenes digitalizadas parasagitales de resonancia magnética (IPRM) de ambos hemisferios de 56 sujetos femeninos. (edad 20-84 años) sin patología neurológica ni psiquiátrica se trazó una línea que pasando por los puntos más distantes del borde ventral del cuerpo calloso (CC) alcanza los bordes del cerebro. Sobre dicha línea se midieron el segmento AP entre los puntos más distantes del borde ventral del CC y el segmento H entre los bordes frontal y occipital del cerebro y el segmento VD (perpendicular a H) que une el punto medio (M) de H con el borde ventral del CC. Los datos se procesa-

ron por rangos (en años) de edades 21-40 ( $n=19$ ), 41-60 ( $n=16$ ) y 61-84 ( $n=21$ ). **Resultados** Los valores (medias  $\pm$  es) se expresan en cm. Para edades de 21-40, 41-60 y 61-84 años en el hemisferio derecho los AP son  $5,07 \pm 0,9$ ,  $5,48 \pm 0,11$  y  $5,98 \pm 0,12$  y los VD  $1,10 \pm 0,06$ ,  $1,23 \pm 0,08$  y  $1,21 \pm 0,07$  y en el izquierdo los AP son  $5,11 \pm 0,11$ ,  $5,45 \pm 0,11$  y  $5,92 \pm 0,14$  y los VD  $1,15 \pm 0,04$ ,  $1,20 \pm 0,01$  y  $1,22 \pm 0,11$ . Sólo los valores AP aumentan significativamente ( $p < 0,01$  ANOVA) con la edad. **Conclusiones:** En sujetos femeninos al incrementar la edad se observa un aumento lineal anteroposterior pero no ventrodorsal de los ventrículos laterales lo que sugiere un comportamiento desigual en ambas direcciones.

**0676. (0830) EFECTO ANTIOSTEOLÍTICO DE LA MELATONINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSIS DESARROLLADO EN LA RATA MACHO.** MG Ladizesky<sup>1</sup>, MA Moreno Ayala<sup>1</sup>, S Mastaglia<sup>2</sup>, V Boggio<sup>1</sup>, PA Scacchi<sup>1</sup>

*1 Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, 2 Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, Sección Osteopatías, UBA*

Estudios previos efectuados en nuestro Laboratorio han mostrado que la melatonina (mel) inhibe la pérdida de masa ósea que presentan ratas ovariectomizadas. Nuestro objetivo ha sido evaluar si el efecto antiosteolítico de mel se presenta también en ratas macho osteoporóticas por administración de corticoides, mostrando una acción antirresortiva hormono-independiente. Ratas macho fueron tratadas con mel ( $500 \mu\text{g}/\text{día}$ ) en agua de bebida y/o metilprednisolona (cort), ( $5 \text{ mg}/\text{día ip}$ ) durante 75 días. Parámetros séricos fueron evaluados cada 15 días. Grupos: (10-14 ratas c/u): control, cort, mel, cort+mel. A través del experimento se efectuaron estadísticas longitudinales y transversales. **Resultados:** -FAO (UI/L): Todos los grupos difieren respecto al control ( $p < 0,03$ ). Después de 45 días, los niveles de FAO incrementan en mel comparados con cort ( $p < 0,05$ ), mostrando una mayor formación. -CTX (ng/ml): Todas las medias difieren entre sí ( $p < 0,0026$ ). Mel+cort < cort ( $p < 0,05$ ) sugiriendo que mel reduce la resorción ósea en cort. -CaS (mg/dl): veh+mel < cort+H<sub>2</sub>O, ( $p < 0,03$ ) y veh+mel < cort+mel ( $p < 0,05$ ), mostrando que mel presenta menor Cas que cort y que cort suplementado con mel, reduce la CaS, sugiriendo un efecto protector de mel sobre la pérdida de mineral óseo inducido por cort. -PS (mg/dl) (mg/dl): cort+mel < cort+H<sub>2</sub>O ( $p < 0,011$ ), comparación que apoya esta acción de mel. Sumario: Mel incrementa la formación y reduce la resorción en ratas macho osteoporóticas, indicando, conjuntamente con estudios que ya publicamos en hembras OVX, que su efecto antirresortivo es independiente del sexo. Muestra su potencial terapéutico en diversas patologías con pérdida de masa ósea.

**0677. (0434) DIMORFISMO SEXUAL EN LA SED HIPOVOLÉMICA INDUCIDA POR EL TRATAMIENTO COMBINADO DE FUROSEMIDA Y DIETA BAJA EN SODIO (F/DBS).** AF Macchione, C Dalmaso, L Vivas

*Instituto de Investigación Médica M. y M. Ferreyra-INIMEC*

El objetivo del presente trabajo fue analizar comparativamente en ratas hembras intactas (H), ovariectomizadas (HOVX) y machos (M), el consumo de agua y sodio estimulado por el tratamiento de F/DBS. Además se analizó la expresión de Fos como un marcador de actividad neural y la expresión de receptores estrogénicos  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) en el órgano subfornical (SFO) y núcleo preóptico mediano (MnPO), áreas involucradas en la osmoregulación. Nuestros resultados indican que el porcentaje de preferencia por el sodio (ml Na consumido/volumen de ingesta total) observado durante los días previos al tratamiento fue mayor en H y HOVX en comparación a M ( $p = 0,001$ ). La ingesta de agua inducida por F/DBS fue mayor en H comparada a la de HOVX y M ( $p = 0,05$ ). El consumo de sodio estimulado por F/DBS fue similar en los 3 grupos. En condiciones basales, el número de neuronas inmunoreactivas a Fos (Fos-ir) en el SFO, fue menor en H que en M y HOVX ( $p = 0,001$ ). El tratamiento provocó un incremento en la expresión de Fos en H y M y una disminución en HOVX

( $p=0.001$ ). El porcentaje de activación inducida por F/DBS fue mayor en H en comparación a M ( $p=0.05$ ). En el MnPO, los niveles de activación basal fueron mayores en M en relación a H y HOVX ( $p=0.05$ ). El tratamiento F/DBS no provocó cambios en la expresión de Fos en H; sin embargo indujo una disminución en HOVX y M. La expresión de ER- $\alpha$  en el SFO y en el MnPO en condiciones basales, fue menor en H comparadas a HOVX y M. El tratamiento F/DBS provocó en H un incremento en la densidad de ER- $\alpha$  en ambos núcleos, mientras que no produjo cambios en la densidad de los mismos en HOVX y M. Nuestros resultados sugieren que la sed hipovolémica sería un comportamiento sexualmente dimórfico y apoyan evidencias previas que señalan al MnPO como un núcleo inhibidor de la ingesta de agua en machos. Además, nuestros datos sugieren la participación de los ER- $\alpha$  del SFO y del MnPO de hembras en este modelo de inducción de la sed. Subsidiado por ANPCyT y CONICET.

**0678. (0375) EFECTOS DE PROGESTERONA SOBRE LOS RECEPTORES DE NEUROTROFINAS TRKB Y P75 (NTR) EN LA MÉDULA ESPINAL DE UN MODELO DE ENFERMEDAD DE MOTONEURONA.** MC González Deniselle<sup>1,2</sup>, M Meyer<sup>1</sup>, LI Garay<sup>1,2</sup>, L Pietranera<sup>1,2</sup>, SL González<sup>1,2</sup>, A Lima<sup>1</sup>, P Roig<sup>1</sup>, AF De Nicola<sup>1,2</sup>

*1 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME), CONICET, 2 Dto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA*

El ratón mutante Wobbler (Wr) desarrolla una patología similar a aquella que presentan los pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Específicamente, se caracteriza por una progresiva degeneración de las motoneuronas de la médula espinal (ME) y tronco cerebral. La progesterona (PROG) ejerce efectos neuroprotectores en la injuria y degeneración del sistema nervioso central y periférico. En trabajos previos demostramos efectos beneficiosos de PROG en la ME del ratón Wobbler (Wr). Entre otros, PROG incrementa la baja expresión del ARNm para el factor neurotrófico del cerebro (BDNF) e induce una redistribución subcelular de BDNF en la ME de Wr. BDNF actúa a través de 2 tipos de receptores: el panreceptor p75(NTR) y el receptor tirosina quinasa TrKB. En esta oportunidad, estudiamos los efectos de PROG sobre la expresión de estos receptores. Un grupo de ratones Wr recibió un pellet de PROG s.c. de 20 mg por 60 días, otro grupo permaneció libre de tratamiento. Se analizó por inmunohistoquímica (IHQ) la expresión de TrKB y p75 (NTR) en motoneuronas de asta ventral. Se observó un moderado incremento de la expresión de TrKB en Wr no tratados (Wr:  $224.9 \pm 14.06$  nro de céls +/mm<sup>2</sup> vs control:  $183.0 \pm 8.605$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, la PROG en Wr no fue capaz de modular este parámetro. La expresión de p75 (NTR) fue 1.75 veces mayor en Wr que en controles (Wr:  $428.60 \pm 30.680$  nro de núcleos +/mm<sup>2</sup> vs control:  $243.90 \pm 16.170$ ,  $p < 0.001$ ) y PROG redujo significativamente la IHQ para p75 (NTR) en Wr ( $285.30 \pm 21.950$  vs Wr,  $p < 0.001$ ), sin efecto en controles. Conclusiones: La hiperexpresión de p75 (NTR) caracteriza al Wr, en concordancia con lo encontrado en humanos y modelos transgénicos de ELA. La capacidad de PROG de regular p75 (NTR) estaría relacionada a su efecto neuroprotector.

### PREMIO LEONARDO SATZ

**0679. (0594) EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA ES SENSIBLE A LA MODULACIÓN DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE SPARC, PERO NO ES AFECTADO POR LOS CAMBIOS DE EXPRESIÓN EXÓGENOS NI LA REESTRUCTURACIÓN DEL ESTROMA TUMORAL.** F Prada<sup>1</sup>, L Benedetti<sup>1</sup>, A Bravo<sup>2</sup>, M Alvarez<sup>4</sup>, C Carbone<sup>3</sup>, O Podhajcer<sup>1</sup>

*1 Laboratorio de Terapia Molecular y Celular, IIBBA-CONICET, Fundación Instituto Leloir, 2 Patología Molecular, Hospital Eva Perón, 3 Bioterio, Facultad de Veteri-*

*aria, Universidad de La Plata, 4 Joint Centers for Systems Biology, Columbia University*

SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) es una proteína matricelular cuya hiperexpresión en las células malignas o en el estroma está frecuentemente asociada con un incremento en la agresividad y mal pronóstico en diversos tipos de tumor. En este trabajo decidimos estudiar el efecto de los cambios en los niveles de expresión de SPARC producidos por las células malignas y por su estroma circundante. Con dicho objetivo se construyeron vectores adenovirales portadores de la secuencia sentido y antisentido del mensajero de SPARC. Al analizar el crecimiento en monocapa de las líneas de melanoma testeadas no encontramos diferencias significativas producidas por la regulación en los niveles de SPARC. No obstante, el crecimiento del melanoma en esferoides tridimensionales fue inhibido drásticamente mediante la hiperexpresión de SPARC, contrariamente a lo observado con la disminución de SPARC donde indujo su crecimiento. Llamativamente, la hiperexpresión en los fibroblastos adyacentes no afectó el crecimiento de esferoides heterotípicos compuestos por células de melanoma y fibroblastos. La regulación negativa de SPARC, generada por el vector antisentido, indujo una importante disminución del crecimiento in vivo de las células de melanoma mediado exclusivamente por los neutrófilos polimorfonucleares del ratón xenotransplantado. Por otro lado, la hiperexpresión de SPARC en las células de melanoma indujo un aumento en la microvasculatura, deposición de colágeno y reclutamiento de fibroblastos en la periferia tumoral sin afectar el crecimiento del mismo. Concordantemente con los datos in vitro, la hiperexpresión de SPARC en fibroblastos co-inyectados con las células de melanoma no afectó el crecimiento del tumor. En su conjunto, estos datos indican que el crecimiento del melanoma no esta sujeto a la regulación de SPARC exógena ni a la reorganización del estroma, pero si a la regulación de los niveles de SPARC producida por las propias células malignas.

**0680. (0847) PARTICIPACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL RECHAZO TUMORAL DE CÉLULAS PRODUCTORAS DEL INHIBIDOR SECRETORIO DE PROTEASA LEUCOCITARIA (SLPI).** N Amiano, MJ Costa, D Guerrieri, HE Chuluyan

*3ra Cátedra de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires*

El SLPI es una proteína de 11,7 kDa que se encuentra presente en mucosas. En los últimos tiempos se la ha vinculado con el cáncer, aunque su rol en esta patología es aún tema de debate. El objetivo de este trabajo fue esclarecer la función que cumple el SLPI en cáncer. Se clonaron células tumorales murinas productoras de hSLPI y se obtuvieron dos clones, 2C1 y B3 que produjeron  $96 \pm 13$  ng/ml y  $52 \pm 8$  ng/ml de hSLPI respectivamente. Sobre estos se evaluó: i) la proliferación in vitro (el clon productor de mayor cantidad de hSLPI, tuvo una tasa de crecimiento significativamente mayor ( $69 \pm 9\%$ ) que el control) y ii) la presencia de apoptosis (no se observaron diferencias significativas). Cuando se administraron estos clones a ratones inmunocompetentes, ninguno de los inoculados con 2C1 desarrollaron tumor; mientras que los inoculados con B3 sí, pero con un período de latencia más largo (25 días contra 12) y un volumen tumoral inferior que los animales controles (A los 35 días de la inoculación de las células se observaron volúmenes de  $654 \pm 112$  mm<sup>3</sup> para el control y  $80 \pm 12$  mm<sup>3</sup> para B3;  $n=5$ ) A diferencia de lo que ocurrió con estos animales, la administración de los clones en ratones atímicos produjo la aparición de tumores en todos los grupos (los clones productores de hSLPI produjeron tumores siempre más pequeños que los obtenidos con las células control. A los 35 días de la inoculación de las células se observaban volúmenes de  $1672 \pm 513$  mm<sup>3</sup> para el control,  $623 \pm 20$  mm<sup>3</sup> para B3 y  $32 \pm 6$  para 2C1;  $n=5$ ) Estos resultados sugieren que la respuesta inmune adaptativa está involucrada en el rechazo tumoral. Luego, para estudiar el papel de la respuesta inmune innata en dicho rechazo, ratones atímicos fueron depletados de neutrófilos y se obser-

vó que el efecto antitumoral se revirtió parcialmente. En conjunto, estos resultados demostraron que la actividad antitumoral del SLPI involucra a la respuesta inmune adaptativa y, en particular, a los neutrófilos de la respuesta inmune innata.

**0681. (0607) IMPACTO DEL ADN EXTRACELULAR PRESENTE EN BIOFILMS BACTERIANOS EN LA ACTIVACIÓN DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.** JI Fuxman Bass<sup>1,3</sup>, DM Russo<sup>2</sup>, ML Gabelloni<sup>1,3</sup>, JR Geffner<sup>1,4</sup>, A Zorreguieta<sup>2</sup>, AS Trevani<sup>1,4</sup>

1 IHEMA-Academia Nacional de Medicina, 2 Fundación Instituto Leloir, 3 Depto. de Fisiología y Biología Molecular y Celular - FCEN - UBA, 4 Depto. de Microbiología e Inmunología - Fac. de Medicina - UBA

Previamente demostramos que el ADN bacteriano (ADNb) activa a los neutrófilos por un mecanismo CpG- y TLR9-independiente y MyD88-dependiente. El ADNb induce la activación de neutrófilos aún no siendo endocitado, por lo que podría ser un agonista relevante en focos infecciosos con bacterias creciendo en biofilms, en los cuales el ADN extracelular (ADNe) es un componente prominente en su formación y estructura. En este estudio evaluamos el impacto de la eliminación del ADNe de biofilms de *P. aeruginosa* en la activación de neutrófilos humanos. Incubamos biofilms de 48 hs de formación en presencia o ausencia de DNAsa pancreática (90 U/ml) por 60 min, lavamos y confirmamos su integridad por microscopía confocal (MC). Luego co-cultivamos neutrófilos con los biofilms y evaluamos su activación determinando la liberación de IL-8 e IL-1 por ELISA, y la expresión de CD11b y CD18, y la liberación y deposición de mieloperoxidasa (MPO) sobre el biofilm por MC. El tratamiento del biofilm con DNAsa redujo marcadamente la producción de IL-8 (pg/ml IL-8: no tratado 1808±178; tratado 651±230; n=6, p<0,01) al igual que la de IL-1 (pg/ml IL-1: 427±45 no tratado; 158±75 tratado, n=6, p<0,01). Se obtuvieron resultados similares cuando los biofilms no fueron lavados luego del tratamiento con DNAsa. La expresión de CD18, cuantificada de la imagen de MC sobre 50 neutrófilos depositados sobre el biofilm, se encontró reducida cuando el biofilm fue tratado con DNAsa (UAF: 17,7±1,1 no tratado; 10,8±0,6 tratado, p<0,0001), en forma similar a lo observado con la expresión de CD11b. La deposición de MPO fue marcadamente superior y colocalizó con el ADNe en biofilms no tratados con DNAsa (coef. solapam: 0,935). Estos resultados aportan evidencias sobre la importancia del ADNe del biofilm en la activación de neutrófilos, sugiriendo que *in vivo* el ADNe podría ser un componente muy relevante para inducir la activación de neutrófilos reclutados en focos infecciosos creciendo en modo biofilm.

**0682. (0230) EL DOMINIO CATALÍTICO DE LA CRUZIPAÍNA ES EL RESPONSABLE DE LA GENERACIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA FRENTE A TRYPANOSOMA CRUZI.** SI Cazorla<sup>1</sup>, FM Frank<sup>1</sup>, RS Corral<sup>2</sup>, EL Malchiodi<sup>1</sup>

1 Dpto de Microbiología, FMED. Cát. Inmunología, FFyB, IDEHU-CONICET, UBA, 2 Lab. Virología, Htal de Niños R. Gutiérrez

Previamente demostramos que Cruzipaína (Cz) nativa junto a ODN-CpG es capaz de generar una respuesta protectora frente al desafío con *T. cruzi*. Cz está constituida por dos dominios: el NH2-terminal con actividad enzimática, y el COOH-terminal, inmunodominante. Considerando los fenómenos de autoinmunidad, nuestro objetivo fue identificar la menor porción de Cz capaz de generar una respuesta protectora. Para ello clonamos y expresamos las proteínas recombinantes, e inmunizamos ratones con: GI- PBS, GII- rNH2+CpG, GIII- rCOOH+CpG, GIV- rCz+CpG. Se detectaron niveles de IgG (principalmente IgG2a) anti-Cz en GIII (1,5x10<sup>4</sup>) y GIV (1,3x10<sup>4</sup>) > GII (844,6). Se observó una fuerte respuesta proliferativa *in vivo*(DTH) e *in vitro*(proliferación) en el GII (p<0.01). GII y GIII presentaron niveles significativos de IFN- $\gamma$  (89 y 160 pg/ml, respectivamente). Al desafiar con tripomastigotes, se encontró disminución de la parasitemia, principalmente en el GII (p<0.01). Luego de la fase aguda de la infección,

esplenocitos reestimulados *in vitro* con una mezcla de Ag del parásito, presentaron un incremento significativo en la secreción de IFN- $\gamma$  (1110 pg/ml) e IL-10 (1448 pg/ml) mostrando el establecimiento de una fuerte respuesta Th1. En la fase crónica de la infección la actividad de CPK, LDH y ASAT (enzimas marcadoras de daño muscular), fueron significativamente menores en el GII que en el grupo control, coincidiendo con el análisis histológico de tejido cardíaco. Concluimos que la inmunización con el dominio catalítico de Cz logró generar una eficiente respuesta inmune capaz de disminuir la parasitemia y el daño muscular producido por la infección. Adicionalmente, determinamos que en el GIV la respuesta inmune humoral y celular está dirigida mayoritariamente contra el COOH terminal, lo que sería un mecanismo de escape del parásito que orientando la respuesta inmune contra este fragmento no activo de la proteína.

**0683. (0688) TRYPANOSOMA CRUZI INDUCE LA GENERACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CON PERFIL REGULADORIO IN VITRO.** CV Poncini, C Alba Soto, E Batalla, ME Solana, SM González Cappa

Dto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA.

Previamente demostramos que la infección aguda con *T. cruzi* (cepa de alta virulencia RA), induce un descenso en la expresión de CMHII en CPA y en la capacidad estimuladora de LT de CD esplénicas. Sin embargo, se desconoce si el parásito es responsable directo de modular la diferenciación y/o respuesta de las CD. Para profundizar en el estudio de los mecanismos, analizamos la capacidad de los tripomastigotes (Tp) de modular la maduración y funcionalidad de CD derivadas de médula ósea *in vitro*, por cocultivo de CD con o sin Tp y/o LPS. Inicialmente estudiamos la infección de las CD por microscopía óptica de fluorescencia y por citometría de flujo, determinamos su fenotipo midiendo la expresión de moléculas del CMHII y coestimuladoras, así como la capacidad endocítica (captura FITC-dextran) en presencia o no de los estímulos. Luego, caracterizamos la secreción de citoquinas (ELISA) y su capacidad de inducir linfoproliferación (MLR). Los Tp infectaron las CD de manera dosis-dependiente y no modificaron los niveles basales de expresión de las moléculas mencionadas. La expresión de CMHII aumentó con LPS (p<0.05), pero no ante Tp+LPS. Los Tp incrementaron el número de CD con capacidad endocítica respecto de las tratadas con LPS o Tp+LPS (p<0.05). El parásito elevó la secreción de TGF- $\beta$  en presencia o ausencia de LPS (p<0.05). Asimismo, provocó un sinergismo en la secreción de IL-10 (pico a 12h de estímulo, p<0.01) y reguló negativamente la secreción de IL-12 (p<0.05), inducidas por LPS. Por último se observó inhibición de la MLR utilizando CD pretratadas con LPS en presencia de Tp (p<0.01). Concluimos que los Tp son malos inductores de la maduración de CD, pero eficientes moduladores de su diferenciación, generando CD regulatorias *in vitro* con perfil de respuesta tolerogénico.

## PREMIO MONTUORI

**0684. (0136) ASOCIACION DE VARIANTES DEL GEN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN CLOCK CON OBESIDAD E HIPERTENSIÓN.** T Fernández Gianotti, S Sookoian, C Gemma, A Burgueño, M Schuman, CJ Pirola

Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas, A. Lanari. Universidad de Buenos Aires, CONICET, Argentina.

En modelos animales se demostró que las alteraciones del ritmo circadiano resultan en síndrome metabólico (SM). Nuestro objetivo fue investigar la asociación entre las variantes de nucleótido único (SNPs) y sus haplotipos en gen CLOCK y el SM en un estudio basado en población general. Se incluyeron 1106 individuos, edad 34.4±8.6 años, en un estudio de sección transversal en el cual 715 fueron normopeso y 391 presentaron

sobrepeso/obesidad y características de SM. **Métodos:** se seleccionaron 6 SNPs del gen CLOCK (tagSNPs) con una frecuencia del alelo menor >10% (rs1554483 C/G; rs11932595 A/G; rs4580704 C/G; rs6843722 A/C; rs6850524 C/G y rs4864548 A/G) comprendiendo 117 kb en el cromosoma 4 y representando 115 sitios polimórficos ( $r^2 > 0.8$ ). **Resultados:** se observó una asociación significativa entre la frecuencia de los genotipos de 4 tagSNPs y la obesidad (rs1554483, rs6843722, rs6850524 and rs4864548 ( $p < 0.009$ , 0.014, 0.014 y 0.009 respectivamente). Además los rs1554483, rs6850524 y rs6843722 se asociaron con la hipertensión ( $p < 0.01$ , 0.033 y 0.01 respectivamente) y con la presión arterial sistólica (rs1554483  $p < 0.03$  y rs4864548  $p < 0.03$ ). Observamos también que la frecuencia global de haplotipos del CLOCK difirió entre los individuos con normopeso y obesidad (OR: 1.50, CI: 1.04-2.19,  $p < 0.033$ ). La frecuencia de haplotipos en los normotensos difirió también de la de los hipertensos (OR: 1.76, CI: 1.13-2.76,  $p < 0.012$ ). Estos hallazgos fueron replicados en una muestra independiente de 200 individuos seleccionados de población hospitalaria. El análisis combinado (Mantel-Haenszel, efecto fijo) mostró un OR 1.82, CI: 1.31-2.54,  $p < 0.0003$ ). **Conclusión:** este estudio sugiere por primera vez la asociación de las variantes del gen CLOCK con la obesidad y la hipertensión en individuos adultos. Los portadores del haplotipo rs1554483-G y rs4864548-A presentan un incremento de 1.5 veces en el riesgo de obesidad y de 1.76 veces en el riesgo de hipertensión.

**0685. (0741) HALLAZGO DE UNA DELECCIÓN QUE MARCA UN NUEVO RUMBO EN EL CAMPO DE LA TERAPIA GÉNICA ANTISENTIDO DE LA Distrofia Muscular de Duchenne.** V Ferreiro<sup>1</sup>, F Giliberto<sup>1</sup>, MN Muñiz García<sup>1</sup>, D Marcese<sup>2</sup>, M Roque<sup>2</sup>, I Szijan<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, <sup>2</sup> Laboratorio de Biología

*Celular y Molecular, IHEM-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo.*

La Distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes, progresiva y de evolución fatal. Hasta la fecha no existe un tratamiento efectivo para la misma. Las mutaciones responsables ocurren en el gen de la distrofina (Xp21.2). 2/3 de ellas son deleciones grandes abarcando 1 o más exones y en su mayoría alteran el marco de lectura llevando a un codón stop prematuro y produciendo un fenotipo severo (DMD). Otras deleciones, menos frecuentes, mantienen el marco de lectura y resultan en una distrofia más leve, Becker (DMB). Por lo tanto, con el desarrollo de la tecnología de oligonucleótidos antisentido, se podría transformar la deleción que causa un fenotipo DMD en una que produce DMB. Por tratarse de una enfermedad recesiva ligada al X, las mujeres serían portadoras y los hombres afectados. El hallazgo de una deleción en varones asintomáticos generó desconcierto y conmoción en nuestro grupo de trabajo. Se caracterizó la deleción hallada mediante PCR multiplex, PCR simplex y MLPA resultando en una deleción de los exones 45 a 55 que conserva el marco de lectura. El estudio de los integrantes de la familia con esa deleción mostró a un niño de 7 años con síntomas leves (DMB) y a otros 3 varones (12, 14 y 67 años) sin sintomatología alguna en la movilidad ni por ecocardiografía. Esto demuestra que dicha deleción se correlaciona con un fenotipo leve o asintomático. Además, otros pacientes con DMB mostraron otras deleciones que conservan el marco de lectura. Con esos datos se hizo un análisis de cuantos pacientes con DMD que portan grandes deleciones resultarían beneficiados con la transformación de su deleción en una encontrada en pacientes con DMB. Se comprobó así que los exones 45-55 son el blanco óptimo para desarrollar una única estrategia de terapia génica antisentido que transformaría el fenotipo DMD en uno BMD o incluso asintomático, de un 41% de los pacientes con DMD.