

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

Los trabajos postulados al Premio Sociedad Argentina de Fisiología se presentarán en las sesiones de Endocrinología y Gastroenterología

Los trabajos postulados al Premio María Cristina Camilión de Hurtado se presentarán en las sesiones de Cardiovascular

PREMIO CHERNY

0001 (185) PAPEL CRÍTICO DE GALECTINA-1 (GAL1) EN LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS TOLEROGÉNICAS: RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA IN VIVO EN LA INTERFASE DE INFLAMACIÓN CRÓNICA Y CÁNCER. J M Ilarregui¹, G A Bianco¹, D O Croci¹, M A Toscano¹, M Salatino¹, M E Vermeulen², J R Geffner², G A Rabinovich¹

¹Laboratorio de Inmunopatología, IByME, CONICET; ²IHEMA, Academia Nacional de Medicina <ilarregui@dna.uba.ar>

Las células dendríticas (DC) cumplen un papel fundamental en la iniciación y amplificación de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, el establecimiento de un microambiente tumoral o inflamatorio puede favorecer la diferenciación de DC con propiedades tolerogénicas capaces de silenciar la respuesta inmune. En el presente estudio, exploramos el impacto de Gal1, proteína incrementada en procesos neoplásicos e inflamatorios, sobre la capacidad regulatoria de DC utilizando diferentes modelos experimentales. DC derivadas de médula ósea diferenciadas o maduras en presencia de Gal1 (DC_{Gal1}) exhibieron un perfil regulatorio CD45RB⁺ IL-10^{hi} dependiente de la producción de IL-27 y de la activación de STAT3 en comparación con DC controles (DC). La función tolerogénica de DC_{Gal1} fue confirmada en cultivos aloígenicos *in vitro* y desafíos antígeno-específicos *in vivo* ($P < 0,01$ vs DC). La relevancia fisiopatológica de DC diferenciadas en presencia de Gal1 fue demostrada en modelos experimentales de cáncer e inflamación crónica. DC_{Gal1} demostraron menor capacidad de proteger ratones singéneos frente al desafío con células de melanoma B16 favoreciendo la inducción de tolerancia en el microambiente tumoral (IL-10^{hi}, IFN- α ^{lo}; $P < 0,01$ vs DC). El potencial antiinflamatorio de DC_{Gal1} fue evaluado, utilizando un abordaje terapéutico, en la encefalomiелitis autoinmune experimental. La administración de DC_{Gal1} logró suprimir las manifestaciones clínicas e histopatológicas de la enfermedad autoinmune desmielinizante, generando supresión de las respuestas patogénicas Th17 (IL-17) y Th1 (IFN- α) e incremento de la respuesta regulatoria de tipo Tr1 (IL-10^{hi}; $p < 0,01$ vs DC). Finalmente, DC provenientes de ratones *Lgals1*^{-/-} (DC^{-/-}) exhibieron mayor capacidad inmunogénica *in vitro* e *in vivo* ($P < 0,05$ vs DC^{+/+}). Los Resultados expuestos demuestran el papel crítico de Gal1 en la inducción de DC tolerogénicas con profundas implicancias en el control de procesos inflamatorios y neoplásicos.

0002 (472) PERFIL DE METILACIÓN TUMORAL COMO MARCADOR PARA CÁNCER DE MAMA. D Marzese¹, F E Garo^{2,3}, J Orozco^{2,3}, O Tello⁴, L M Vargas-Roig⁵, M Roqué¹

¹Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM-CONICET); ²Área de Ginecología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo.; ³Servicio de Ginecología y Obstetricia - Hospital Italiano de Mendoza.; ⁴Laboratorio Privado de Anatomía Patológica - Mendoza.; ⁵Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, (CRICYT - CONICET). <marzese.diego@fcm.uncu.edu.ar>

La metilación aberrante de genes supresores tumorales es característica del inicio de procesos tumorales. La liberación de

de células tumorales (CTCs) a la circulación puede ser detectable a partir del perfil de metilación tumoral (PMT) que al ser aberrante, no es enmascarado por el perfil de metilación de las células sanguíneas sanas. De esta manera, la detección de CTCs a través del PMT podría servir como marcador tumoral. Nuestros objetivos fueron analizar el PMT a partir de 26 regiones genómicas en tumores mamarios y ganglios afectados y detectar CTCs en sangre circulante por el PMT detectado en el tumor. Se partió de ADN de tejido tumoral, tejido ganglionar linfático y tejido mamario normal. El análisis del PMT se realizó mediante la metodología "Methyl-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification" (MS-MLPA). Esta técnica permite analizar el estado de metilación de 26 regiones simultáneamente. Los Resultados fueron analizados por el software GeneMarkerv1.6 y confirmados por PCR-metil-específica (MSP) y secuenciación bisulfito dependiente (BSP). En todas las muestras tumorales encontramos por MS-MLPA metilación aberrante y el PMT hallado fue específico para cada tumor. No detectamos metilación aberrante en tejido sano ni en lesiones benignas. En los casos con metástasis ganglionar, el Perfil de Metilación Ganglionar (PMG) fue idéntico al PMT, permitiendo inferir el origen de la metástasis. Basados en el PMT hallado por MS-MLPA, se realizaron ensayos de MSP para el promotor de *rassf1A* en sangre pre-quirúrgica. De esta manera se detectó metilación aberrante de este gen, evidenciando la presencia de CTCs. Concluimos que el PMT es específico para cada tumor. Su correlación con el PMG permite determinar el origen de metástasis. El PMT permitió detectar CTCs, que podría utilizarse como marcador para detección precoz, seguimiento y respuesta a tratamiento.

0003 (543) EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA E EN ATEROGÉNESIS INDUCIDA POR HIPERFIBRINOGENEMIA. M d C Baez^{1,2}, C L Lorens³, M Taran³, V Campana^{1,2}, J A Palma³, P Pons⁴, M Moya^{1,2}

¹Cátedra de Física Biomédica, U N Córdoba; ²IICSHUM, U N La Rioja; ³Cátedra de Física Biomédica FCM UNC; ⁴Centro Microscopía Electrónica, U N Córdoba <baezmdc@yahoo.com.ar>

Hiperfibrinogenemia (HF) sería un marcador precoz de aterogénesis y activaría la vía fisiopatológica del óxido nítrico (NO) a nivel celular y subcelular de la pared vascular. Se estudió la relación entre HF inducida, la biodisponibilidad del NO y su repercusión en la morfofuncionalidad mitocondrial de células musculares lisas aórticas. Se valoró el efecto de vitamina E (Vit E) para estabilizar el estrés oxidativo en aterogénesis. Se usaron ratas macho: (A)Control; (B)HFx60 días y (C) HFx60 días+vit E. Inducción de HF: con inyección subcutánea de adrenalina (0,1mg/Kg/rata). Vit E se administró 2mg/rata/día/oral durante 45 días. Se determinó HF(mg/dL), NO (mM) y complejos mitocondriales (I,II,III,IV) por espectrofotometría. Se estudió morfología mitocondrial por microscopía electrónica (ME). Para estadística se utilizó ANOVA y Chi Cuadrado ($p < 0,05$ para todos los casos). HFx60 días(B) (359 \pm 9) fue estadísticamente significativa con respecto al grupo (A)(203 \pm 9)($p < 0,001$), asociado a una disminución significativa de NO entre los mismos grupos: (B)(18.83 \pm 1.7) y (A) (23.58 \pm 0.08) ($p < 0,001$). Grupo (C) (205 \pm 12) mostró una disminución significativa de HF y un aumento significativo de NO (30.96 \pm 9.5) con respecto al grupo (A) y (B) ($p < 0,001$). En el grupo tratado con vit E los valores de ambas variables mostraron concentraciones seme-

jantes al control. En grupos (B) y (C) disminuyeron significativamente: el número total y medio de mitocondrias y crestas mitocondriales e incremento la matriz intermembranosa y tumefacción turbia respecto al control ($p < 0,01$). Estas lesiones se relacionaron con una disminución significativa en la actividad de complejos mitocondriales (I a IV) ($p < 0,001$) cuando se compararon respecto al control y al grupo sin tratar. Vit E revertiría el estrés oxidativo presente en aterogenesis quizás por aumento de los factores antioxidantes sobre los prooxidantes (NO) y a nivel mitocondrial revertiría las lesiones por regulación de la dinámica de membranas mitocondriales.

0004 (622) LA INMUNOFILINA FKBP51 SE LOCALIZA EN LA MITOCONDRIA Y POSEE ACCIÓN ANTIAPOPTOTICAL. I Gallo¹, E Bal de Kier Joffé², G Piwien Pilipuk¹, M D Galigniana^{1,3}

¹Fundación Instituto Leloir/IIBBA-CONICET; ²Instituto de Oncología A. H. Roffo; ³Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA <lgallo@leloir.org.ar>

Las inmunofilinas (IMMs) de alto PM FKBP51 y FKBP52 forman complejos con receptores esteroidales vía su interacción con hsp90. Previamente demostramos que el retrotransporte de GR depende de FKBP52, la que forma un puente molecular con dineína. En cambio, poco se sabe sobre la función de FKBP51, por lo que en este estudio analizamos sus propiedades. Imágenes por microscopía confocal mostraron que FKBP51 es mayoritariamente mitocondrial (mt-51), lo que fue confirmado por colocalización con marcadores mitocondriales (MitoTracker, Cyt c, COX-IV y Tom20), microscopía electrónica y fraccionamiento celular. La señal de mt-51 fue abolida por un iRNA específico. En la organela, mt-51 existe libre y asociada con mt-GR, con el que co-inmunoprecipita. Diversos estímulos translocaron a mt-51 al núcleo (ROS, luz UV, TNF α , LPS, etc.) por un mecanismo que mostró ser dependiente de la despolarización de la membrana mitocondrial y cuya cinética fue similar a la salida de Cyt c y a la translocación nuclear de mt-hsp70. La sobreexpresión de HSF1 provocó la concentración nuclear de mt-51, mientras que la IMM es siempre mitocondrial en células HSF1^{-/-}. La sobreexpresión de FKBP51 incrementó la sobrevida celular frente a diversos tipos de injurias, mientras que su knock-down incrementó la muerte por apoptosis (evidenciada por condensación nuclear, fragmentación del DNA, activación de caspasas, tinción con anexina V, etc). Diversos tipos de células tumorales mostraron elevada expresión de FKBP51 concentrada constitutivamente en el núcleo, en particular, en los nucleolos colocalizando con nucleofosmina y nucleolina. Este reclutamiento de la IMM al componente fibrilar denso y granular del nucleolo se corresponde con acumulación nucleolar de rRNAs, tal como se evidenció por incorporación de BrUTP. En resumen, FKBP51 es una proteína mitocondrial, abundante en células tumorales donde se concentra en el nucleolo de manera dependiente de HSF1 y que posee acción antiapoptótica.

0005 (628) UN MECANISMO NOVEL DE INDUCCIÓN DE COX-2 EN LA REGULACIÓN DEL FENOTIPO AGRESIVO EN CÁNCER DE MAMA: PARTICIPACIÓN SECUENCIAL Y OBLIGATORIA DE LA ACIL-COA SINTETASA ACS4, EL ACIDO ARAQUIDONICO (AA) INTRAMITOCONDRIAL Y SUS PRODUCTOS LIPOXIGENADOS. P M Maloberti¹, A Duarte¹, U Orlando¹, C Karles¹, F Cornejo Maciel¹, A F Castillo¹, C Paz¹, A Solano¹, M E Pasqualini², E J Podestá¹

¹IIMHNO, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; ²1ra Cat. Biol. Cel. Embr. His., IBC-FCM-UNC <malobertipm@hotmail.com>

La enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2) es la principal isoforma sugerida como participante en la patogénesis de malignidad, principalmente en cáncer de colon y mama. En los últimos años también ha surgido la participación de las lipoxigenasas (LOX) en la regulación de la proliferación y apoptosis en la patología tumoral,

particularmente LOX-5 y 12. Previamente se ha demostrado que ACS4 también está involucrada en el cáncer hepatocelular y de colon. El mecanismo propuesto en estas patologías es la disminución de la apoptosis por reducción de AA libre. Hemos demostrado previamente que ACS4, también participa en el fenotipo agresivo en cáncer de mama. La sobreexpresión de ACS4 está involucrada en una mayor proliferación, invasión y migración celular y menor apoptosis. Se midió apoptosis por la técnica de tunel y por la proteína apoptótica BAX por Western blots. En el presente trabajo confirmamos la participación de ACS4 en el fenotipo agresivo del cáncer de mama por obtención de líneas celulares estables inducibles que sobreexpresan ACS4, al igual que las líneas naturalmente agresivas. ACS4 en estas líneas está 18 ± 2 veces más expresada ($X \pm SD$ $n=4$ $p < 0,01$) que en las líneas de origen. Además, demostramos por HPLC, que el contenido de los productos 5-HETE, 12-HETE y 15-HETE están aumentados 70, 5 y 2 veces respectivamente en la línea agresiva MDA-MB-231 comparado con la no agresiva MCF-7. La inhibición en la expresión de ACS4 en la línea MDA-MB-231 disminuye el contenido de 5-, 12- y 15-HETE a los valores de la línea MCF-7. La sobreexpresión de ACS4 produce un incremento ($0,12 \pm 0,03$ vs $0,54 \pm 0,06$ unidades arbitrarias, mock vs ACS4 $p < 0,05$.) en la expresión de COX-2 medida por Western blot, que es abolido en presencia de inhibidores de las lipoxigenasas. Estos Resultados muestran por primera vez la participación de ACS4, el AA intramitocondrial y sus productos lipoxigenados como inductores de COX-2 y como participantes obligatorios en la agresividad en el cáncer de mama.

PREMIO COSSIO

0006 (261) EFECTOS OPUESTOS DE PROGESTERONA E HISTAMINA A NIVEL TRANSCRIPCIONAL Y PROTEICO EN HUVEC. Y Powazniak¹, A C Kempfer¹, J C Calderazzo¹, J H Paiva¹, L Keller¹, M A Lazzari¹

¹CONICET, Academia Nacional de Medicina <yaniinapowazniak@gmail.com>

El VWF y la ADAMTS13 son sintetizados y almacenados en las células endoteliales. Se ha descrito en cultivos de Hela que la ADAMTS13 tiene actividad proteolítica en el retículo endoplasmático (RE) rugoso. La histamina (H) induce liberación del VWF de una forma Ca²⁺ dependiente a través de su interacción con el citocromo P450 en la membrana del RE liso. Esta unión puede ser inhibida por progesterona (P). En el endotelio vascular se han identificado receptores de P y secuencias en el ADN para la unión del complejo P-receptor. Se ha descrito que H puede regular la transcripción de distintos genes. **Objetivo:** Se evaluaron los cambios producidos por P e H en la síntesis y producción de VWF y ADAMTS13 en HUVEC. **Metodologías:** Cultivo de HUVEC. Tratamientos: las HUVEC se incubaron con $1\mu\text{M}$ P (niveles fisiológicos) y/o $100\mu\text{M}$ H. Se estudiaron los niveles de mRNA de VWF y ADAMTS13 por real time PCR utilizando el sistema de detección de SYBR Green. Se identificaron y cuantificaron las proteínas intracelulares y liberadas de VWF y ADAMTS13 por SDS-PAGE e inmunotransferencia y ELISA. Análisis estadístico: ANOVA ($p=0,05$ significativo). Resultados: P no modifica los niveles de mRNA ($p=0,69$), intracelulares ($p=0,61$) y liberados ($p=0,65$) de VWF, y de mRNA ($p=0,74$) y liberados ($p=0,73$) de ADAMTS13. Sin embargo, disminuye en 1.4 veces los valores de ADAMTS13 intracelular. Cuando se combina P y H se produce un aumento significativo de 6 (VWF) y 30 (ADAMTS13) veces en los niveles de ambos mensajeros, y de 16 veces en los niveles de ADAMTS13 liberada. Además, se observa una disminución significativa de 2 veces de VWF tanto intracelular como liberado. **Discusión:** El sinergismo transcripcional de P y H, podría afectar los niveles de proteína de VWF por la acción de ADAMTS13 en el RE rugoso. El antagonismo observado en la liberación de VWF, podría deberse a la inhibición por P en la unión de H con el citocromo P450.

0007 (513) TRANSFECCIÓN INTRAMIOCÁRDICA DEL GEN DE VEGF165 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CORONARIA SEVERA SIN OPCIÓN TERAPÉUTICA (GÉNESIS-I). ENSAYO CLÍNICO FASE I. RESULTADOS PRELIMINARES. G Vera Janavel¹, L Favaloro², M Diez², O Mendiz², L Valdivieso², C Cortés², R Ratto², A Segovia², M Daicz², F Salmo², F Vaisbuj², G Garelli³, G Montero³, A Bercovich³, M Criscuolo³, A Crottogini¹

¹Universidad Favaloro; ²Fundación Favaloro; ³Bio Sidus <verajanavel@favaloro.edu.ar>

Hemos demostrado en cerdos con cardiopatía isquémica (CI) y ovejas con infarto agudo de miocardio (IAM) que un plásmido codificante para VEGF₁₆₅ (pVEGF) desarrollado en el país, en dosis doble a la máxima usada internacionalmente, induce angiogénesis mejorando la perfusión y función ventricular sin efectos adversos. Se recibió autorización del Comité de Ética y ANMAT para realizar un estudio clínico fase I prospectivo, abierto, sin grupo control, con el fin de evaluar la seguridad y secundariamente la eficacia de 3,8 mg de pVEGF en 10 pacientes con CI sintomática sin chances de revascularización. Criterios: 1) de inclusión: angor, isquemia y/o viabilidad, fracción de eyección =30%; 2) de exclusión: IAM, angor inestable, antecedente o detección de cáncer en screening, retinopatía proliferativa, valvulopatía aórtica y otros criterios estándar. **Métodos:** inyección intramiocárdica de pVEGF con catéter ventriculográfico provisto de aguja inyectora, en 10 alícuotas distribuidas en zonas isquémicas según cámara gamma y eco-estrés. Seguimiento: diario a 7 días, mensual a 6 meses y semestral a 2 años. Resultados a 3 meses (n=6). Seguridad: el procedimiento fue exitoso, sin complicaciones relacionadas con el catéter o con el pVEGF. Eficacia:

	CF	SAQ%	SDS	FE%
Basal	2,8±0,2	53,4±4,2	12±1,7	47,9±4,3
3 meses	1,4±0,3	80,9±4,2	8,5±1,8	53,5±4,6
P (Wilcoxon)	<0,05	<0,05	=0,08	<0,05

CF: clase funcional de angor. SAQ%: Seattle Angina Questionnaire (evalúa calidad de vida en función del angor siendo 100% el máximo). SDS: Summed Difference Score (diferencia estrés — reposo de scores de isquemia por cámara gamma). FE% (eco): fracción de eyección. Conclusión: a 3 meses, el tratamiento es seguro, mejora el angor, la calidad de vida y la función ventricular, con una fuerte tendencia a reducir la isquemia miocárdica. Estos Resultados preliminares son alentadores pero no permiten sacar conclusiones definitivas debido al n reducido, la falta de grupo control y el corto seguimiento.

0008 (553) LAS BIOPSIAS DE MUSCULO ESQUELETICO MOSTRAN ALTERACIONES MITOCONDRIALES SIMILARES A LAS DEL MUSCULO CARDIACO EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA CONGESTIVA. G H Guzman Mentesana¹, R Domínguez², R Córdoba³, A Báez¹, S Lo Presti¹, W Rivarola¹, P Pons⁴, R Fretes⁴, P Paglini¹

¹Catedra De Fisica Biomédica, Facultad de Ciencias Medicas Universidad Nacional de Cordoba; ²instituto nacional del corazon- la rioja; ³Sanatorio Allende- Córdoba - Argentina; ⁴Catedra de histología y microscopia electronica <drgzmanmentesana@argentina.com>

Las mitocondrias representan el 30% del volumen total de los miocitos del músculo cardíaco, y proveen el 90% de la energía que ellos requieren. En diversas cardiopatías se han encontrado anomalías en la estructura y función mitocondrial que podrían correlacionarse con patrones de hipertrofia, dilatación y arritmias cardíacas. Se estudió la estructura mitocondrial del músculo esquelético y cardíaco en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) para establecer si existe correlación entre las

alteraciones de ambos tejidos. Se incluyeron 13 pacientes sometidos a cirugía cardiovascular obteniendo biopsias de músculo pectoral y ventrículo izquierdo. El grupo control (n=5) fueron pacientes con comunicación interauricular y fracción de eyección > a 60%; el con ICC (n=8) presentaron cardiopatía isquémica y fracción de eyección < a 60%. Las muestras de ambos músculos se estudiaron en microscopio electrónico y se cuantificaron con el programa Axionvision estableciendo diferencias significativas con ANOVA. El músculo esquelético del grupo ICC mostró dilatación de crestas, aumento de matriz y reducción del área en un 75% con respecto al control (90,86µm²±6,87); (550,62µm²±56,48) p<0.0001. Alteraciones similares se observaron en el músculo cardíaco con una reducción del 78% en los pacientes con ICC vs control (160,37µm² ±9,87); (936,81µm²±78,48) p<0.0001. El grupo control mostró una reducción del área mitocondrial del músculo esquelético con respecto al cardíaco, en una relación 1.1; similar relación se encontró en el grupo con ICC. Las alteraciones ultraestructurales de las mitocondrias en músculo esquelético tienen relación con las alteraciones mitocondriales en corazón en paciente que presentan ICC, hecho que permitiría conocer a partir de una biopsia de músculo esquelético el estado ultraestructural de la mitocondria a nivel cardíaco. Los presentes Resultados son un aporte al conocimiento de la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca.

0009 (595) FUNCIONALIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA P (Gp-P) LINFOCITARIA EN LA COLITIS ULCEROSA (CU). C M Cortada¹, A Gil², S Goncalves², A Sambuelli², M C Rubio³, M A Carballo¹

¹CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica), Depto. de Bioquímica Clínica, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA.; ²Hospital de Gastroenterología "Dr. Carlos Bonorino Udaondo"; ³Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <eldecata@yahoo.com.ar>

La CU es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica en la que se postula una disregulación de la respuesta inmune de mucosa ante antígenos intraluminales en individuos genéticamente susceptibles. El gen de multiresistencia a drogas (MDR1) es un candidato de interés en la patogenia y respuesta terapéutica. MDR1 codifica para la gp-P, expresada en el epitelio intestinal, linfocitos de la lámina propia y periféricos, funcionando como una bomba de eflujo transmembrana para glucocorticoides y otras drogas usadas en la CU. **Metodología:** La función de la gp-P se evaluó en linfocitos aislados de sangre periférica de pacientes con CU en actividad (n=14) clasificados clínicamente como refractarios (n=9) o respondedores (n=5) al tratamiento, todos recibieron corticoides y en los refractarios se agregó tiopurinas o infliximab. Se estudió el eflujo de rodamina 123, sustrato de la gp-P, en ausencia y presencia del inhibidor Verapamilo (100µM) determinando la fluorescencia intracelular por citometría de flujo. Los Resultados se expresaron evaluando el comportamiento de dos marcadores (M1 y M2) en base al % de células que contienen máxima (M1)/mínima (M2) concentración del colorante, reflejando inactividad/actividad de gp-P. Resultados (X±DS): Respondedores sin inhibidor: M1=48±3 y M2=49±3, con inhibidor: M1=81±6 y M2=16±6. Refractarios sin inhibidor: M1=28±14 y M2=70±15, con inhibidor M1=50±21 y M2=48±22. Utilizando el test de ANOVA y post-test de Student-Newman-Keuls, se observaron diferencias significativas en refractarios versus respondedores (p<0.01) y versus controles sanos (n=68) previamente estudiados (p<0.001) (sin inhibidor M1=47±12 y M2=50±12, con inhibidor M1=82±8 y M2=14±9). Respondedores y controles sanos no mostraron diferencias (p>0.05). Conclusiones: los Resultados sugieren 1) un papel relevante de la gp-P en la refractariedad 2) una posible utilidad de este método en la predicción de la respuesta y en el estudio del papel de la gp-P en la patogenia de la CU.

0010 (160) DETERMINACIÓN DEL RH FETAL A TRAVÉS DEL ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN FETAL LIBRE EN PLAS-

MA MATERNO. C V Sesarini¹, M L Giménez², M A Redal¹, G Izbizky², H Aiello², P F Argibay¹, L Otaño²

¹Unidad de medicina molecular y genómica, instituto de ciencias básicas y medicina experimental, hospital italiano de buenos aires; ²Servicio de Obstetricia, Hospital Italiano de Buenos Aires <krlsesarini@yahoo.com>

Introducción: El análisis de ADN fetal libre (ADNfl) en plasma materno permite analizar material genético fetal sin realizar procedimientos invasivos. En mujeres Rh negativas (neg) sería de importancia para el manejo de la inmunización Rh. **Objetivo:** Evaluar la factibilidad y eficacia diagnóstica de la determinación del genotipo RhD fetal a través del análisis molecular de ADNfl en plasma de embarazadas Rh neg. **Materiales y Métodos:** Se analizaron 40 muestras de sangre de embarazadas Rh neg (edad gestacional media 31 semanas, rango 17 a 40). Se purificó ADN a partir de plasma y se amplificó en un termociclador en tiempo real una secuencia del exon 7 (gen RHD) con b-Actina como control interno. Los Resultados se expresaron en predicción de fenotipo RhD positivo (pos) y RhD neg y se compararon con el del recién nacido (RN). Se calculó sensibilidad, especificidad y valor predictivo. Resultados: Se detectó b-Actina en todas las muestras analizadas. La predicción del fenotipo RhD fue correcta en 36 pacientes (90%). Hubo 4 falsos positivos y 0 falsos negativos. La sensibilidad y especificidad fueron 100% y 71,4%; respectivamente. El valor predictivo de RhD pos fue 86,7% y RhD neg 100%. **Conclusión:** La genotipificación RHD fetal no invasiva fue factible en la mayoría de los casos. Los errores diagnósticos se produjeron en la primera etapa de la serie y correspondieron a Resultados falsos positivos, sin relevancia clínica dado que no modifica la conducta habitual donde no se cuenta con ésta información. Por el contrario, Resultados falsos negativos, no observados en el estudio, llevarían a omitir la profilaxis en la paciente no sensibilizada o perder la oportunidad de diagnóstico y tratamiento en la sensibilizada. **Discusión:** El estudio a través de plasma materno limitaría la profilaxis durante el embarazo sólo a mujeres con fetos RhD pos evitando una exposición innecesaria a un hemoderivado. La inclusión de otra secuencia del gen permitirá aumentar la especificidad del método.

PREMIO FARYNA

0011 (4) ROL CRITICO DE LA EXPRESION DE HEMO OXYGENASA 1 (HO-1) COMO UN MODULADOR DEL POTENCIAL INVASIVO DE CELULAS DE CANCER DE PROSTATA. G Gueron¹, M Ferrando¹, M Salierno², P De Luca¹, A De Siervi¹, E Vazquez¹

¹Departamento Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; ²INQUIMAE, Departamento Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales <ggueron@gmail.com>

El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres y es considerada una malignidad letal con gran incidencia en el mundo. La inflamación aparece como un factor de riesgo para esta enfermedad neoplásica. La Hemo Oxygenasa 1 (HO-1), es la isoforma inducible de la enzima limitante en la degradación del grupo hemo y actúa contrarrestando el estrés oxidativo e inflamatorio. En este trabajo investigamos la expresión de HO-1 y sus consecuencias funcionales en líneas tumorales de próstata sensibles (MDAPCa2b y LNCaP) e insensibles (PC3) a andrógenos. También observamos el impacto de la modulación genética y farmacológica de HO-1 en el crecimiento, la invasión y la migración celular. Nuestros Resultados muestran que los niveles de HO-1 están marcadamente disminuidos en PC3 comparados con MDAPCa2b y LNCaP. El tratamiento con hemina (70 µM, 24h), aumentó la expresión de HO-1 tanto a nivel proteico como de mRNA en todas las líneas tumorales y disminuyó la proliferación (23% y 45% (p<0.05) e invasión (68% y 51.7%, P<0.05) en

PC3 y MDAPCa2b respectivamente. Por fotografía 'time-lapse' comprobamos que el tratamiento de PC3 con hemina disminuyó significativamente la motilidad celular. Para confirmar estos Resultados, se generó la línea estable PC3HO-1, en la cual la sobreexpresión de HO-1 redujo significativamente la proliferación (42%, P<0.05) y migración (66,4%, P<0.05). El silenciamiento de HO-1 mediado por siRNA en MDAPCa2b incrementó la proliferación y la invasión (50% y 71%, p<0.05, respectivamente). Mediante gene-array de genes involucrados en inflamación y angiogénesis, identificamos a MMP9 como un nuevo blanco, cuya actividad y expresión fue modulada por manipulación genética y farmacológica de HO-1 en las líneas celulares de próstata. Estos Resultados implican por primera vez a HO-1 en la proliferación, migración e invasión celular de cáncer de próstata sugiriendo su rol potencial como blanco terapéutico en ensayos clínicos.

0012 (24) LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA A DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (RPA) MODULAN LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIPROGESTÁGENOS EN CARCINOMAS MAMARIOS EXPERIMENTALES. V Wargon¹, S Giulianelli¹, J P Cerliani¹, V Novaro¹, C Lanari¹

¹IBYME <wargon@dna.uba.ar>

A partir de un tumor mamario murino hormono-dependiente se generaron variantes independientes: C4-HI, sensible al antiprogéstágeno RU486 (RU), a partir del cual, se generó, por presión selectiva, la variante C4-HIR con resistencia adquirida al RU; y la variante C4-2-HI con resistencia *de novo* al RU. Hemos demostrado que tanto la resistencia *de novo* como la adquirida están asociadas a una menor expresión de RPA. La expresión de RPA está silenciada por metilación de su promotor en el tumor C4-2-HI y éste al ser cultivado en plástico mantiene la resistencia al RU. Sin embargo, células C4-HIR en plástico son sensibles al RU y expresan RPA. Nuestra hipótesis es que los niveles de RPA determinan la sensibilidad al RU en los carcinomas mamarios. El objetivo de este trabajo fue a) evaluar la respuesta al RU al cultivar las células en matrigel, o al reinocularlas *in vivo*; b) evaluar si el tratamiento de C4-2-HI con un agente desmetilante induce la reexpresión de RPA y la sensibilidad al RU y c) comparar el efecto de RU *in vivo* en dos líneas de cáncer de mama humano, una de las cuales sobre-expresa PRA. El RU induce muerte celular en cultivos C4-HI y C4-HIR en matrigel, mientras que células C4-2-HI son resistentes. Las células C4-HIR, que recuperan la expresión de RPA y la sensibilidad al RU en plástico, al ser reinoculadas en ratones crecen más en presencia de RU que en su ausencia (p<0.001). Tumores C4-2-HI tratados con el agente desmetilante 5'AZAdc tanto en cultivo en plástico (5x10⁷M; p<0.05) como *in vivo* (1 mg/kg/día; p<0.05) recuperan la expresión de PRA y la sensibilidad al RU. Por último, el crecimiento de tumores generados en ratones *nude* con células T47D que sobre-expresan PRA es disminuido en presencia de RU (12 mg/kg/día; p<0.05). En conclusión hemos logrado revertir la resistencia *de novo* al RU mediante un agente desmetilante y hemos demostrado que los niveles de expresión de RPA median la regresión tumoral inducida por antiprogéstágenos.

CARDIOVASCULAR O1

0013 (134) LOS PEQUEÑOS PROTEOGLICANOS RICOS EN LEUCINA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR Y SU RELACIÓN CON LA HETEROGENEIDAD ENDOTELIAL. G C Calabrese¹, S Gazzaniga², R Wainstok³

¹Cátedra De Biología Celular-Facultad De Farmacia Y Bioquímica - Universidad De Buenos Aires; ²Departamento De Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires; ³Departamento De Química Biológica-Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales- Universidad De Buenos Aires. <gcalabe@ffyba.uba.ar>

Los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs), decorina y biglicano, desempeñan papeles importantes en la organización de la matriz extracelular vascular y en la regulación de la proliferación y migración celular, procesos esenciales para la angiogénesis. Sin embargo, poco se conoce sobre la relación que existe entre la producción de SLRPs y la amplia heterogeneidad endotelial. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la producción y secreción de los SLRPs en tres líneas endoteliales murinas cultivadas en condiciones basales. La producción de los proteoglicanos de las líneas endoteliales murinas H5V (cardíaca), 1G11 (pulmonar) y REC A-4 (renal) fue evaluada sobre la fracción subcelular correspondiente a las membranas biológicas obtenidas por centrifugación diferencial; mientras que la secreción fue analizada en el sobrenadante de los cultivos previa purificación parcial por cromatografía de intercambio iónico. En ambos casos las muestras fueron estudiadas por Western Blot con y sin digestión previa con condroitinasa ABC. La producción del proteoglicano decorina (100 kDa) mostró diferencias significativas entre las líneas REC A-4 vs 1G11 ($P < 0.05$, $n=3$) y entre H5V vs 1G11 ($P < 0.01$, $n=3$). La comparación relativa de la producción del esqueleto proteico (50 kDa) con respecto al proteoglicano mostró acumulación del esqueleto proteico para REC-A4 y 1G11 ($P < 0.01$; $n=3$). La secreción de decorina fue detectada en las líneas H5V y 1G11 sólo luego de la degradación enzimática. La producción del proteoglicano biglicano (100 kDa) no registró diferencias significativas entre las líneas estudiadas, sin embargo se detectaron diferencias significativas en la síntesis del esqueleto proteico entre REC-A4 vs H5V ($P < 0.001$) y entre REC-A4 vs 1G11 ($P < 0.001$). La secreción de biglicano sólo se detectó frente a la estimulación con ECGS. Las líneas celulares muestran diferencias en la glicosilación del esqueleto proteico, lo que modificaría la actividad biológica de los SLRPs.

0014 (198) INFLUENCIA DEL AYUNO EN LOS EFECTOS DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) EN CORAZÓN DE RATA SOMETIDO A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN.

M d M Jaitovich¹, C Sbarbati¹, R Hermann¹, M G Marina Prendes¹, E Savino¹, A Varela¹

¹Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, uba. Iquimefa-conicet. <gmarina@ffyba.uba.ar>

Trabajos anteriores demostraron que el PC mejora la recuperación funcional en corazones provenientes de ratas alimentadas ad libitum (AL) sometidos a isquemia global flujo cero (25 min) (I) - reperusión (30 min) (RP) y empeora la recuperación en corazones de ratas ayunadas 24 h (AY). El objetivo fue evaluar si los efectos observados se acompañan de cambios en el consumo de glucógeno, el daño oxidativo y la necrosis celular. El PC consistió en 6 ciclos de RP(10 seg)-I(10 seg) al finalizar la isquemia sostenida. El daño oxidativo se evaluó mediante la medición de TBARS y la necrosis celular mediante la determinación de la creatina quinasa (CK) liberada al medio. La estadística se hizo con ANOVA ($n=8$). Coincidiendo con trabajos anteriores, los niveles preisquémicos de glucógeno ($\mu\text{g}/100 \text{ mg ps}$) fueron mayores en AY que en AL ($321,55 \pm 7,23$ vs $247,45 \pm 4,11$ $p < 0,05$) y similares al finalizar la I y la RP (25 min I: $69,23 \pm 16,72$ (AY) vs $75,23 \pm 19,46$ (AL); 30 min RP: $88,73 \pm 21,60$ (AY) vs $93,25 \pm 13,90$ (AL)). El PC aumentó el consumo de glucógeno durante la RP en ambos estados alimenticios (30 min RP: AY $14,67 \pm 3,85$ $p < 0,01$ vs AY control; AL $10,33 \pm 3,39$ $p < 0,01$ vs AL control). El PC disminuyó los niveles de TBARS (nmol/gh) y la liberación de CK (UI/gh) en AL (TBARS: $12,12 \pm 1,49$ vs $20,73 \pm 2,1$ $p < 0,05$; CK: $79,9 \pm 6,05$ vs $141,64 \pm 6,55$ $p < 0,05$), en tanto que en AY no afectó los niveles de TBARS pero aumentó la liberación de CK ($55,07 \pm 1,63$ vs $34,36 \pm 1,35$ $p < 0,05$). Los Resultados confirman los efectos beneficiosos del PC sobre la preservación de la viabilidad celular y la disminución del daño oxidativo en corazones provenientes de ratas AL y demuestran que dicha protección se acompaña de una mayor utilización de glucógeno. En el caso de AY, estado en el que está activado el catabolismo lipídico, los datos sugieren que la estimulación de la glucogenólisis durante

la RP es nociva y la menor recuperación contráctil observada en trabajos anteriores se debería a una mayor necrosis celular.

0015 (267) PROGRAMACIÓN DE ALTERACIONES DEL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO Y DE LA MORFOLOGÍA RENAL POR RESTRICCIÓN DE ZINC DURANTE LA VIDA FETAL.

A L Tomat¹, M Ploder¹, R Elesgaray¹, S FINELLA¹, A M Balaszczuk¹, M Á Costa¹, C Arranz¹

¹Cátedra de Fisiología Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires <atomat@ffyba.uba.ar>

Previamente, demostramos que la deficiencia moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento induce un aumento de la presión arterial y alteraciones de la función y morfología renal en la vida adulta, asociados a una disminución en la actividad del sistema del óxido nítrico (NO) vascular y renal **Objetivo:** Evaluar si los efectos renales de la deficiencia moderada de zinc, observados en la vida adulta, se relacionarían con alteraciones del sistema del NO y la morfología renal generadas durante el periodo nefrogénico (vida fetal y postnatal temprana). Ratas Wistar hembras recibieron desde el inicio del apareo y durante la lactancia: Dieta control (C, 30 ppm zinc) o Dieta baja (B, 8 ppm zinc). Se estudió la actividad de la NO sintasa (NOS), con L-[U14C]-arginina, en el riñón de las crías machos de 6 y 21 días de vida. Se determinó el número total de glomérulos por riñón, mediante la técnica de maceración, en las crías macho de 21 días de vida. Se determinó la presencia de signos fibrosis renal mediante la coloración Tricrómico de Masson. Los animales B presentaron una menor actividad de la NOS renal tanto a los 6 como a los 21 días de vida con respecto al grupo control (6 días: C: 247 ± 4 , B: $188 \pm 2^*$; 21 días: C: $311 \pm 7^\dagger$, B: $241 \pm 4^*$). Los riñones de los animales B mostraron menor número de glomérulos que el grupo C (C: 18130 ± 385 , $12540 \pm 334^*$) $*p < 0.001$ vs C; $^\dagger p < 0.01$ vs 6 días. No se observaron signos de fibrosis en el tejido renal de los animales B a los 6 y 21 días. La deficiencia de zinc en etapas tempranas del desarrollo, durante el período nefrogénico, induce una disminución del número de glomérulos y de la actividad sistema del NO renal. Estas alteraciones constituirían uno de los posibles mecanismos por los cuales esta injuria nutricional programa, en el adulto, un aumento de la presión arterial y alteraciones renales.

0016 (368) EFECTOS CARDIOVASCULARES Y METABÓLICOS DE LA SOBREENEXPRESIÓN DE TRH DIENCEFÁLICA EN UN MODELO DE RATÓN TRANSGÉNICO. M S Landa¹, S I García¹, M Schuman¹, A L Alvarez¹, C Pirola¹

¹Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, IDIM-CONICET <masillanda@yahoo.com>

La TRH diencefálica (TRHdc) interviene en múltiples actividades fisiológicas. Demostramos que participa en la regulación de la presión arterial (PA) en la rata SHR en la que existe una hiperactividad del sistema reversible con AS que no depende de la AII ni de las hormonas tiroideas. Postulamos que la sobreexpresión permanente de TRH en ratón transgénico (Tg) conduciría a un aumento sostenido de PA y desbalance de los sistemas regulatorios de la ingesta calórica y gasto energético, independientemente del estado tiroideo. Por método pletismográfico y telemetría los Tg (F7) mostraron nivel de PAS mayor a los controles C57(C) (F7: $118.7 \text{ mmHg} \pm 6.2$ vs C: $105.3 \text{ mmHg} \pm 7.5$). Para comparar el estado metabólico se midió el peso corporal que resultó menor en los Tg respecto a los C57 (F7: $28.6 \text{ g} \pm 1.96$ vs C: $30.70 \text{ g} \pm 1.60$, $p < 0.05$). Además se midió ingesta de alimento y agua mediante jaulas metabólicas y observamos que los ratones Tg presentaron mayores ($p < 0.001$) niveles de ingesta de alimento (F7: $5.52 \text{ g} \pm 0.30$ vs C: $4.61 \text{ g} \pm 0.26$) y agua (F7: $5.72 \text{ ml} \pm 0.55$ vs C: $4.53 \text{ ml} \pm 0.34$) respecto a los C57. Confirmando el fenotipo de esta cepa, los Tg presentaron mayor contenido de TRHdc que los C57 (RIA) (F7: 668.25 ± 250.3 vs C: $378.03 \pm 158.8 \text{ pg/mg prot}$, $p < 0.05$) acompañado de un aumento del 64% en la expresión del RNAm de TRH medido por RT-PCR

en tiempo real. No se observaron diferencias en los niveles de T3 y T4. De esta manera demostramos que la sobreexpresión de TRHdc conduce a un aumento de PA, confirmado mediante una técnica robusta como la telemetría. Además, el aumento descrito de ingesta acompañado de una disminución del peso corporal se debería a un mayor gasto energético inducido por TRH, en parte, a través de un aumento de descarga simpática, sin provocar cambios en el estado tiroideo.

0017 (436) ACTIVACIÓN TEMPORAL DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CARDIACO Y EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON LOSARTAN SOBRE EL REMODELAMIENTO VENTRICULAR POST-INFARTO EN CONEJOS. G E González^{1,2,3}, M L Krieger^{1,2,3}, I M Seropian^{1,2,3}, M A López Verilli^{3,4,5}, M M Gironacci^{3,4,5}, S Cavallero^{3,5,6}, V H Tomasi^{1,2,3}, L Wilensky^{1,2,3}, F Matorra^{1,2,3}, R J Gelpi^{1,2,3}, C Morales^{1,2,3}

¹Instituto de Fisiopatología Cardiovascular; ²Facultad de Medicina; ³Universidad de Buenos Aires; ⁴Departamento de Química Biológica; ⁵Facultad de Farmacia y Bioquímica; ⁶Cátedra de Fisiopatología <gegonzal@fmed.uba.ar>

Se examinó la expresión temporal del receptor AT1 de angiotensina II (R-AT1; western) y los niveles de Angiotensina II (All; ELISA) cardiacos post-infarto en conejos. Asimismo, se estudiaron los efectos del Losartan (L; 12.5 mg/Kg/d) en los parámetros funcionales e histológicos cuando el tratamiento fue iniciado temprana y tardíamente post-infarto (3hs y 15 días respectivamente) y fue mantenido durante períodos de 3 y 5 semanas. R-AT1 aumentó en la zona de infarto a los 15 y 35 días (P<.05). All aumentó (P<.05) a las 24hs en septum y a los 4 días en la zona de infarto, disminuyendo luego progresivamente. La administración temprana de L redujo los macrófagos (4.15±0.05 vs 3.05±0.02) y los linfocitos (2.23±0.05 vs 1.48 ±0.01) a los 4 días en la zona de infarto. El tratamiento por 5 semanas redujo el colágeno en la cicatriz (IM: 70.5±2.35%; IM+L: 57.5±2.48; P<.05) y, los macrófagos y linfocitos persistieron en dicha zona. A los 35 y 56 días las curvas presión-volumen diastólicas de animales no tratados se desplazaron a la derecha (P<.05), este desplazamiento fue aún mayor en grupos tratados por 5 semanas (P<.05). La disminución de la contractilidad en los grupos no tratados y en los tratados durante 5 semanas, fue atenuada luego de 3 semanas de tratamiento. La expresión temporal del R-AT1 y All post-infarto en conejos fue diferente a la previamente descrita para otras especies. El tratamiento durante 5 semanas modificó desfavorablemente el remodelamiento post-infarto mientras que el tratamiento durante 3 semanas atenuó dicho efecto. El enlentecimiento del proceso reparativo observado con 5 semanas de tratamiento podría haber determinado el remodelamiento adverso.

0018 (567) DAÑO MIOCÁRDICO POR REPERFUSIÓN: ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (EROS) VS. REACTIVACIÓN DEL INTERCAMBIADOR NA+/H+ (NHE-1). S M Mosca¹, J C Fantinelli¹, C Garcarena¹, I L Ennis¹, G Pérez¹, H E Cingolani¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP <gustavop41@hotmail.com>

La restitución del flujo sanguíneo al miocardio isquémico es la mejor estrategia terapéutica para reducir el tamaño de infarto (TI). Sin embargo, esta maniobra es causa del daño por reperfusión, el cual podría deberse a la explosión de EROs o a la reactivación del NHE-1 que ocurre en este período. Nuestro objetivo fue dilucidar este interrogante en un modelo de isquemia regional en corazón aislado de rata, en el cual se realizó un período de 40 min de oclusión coronaria seguidos de 2 hs de reperfusión. TI y área de riesgo (AR) se evaluaron por tinción con TTC y azul de Evans. Se estudiaron los efectos de 3 intervenciones farmacológicas al inicio de la reperfusión: eliminación de EROs (2-mercaptopropionilglicina, MPG, 2 mmol/L), inhibición del NHE-1 (cariporide, C, 10 µmol/L) o inhibición de fosfodiesterasa-5A (sildenafil, S, 1 µmol/L). Se determinó TI y peroxidación lipídica (TBARS) y la fosforilación de ERK1/

2, p90rsk y del NHE-1 en el sitio de consenso de la proteína 14-3-3. Las 3 intervenciones redujeron el TI y la fosforilación del NHE-1 en magnitud similar. Sin embargo, mientras C y MPG redujeron TBARS, S no las afectó.

	TI (% de AR)	TBARS (nmol/g de tejido)	P-ERK1/2 (% del control)	P-p90rsk (% del control)	P-NHE-1 (% del control)
control	28±2 n=10	10±1 n=10	235±57 n=4	232±57 n=4	207±30 n=4
MPG	13±2* n=6	4±1* n=6	89±9* n=4	97±15* n=4	122±15* n=4
C	13±2* n=7	5±1* n=7	118±19* n=4	109±20* n=4	128±15* n=4
S	10±3* n=8	9±1 n=5	264±26 n=4	223±18 n=4	123±6*, n=4

*P<0.05 vs control. La combinación de intervenciones no mejoró la protección. TI: C+MPG (14 ± 2 %, n=10), C+S (9 ± 3 %, n=5) or MPG+S (13 ± 3 %, n=6). Nuestros datos sugieren que el daño por reperfusión resultaría de la reactivación del NHE-1, siendo la explosión de EROs un mero disparador de la misma. Los Resultados obtenidos con S permiten sugerir además que es posible reducir el TI disminuyendo la fosforilación del NHE-1 a pesar de mantener las EROs elevadas.

0019 (648) INTERACCIONES ENTRE LA INSULINA Y LA ANGIOTENSINA II EN EL CONTROL CENTRAL DE LA PRESION ARTERIAL. M A Mayer¹, J Giani¹, C Höcht¹, F Dominici¹, E Silberman¹, J Opezzo¹, M Gironacci¹, C Taira¹, B Fernandez¹, A M Puyó¹

¹Facultad de farmacia ay bioquimica uba <mayer_marcos@hotmail.com>

La angiotensina II (AngII) puede modificar la respuesta a la insulina. Sin embargo, no se ha estudiado la influencia de la insulina sobre la vía de señalización de la AngII. Con el objetivo de evaluar si la insulina modifica centralmente la respuesta a la AngII, ratas Sprague-Dawley macho, de 350 gramos, fueron anestesiadas con una mezcla de cloralosa/uretano y se les canuló una arteria carótida para la medición de la presión arterial media (PAM). Se colocó una aguja en un ventrículo lateral y se perfundió insulina (12mU/h) o vehículo a un flujo de 4 microl/h durante dos horas y se evaluaron los cambios en la PAM en respuesta a la inyección de AngII 5pmol. Tras registrar los cambios hemodinámicos en respuesta a la AngII durante 10 minutos, los animales fueron sacrificados, se les extrajo el hipotálamo e inmediatamente fue colocado a -70°C. Posteriormente, se analizó mediante inmunoprecipitación e inmunoblotting, la fosforilación del receptor de insulina en residuos tirosina y de la fosforilación de ERK1/2 a nivel hipotalámico. Se consideró como significativo a un valor de p<0,05. Mientras que la inyección de AngII no modificó la PAM en ratas tratadas previamente con vehículo, ésta se incrementó de forma significativa tras la administración previa de insulina. AngII incrementó en más de dos veces la fosforilación de ERK 1/2. De forma similar, la infusión de insulina durante dos horas aumentó significativamente la fosforilación de ERK 1/2. Los animales que recibieron infusión de insulina seguida de AngII presentaron valores 4,5 veces mayores que quienes sólo recibieron vehículo y cercanos al doble de los que recibieron AngII sin la infusión previa de insulina. **Conclusión:** La insulina es capaz de potenciar de forma aguda la respuesta presora central a la angiotensina II. El incremento de la fosforilación de ERK 1/2 tras la infusión de insulina y AngII sugerirían que esta vía podría estar involucrada en la potenciación observada en la respuesta presora.

0020 (653) LA SOBRECARGA DE CALCIO QUE OCURRE DURANTE LA REPERFUSIÓN DEL MIOCARDIO, ES DEBIDA A UNA RÁPIDA LIBERACIÓN DE CALCIO DEL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO. C Valverde¹, D Kornyejev², A Escobar², A Mattiazzi¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares - UNLP; ²Biological Engineering and Small Scale Technologies, School of Engineering, University of California, USA <valverdeca@med.unlp.edu.ar>

Luego de un período breve de isquemia, sobreviene una disfunción contráctil sostenida en el tiempo que se manifiesta como una lenta recuperación de la función cardíaca, conocida como atontamiento miocárdico. Existe evidencia que avala que esta disfunción miocárdica ocurre como consecuencia de una sobrecarga de calcio (Ca^{2+}) durante los primeros minutos de reperfusión (R). Resultados previos de muchos laboratorios, incluyendo el nuestro, han descrito una cascada de eventos iniciados por la reperfusión, que involucra la activación de los intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), asociada a una entrada aumentada de Ca^{2+} a la célula. Aún no se conoce si el ingreso de Ca^{2+} es *per se* el causante del aumento del Ca^{2+} citosólico al inicio de la R, o si éste ocurre como consecuencia de una liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático (RS), iniciada por el influjo de Ca^{2+} . Para abordar este interrogante, se realizó un protocolo de 12 min de isquemia global seguido de R en corazones de ratones perfundidos de acuerdo a la técnica de Langendorff, colocados en un equipo de microscopia de fluorescencia de campo local pulsado, cargados con indicadores de Ca^{2+} (Rhod-2 y Mag-Fluo-4 para evaluar el Ca^{2+} citosólico o del RS, respectivamente). Los Resultados indican que al inicio de la R ocurre un incremento en el calcio diastólico que gradualmente retorna a los valores de la preisquemia. Este aumento se asocia con una disminución en el contenido de Ca^{2+} del RS, que se recupera hacia los 10 minutos de R, con un perfil especular al Ca^{2+} citosólico. En experimentos adicionales en los cuales se aplicaron pulsos de cafeína (20 mM), se confirmó que el contenido del Ca^{2+} del RS se encuentra disminuido durante el inicio de la R. Los presentes hallazgos indican que el incremento en el Ca^{2+} diastólico que ocurre durante la R, se debería a una rápida liberación de Ca^{2+} desde el RS, y no sólo por el ingreso de Ca^{2+} a través del intercambiador NCX, como se pensaba hasta el momento.

CARDIOVASCULAR O2

0021 (58) EVENTOS CELULARES Y MOLECULARES REGULADOS POR ESTRONA EN CÉLULAS ENDOTELIALES. M B Rauschemberger^{1,2}, V L Massheimer^{1,2}

¹Cátedra de Bioquímica Clínica II - Dto. Biología, Bioquímica y Farmacia - UNS; ²CONICET <mbrausch@criba.edu.ar>

La proliferación, migración, apoptosis y la producción de vasoactivos constituyen eventos bioquímicos susceptibles de ser alterados frente a una injuria vascular. Considerando que en la postmenopausa existe un mayor riesgo de daño vascular, y siendo la estrona (E_1) un estrógeno relevante en este período, el objetivo de este estudio fue investigar el rol de la hormona sobre los eventos anteriormente mencionados. Se emplearon cultivos de células endoteliales (CE) obtenidas por explante de aorta de ratas Wistar. Utilizando el método de Griess se observó que E_1 10nM estimula significativamente la producción de NO (40% s/c; $p < 0.01$). Empleando la técnica de incorporación de ^3H -timidina se observó que 24 hs de tratamiento con E_1 aumenta significativamente la proliferación celular (144 ± 16 vs 212 ± 19 cpm $\times 10^3$ /mg prot; C vs E_1 , 10 nM; $p < 0.05$). Para evaluar si este efecto se debe a la acción de la E_1 o a su conversión a E_2 se utilizó el compuesto Equilin (Eq), inhibidor de la 17- β -HSD1, enzima que media este paso. La presencia del mismo no modificó el estímulo proliferativo ejercido por la hormona (47% vs 50% vs 33%, s/c control; E_1 vs $\text{E}_1 + \text{Eq}$ 1 μM vs $\text{E}_1 + \text{Eq}$ 10 μM ; $p < 0.01$). La participación del receptor de estrógeno (RE), se evaluó empleando el antagonista ICI 182780. Este compuesto bloquea el efecto proliferante ejercido por E_1 luego de 24 hs de tratamiento (94% vs 9% s/c; E_1 vs $\text{E}_1 + \text{ICI}$ 10 μM , $p < 0.05$). La preincubación de CE con el inhibidor específico de MAPK (PD 98059) suprime la incorporación de timidina mediada por la hormona (94 vs 7%, E_1 vs $\text{E}_1 + 5 \mu\text{M}$ PD; $p < 0.05$). Empleando ensayos de migración celular y fragmentación de ADN observamos que la E_1 inhibe significativamente la movilidad celular (24 ± 2 vs 2 ± 0.2 cél/campo; C vs E_1 ; $p < 0.01$) y previene el efecto proapoptótico del peróxido de hidrógeno. Los Resultados sugieren que, la E_1 mo-

dula en forma directa los eventos celulares estudiados y no por su conversión a E_2 , empleando mecanismos que involucran la participación del RE y la vía MAPK.

0022 (200) PRECONDICIONAMIENTO METABÓLICO (PM) Y UTILIZACIÓN DE LAS RESERVAS ENERGÉTICAS EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA (I) – REPERFUSIÓN (RP). M d M Jaitovich¹, R Hermann¹, C Sbarbati¹, M G Marina Prendes¹, E Savino¹, A Varela¹

¹Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-CONICET. <gmarina@ffy.uba.ar>

El PM consiste en el acceso restringido a la comida durante dos horas fijas diarias, durante 3 semanas. Anteriormente se mostró que el PM mejora la recuperación funcional del corazón sometido a I-RP, efecto acompañado de un aumento en la actividad de la glucosa-6-P-deshidrogenasa, enzima clave de la vía de las pentosas que contribuye al mantenimiento de un entorno citosólico reducido. El objetivo fue evaluar, la acción del PM sobre la utilización de las reservas energéticas endógenas y la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a I global flujo cero (25min)- RP (30min). Se evaluó la necrosis celular mediante la determinación de la creatina quinasa (CK) liberada al medio (UI/gh). La estadística se hizo con ANOVA ($n=10$). El nivel preisquémico (pre-I) de triglicéridos (TG) ($\mu\text{mol/gps}$) fue menor en corazones de ratas sometidas a PM que en los alimentados (AL) ($5,08 \pm 0,87$ vs $8,63 \pm 0,45$ $p < 0,05$). Al finalizar la RP los TG aumentaron en los corazones PM y no se modificaron en los AL (PM: $8,06 \pm 0,37$ $p < 0,05$ vs pre-I; AL: $9,84 \pm 0,62$). El nivel pre-I de glucógeno ($\mu\text{g}/100\text{mgps}$) fue mayor en AL que en PM ($247,45 \pm 4,12$ vs $101,62 \pm 11,4$ $p < 0,05$), disminuyó durante la I en ambos (AL: $66,82 \pm 16,73$, PM: $19,10 \pm 4,38$) y aumentó durante la RP más marcadamente en los PM (PM $130,72 \pm 5,73$ vs AL $93,25 \pm 13,90$ $p < 0,05$). La acumulación isquémica de lactato ($\mu\text{mol/gps}$) fue mayor en PM ($79,54 \pm 3,36$ vs $63,11 \pm 5,63$ $p < 0,05$). El PM no afectó la relación GSH/GSSG al final de la RP ($6,28 \pm 0,21$ vs $7,92 \pm 1,7$). Coincidiendo con la mejor recuperación funcional, el PM disminuyó la liberación de CK ($98,29 \pm 11,72$ vs $141,65 \pm 6,55$ $p < 0,05$). Los Resultados indican que la mejor recuperación funcional en PM se debe -al menos en parte- a una disminución de la necrosis celular, que no se acompaña de preservación de la relación GSH/GSSG. Los Resultados también indican una mayor utilización de glucosa durante la I y una mayor recuperación de las reservas energéticas durante la RP.

0023 (434) LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO SON LAS MEDIADORAS DE LA ACTIVACIÓN DEL COTRANSPORTADOR $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ CARDÍACO INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II. V C De Giusti¹, E A Aiello¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares (CIC) <vdegiusti@med.unlp.edu.ar>

El intercambiador Na^+/H^+ (NHE) junto al cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) restablecen el pH intracelular (pH_i) ante situaciones que llevan a la acidificación celular cardíaca. La Angiotensina II (AngII) es una hormona fuertemente implicada en la fisiopatología cardíaca. Su papel en la activación del NHE es ampliamente aceptado. Por otra parte, nosotros demostramos recientemente que las especies reactivas del oxígeno (ROS) actúan como mediadores en la señalización intracelular del efecto inotrópico positivo de la AngII y la endotelina-1. El objetivo del presente trabajo fue dilucidar el rol de la AngII y los ROS en la recuperación del pH_i mediada por el NBC. La actividad del NBC se estudió mediante epifluorescencia en miocitos de gato cargados con BCECF. Se realizaron pulsos de amonio en un medio con bicarbonato y la recuperación de la acidosis se ajustó a una curva exponencial a partir de la cual se calculó el flujo de protones (J_H^+) a pH 6.8. Los experimentos se realizaron en presencia de HOE642 10 μM , inhibidor del NHE. El J_H^+ control fue 1.06 ± 0.15 mM/min, $n=9$. El agregado de AngII 100 nM al medio aumentó el J_H^+ a 1.70 ± 0.18

mM/min, n=6; p<0.05. La activación inducida por AngII quedó abolida cuando las células se preincubaron con celeritrina 2 µM, bloqueante de la PKC (J_H 0.76±0.15 mM/min, n=10; p<0.05), con U0126 10 µM, inhibidor de la MAP quinasa ERK (J_H 0.73±0.15 mM/min, n=5; p<0.05), con MPG 2 mM, secuestrador de los ROS (J_H 0.83±0.09 mM/min, n=9; p<0.05) ó con Apocinina 300 µM, inhibidor de la NADPH oxidasa (J_H 1.16±0.21 mM/min, n=5; p<0.05). Ninguna de las drogas empleadas afectó significativamente el J_H basal. El efecto de AngII fue mimetizado por el agregado de H₂O₂ 100 µM al medio (J_H 1.59±0.24 mM/min, n=8). Los Resultados nos permiten concluir que la AngII estimula al NBC mediante la generación de ROS por la NADPH oxidada y la activación de PKC y ERK, representando un mecanismo relevante ante la acidosis producida por situaciones fisiológicas y/o patológicas.

0024 (138) CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS SISTÉMICAS Y CARDÍACAS EN JOVENES PREHIPERTENSOS E HIPERTENSOS. O A Pinilla ¹, J L Bocian ¹, J M Badr ¹, L P Novareto ¹, I L Ennis ¹, E M Escudero ¹

¹Centro de investigaciones Cardiovasculares <opinilla@atlas.med.unlp.edu.ar>

El presente trabajo se proyectó para analizar las características estructurales y funcionales del ventrículo izquierdo (VI) y de parámetros hemodinámicos sistémicos en jóvenes pre-hipertensos (PH) e hipertensos (H). Se estudiaron 448 alumnos (290 mujeres), 21.11 ± 0.11 años, de segundo año de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP. La medición de la presión arterial con un esfigmomanómetro de mercurio, así como la definición de de PH e H se basaron en las recomendaciones del JNC VII. La estructura y función VI fue realizada con un estudio ecocardiográfico empleando equipos Sono Site Micro Maxx. La H ocurrió en 26 de los 448 participantes (5.80%); la PH fue detectada en 195/448 (43.53 %) en ambos casos la prevalencia fue mayor en los varones (H: 12.66 vs 2.07 % - p<0.01; PH: 60.13 vs 34.48% p<0.01). Los PH e H presentaron mayor espesor parietal (8.53±0.07, y 9.19±0.20 vs 8.01±0.05 mm) y mayor índice de masa ventricular izquierda que los normotensos (N) (72.80±1.13 y 78.45±3.08 vs 66.67±0.84 g/m²) (todos p<0.05). La función sistólica evaluada por el porcentaje de acortamiento medio-ventricular corregido por estrés fue similar en los tres grupos (PH: 103.89±1.82, H: 96.37±6.35, N: 103.03±1.29 % -ns). Los H mostraron disfunción diastólica evaluada por la velocidad del anillo mitral en relación a los PH y N (H: 1.75±0.08 vs PH: 1.97±0.03, y vs N: 2.06±0.04 p<0.05). La valoración de la elasticidad arterial por medio del cociente entre la presión de pulso y el volumen latido fue menor en los H en relación a los N (1.22±0.05 vs 1.06±0.02 mmHg/ml/m² p<0.01). La resistencia periférica no mostró diferencias entre los grupos (PH: 2384.65±53.24, H: 2482.44±105.83, N: 2376.86±46.02 dinas*seg*cm⁻⁵*m²). Los datos referidos muestran que a pesar de la edad tanto los H como los PH mostraron evidencias de compromiso cardiovascular preclínicos, señalando la precocidad en la aparición de los mismos en el escenario de la hipertensión arterial.

0025 (469) INFLUENCIA DEL PESO CARDIACO SOBRE EL NÚMERO, BINUCLEACIÓN Y PLOIDÍA DE LOS MIOCITOS EN LA MIOCARDIOPATÍA DILATADA HUMANA. D Fornoni ¹, P Cabeza Meckert ², C Vigliano ¹, R Laguens ³

¹Fundación Favaloro; ²Fundación Favaloro, CIC Pcia Bs As; ³Fundación Favaloro, CIC Pcia Bs As <dvfornoni@yahoo.com.ar>

Con el fin de indagar si existe hiperplasia miocítica en corazones humanos hipertróficos, se aislaron miocitos del ventrículo izquierdo (VI) de 15 corazones explantados de pacientes con miocardiopatía dilatada idiopática (MCD) (333.7g de peso medio) y de 5 corazones normales (CN) de donantes para trasplante cardiaco (199.9 g). En ellos se determinó el número de núcleos

por miocito, el volumen celular y la ploidía nuclear. Los Resultados están resumidos en la Tabla. En la MCD dilatada el volumen miocítico fue mayor que en los CN (39133 mm³ vs 14031 mm³, p<0.001), el número total de miocitos por VI fue significativamente menor en la MCD que en los CN, p<0.05) y el porcentaje de miocitos binucleados fue mayor en la MCD que en los CN, p<0.001). En tanto que el % de núcleos diploides y tetraploides fue similar en MCD y en CN, la proporción de núcleos hipertetraploides(= 8N) fue significativamente mayor en MCD que en CN, p<0001). Cuando los casos de MCD se dividieron en dos grupos, uno de <300g y otro de >300g de peso del VI, se observó que el volumen miocítico y el % de células poliploides eran similares, en tanto que los de <300g tenían un número significativamente menor de miocitos, p<0.001), un aumento de la proporción de miocitos binucleados, (p<0.03) y del % de células hipertetraploides (p<0.001). Estos Resultados indican que en la MCD existe una disminución significativa del número de miocitos comparado con los controles, y que los corazones de mayor peso tienen un número significativamente mayor de miocitos y una disminución de la proporción de células con dos núcleos y de núcleos poliploides que los de menor peso, sugiriendo que a medida que se incrementa el peso del VI, existe división nuclear y citoplasmática.

Grupo	Vol. (mm ³)	N° total x 10 ⁶	% 1 núcleo	% 2 núcleos	% tetraploides	% hipertetraploides
Control	14031.68	14.61	82.9	17.1	29.16	10.9
MCD <300g	39838.77	6.91	63.95	36.05	21.9	33.7
MCD >300g	37418.66	10.70	71.56	28.44	26.07	25.3

0026 (566) HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA: IMPACTO DEL ENTRENAMIENTO FÍSICO SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CARDÍACA. M Nolly ¹, O Pinilla ¹, C Garcíarena ¹, M Carranza ¹, E Escudero ¹, H Cingolani ¹, I Ennis ¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP <mariela.nolly@gmail.com>

El estiramiento del miocardio producido por sobrecarga hemodinámica y/o liberación de factores humorales propios de diversas patologías cardiovasculares promueven el desarrollo de hipertrofia cardíaca (HC) patológica caracterizada por aumento del tamaño de los cardiomiocitos y de la fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y reprogramación de la expresión génica. La HC constituye un factor de riesgo independiente de morbimortalidad cardiovascular, a diferencia de la HC originada por el ejercicio físico intenso que es una respuesta adaptativa del miocardio. **Objetivo:** Analizar en ratas SHR el efecto del entrenamiento físico programado sobre la HC patológica. **Materiales y métodos:** Se utilizaron ratas SHR, asignadas al grupo control (C) o ejercicio (E, natación, 90min/día, 5 veces/sem, 60días). Se realizaron ecocardiogramas al inicio y fin del protocolo. Los animales se sacrificaron y se determinó: tamaño de miocitos, abundancia de colágeno intersticial, expresión miocárdica de calcineurinaAb, de SERCa2A y de genes marcadores de HC patológica. Resultados: El entrenamiento exacerbó la HC (masa del ventrículo izq: E:3,02±0,07; C:2,76±0,07mg/g; p<0,02) y mejoró la función cardíaca (acortamiento medio ventricular: C:32,12±1,01; E:36,03%±1,34; p<0,05). Además, disminuyó la fracción de colágeno intersticial (C:2,28±0,14; E:1,47±0,02%, p<0,05), la expresión de ANF (C:100±19; E:41±10%,p<0,05) y MLC-2 (C:100±8; E:61±9%; p<0,05), la actividad de calcineurina (C:143±14; E:107±9%, p<0,05);y aumentó la densidad capilar (C:573,2±42,37; E:770,3±34,79mm², p<0,05) y la expresión de SERCa2A (C:93±7; E:167±8%, p<0,05). **Conclusión:** Estos Resultados sugieren que el ejercicio físico es capaz de convertir la HC patológica hipertensiva en HC fisiológica pudiendo tener relevancia clínica en la prevención del desarrollo de insuficiencia cardíaca.

0027 (572) EXPRESIÓN DE CITOKINAS ASOCIADA AL REMODELADO VASCULAR EN UN MODELO DE SÍNDROME METABOLICO. N.Renna¹, M Vazquez¹, S Gonzalez¹, C Lama¹, R Miatello¹

¹Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular. IMBECU-CONICET. Departamento de Fisiología Patológica. FCM. UNCuyo <nicolasrenna@fcm.uncu.edu.ar>

El objetivo fue examinar la expresión de varias citokinas y de receptores de angiotensina (Ang II) en tejido vascular mesentérico en un modelo de síndrome metabólico (SM), caracterizado por remodelado arterial. Ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sus controles (WKY) se distribuyeron en 4 grupos (8 c/u): 1-WKY; 2-FFR: W+fructosa 10%p/v durante 12 sem; 3-SHR; 4-FFHR: ídem 2+3. La expresión de citokinas se evaluó mediante el sistema ChemiArray (rat antibody arrays) y los receptores de Ang II por inmunofluorescencia indirecta (microscopía láser confocal). Los datos (media±sem) se procesaron por ANOVA y post-test de Bonferroni. En comparación con sus controles, los animales FFHR desarrollaron SM y aumentaron sus niveles séricos de HS proteína C reactiva ($p < 0,001$). La expresión de proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), proteína inflamatoria de macrófagos-3 alfa (MIP-3 alfa), factor de crecimiento neuronal beta (beta-NGF), inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) fue positiva en el grupo FFHR. La expresión de receptores AT-1, AT-2 y de VCAM-1 en la pared de arterias mesentéricas fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en FFHR. Los datos contribuyen a sustentar la hipótesis que sugiere la participación de citokinas inflamatorias y el aumento de expresión de receptores de Ang II en el proceso de remodelado vascular asociado a este modelo experimental.

CARDIOVASCULAR O3

0028 (285) LA APOPTOSIS INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II INVOLUCRA MÚLTIPLES FACTORES RESPONSABLES DE DIFERENTES VÍAS INOTRÓPICAS. J O Velez Rueda¹, J Palomeu¹, L Sapia¹, C A Valverde¹, M A Salas¹, M G Vila-Petroff¹, A Mattiazzi¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas UNLP <jovr8234@yahoo.com.ar>

La Angiotensina II (AngII), produce apoptosis cuya causa ha sido relacionada por estudios independientes con distintas moléculas de señalización (Ca^{2+} , PKC, ROS, p38MAPK (p38), quinasa dependiente de Ca^{2+} -Calmodulina (CaMKII)). Por otro lado, la AngII tiene efecto inotrópico positivo (gato) o negativo (rata) a través del aumento de Ca^{2+} o de la activación de p38, respectivamente. Hipotetizamos que las cascadas iniciadas por la AngII que modulan diferencialmente el inotropismo convergen en una cascada apoptótica común. En miocitos cultivados (24h) de gato y rata se evaluó la vinculación de la CaMKII, los ROS y la p38 con la apoptosis producida por 1 μ M de AngII. La AngII produjo apoptosis en ~40% en ambas especies (TUNEL y disminución de Bax/Bcl2). La AngII aumentó la producción de ROS: 14.5±1.6% (epifluorescencia), la P-CaMKII: 29.2±4.2% y la P-Thr¹⁷ de fosfolamban (sustrato de la CaMKII): 56.8±25.3% (immunoblot). Los inhibidores de la NADPH oxidasa (DPI), de ROS (MPG), de CaMKII, (KN-93), y de la p38 (SB 203580) previnieron la muerte celular inducida por Ang II mientras que la sobreexpresión de la p38 (transferencia génica adenoviral) la exacerbó significativamente. Por otro lado, la inhibición de la CaMKII no previno el incremento en la producción de ROS y sí la activación de p38, indicando que la CaMKII estaría por debajo de la producción de ROS y por encima de la activación de p38. Los Resultados indican que el aumento de ROS, la activación de CaMKII y de la p38 serían los eventos que concatenados conducen a la apoptosis inducida por AngII y que esta cascada de señalización sería la misma en especies que responden opuestamente al estímulo

contráctil del péptido. Estos Resultados indican que las diferencias interespecies observadas en los efectos agudos de la AngII se anularían para los efectos de la AngII sobre la viabilidad celular sugiriendo la posibilidad de extrapolar las conclusiones al ser humano.

0029 (411) METABOLISMO MITOCONDRIAL DEL NO EN CO-RAZÓN DE RATA DURANTE LA ADAPTACIÓN A LA ALTURA: EFECTO DEL SILDENAFIL, L-NAME Y L-ARGININA. T Zaobornyj¹, L B Valdez¹, D E Iglesias¹, M Gasco², G F Gonzáles², A Boveris¹

¹Cátedra de Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Instituto de Investigaciones de la Altura, Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú <tamaraz@ffyb.uba.ar>

Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que durante la adaptación a la altura (Cerro de Pasco, Perú, 4340 m, $PO_2=12.2$ kPa, $P_{a_{O_2}}=58.2$ kPa, 21 días) existe un aumento de hasta el 60% en la actividad de la NOS mitocondrial (mtNOS) de corazón de rata. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta adaptativa extendiendo dicha exposición a 84 días y analizar el efecto de tres tratamientos farmacológicos capaces de modificar el metabolismo del NO: sildenafil (50 mg/kg.día, v.o.), L-NAME (8.3 mg/kg.día, v.o.) y L-arginina (106 mg/kg.día, v.o.). Los animales expuestos a la altura exhibieron una respuesta fisiológica evidenciada por el aumento en la ganancia de masa corporal (15 %), en la masa del ventrículo derecho (100%) y en el hematocrito (40%). Dichos parámetros, considerados marcadores clásicos de la adaptación a la altura, fueron acompañados por un aumento de la actividad de los complejos mitocondriales I-III (34%); y un incremento de la actividad (70%) y expresión (60%) de la mtNOS de corazón. La respuesta de la actividad de mtNOS exhibió un perfil hiperbólico, similar al incremento en los valores de hematocrito. Por otro lado, el tratamiento crónico con sildenafil produjo una disminución del 30% en la respuesta de la mtNOS a la altura. Contrariamente, el tratamiento con L-NAME produjo un incremento de dicha respuesta (40%), mientras que la L-arginina no ejerció efectos sobre la actividad de mtNOS. Los valores medios de hematocrito y actividad de mtNOS mostraron una correlación lineal positiva ($R^2=0.75$, $P=0.05$). La producción de NO catalizada por la mtNOS fue responsable del 49% de la producción celular de NO en ratas no expuestas, y del 54% en ratas expuestas a la altura. La mtNOS constituye una fuente sustancial de NO en el corazón y parece cumplir un papel central en la respuesta adaptativa a la hipoxia crónica. Asimismo, dicha enzima puede ser regulada mediante tratamientos farmacológicos involucrados en el metabolismo del NO.

0030 (568) EL EFECTO HIPERTROFIANTE DE ANGIOTENSINA II ES DEBIDO A ENDOTELINA 1 ENDÓGENA. M V Correa¹, M B Nolly¹, G E Chiappe de Cingolani¹, H E Cingolani¹, I L Ennis¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares <mavecorrea@hotmail.com>

Muchos de los efectos de la Angiotensina II (Ang II) son debidos a la liberación de Endotelina 1 (ET-1) endógena secretada de manera autocrina. Esto fue demostrado en miocitos neonatales pero no lo ha sido en miocitos adultos que poseen diferente acoplamiento exito-contráctil. Trabajos recientes sugieren que las Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) participarían en la señalización intracelular evocada por agonistas de receptores acoplados a proteína G, como la Ang II y la ET-1. Por otro lado en los últimos años se ha hecho evidente el efecto antihipertrófico de los inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ (NHE-1). Evaluamos en miocitos aislados de corazones de gato adulto la participación, por mecanismos aún no claros, de la ET-1, las ROS y el NHE-1 en la respuesta hipertrófica a la Ang II. Los cardiomiocitos fueron

cultivados con estimulación eléctrica para no eliminar la participación del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en las vías de señalización prohipertrofica, en presencia y ausencia de Ang II (1nM) con y sin el bloqueante de receptores AT_1 Losartán (1mmol/L) o el bloqueante de receptores ET_A BQ123 (10m mol/L). También se cultivaron en presencia de ET-1 (5nmol/L), con y sin el inhibidor específico del NHE-1 cariporide (HOE642 10mmol/L) y el secuestrador de ROS MPG (2 mmol/L). La hipertrofia cardíaca fue evaluada por: 1) Incorporación de ^3H -fenilalanina normalizada por el contenido de DNA; 2) Tamaño celular (área); 3) Expresión de genes fetales (ANP) por PCR en tiempo real. La producción de ROS se evaluó por epifluorescencia en los miocitos aislados y por quimioluminiscencia en fragmentos de miocardio ventricular, las determinaciones se hicieron en presencia y ausencia del bloqueante no específico de los receptores de ET-1, TAK044 (1m mol/L). Los Resultados evidencian que el efecto hipertrofiante de Ang II es dependiente de la activación de los receptores ET_A de la ET-1, también depende de la activación del NHE-1 por el aumento en la producción de ROS.

0031 (586) LA REGRESIÓN DE LA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUCIDA POR INHIBICIÓN DEL NHE-1 SE ACOMPAÑA DE UN EFECTO MITOCONDRIAL ANTI-APOPTÓTICO. C Garcíarena ¹, E Portiansky ¹, C Caldiz ¹, G Chiappe de Cingolani ¹, H Cingolani ¹, I Ennis ¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, UNLP <cgarcíarena@atlas.med.unlp.edu.ar>

Ha sido demostrado que la inhibición farmacológica de la isoforma cardíaca del intercambiador Na^+/H^+ (NHE-1) induce regresión de la hipertrofia cardíaca (HC) en varios modelos experimentales y que "in-vitro" inhibe la vía mitocondrial de muerte celular inducida por estrés oxidativo. **Objetivo:** explorar el efecto del tratamiento crónico con cariporide (Car, inhibidor específico del NHE-1) sobre la HC e incidencia de apoptosis en la cardiopatía hipertrofica hipertensiva de ratas SHR. **Material y métodos:** SHR macho de 4 meses de edad asignadas a un grupo control (SHR-C) y un grupo tratamiento (SHR-T, Car 3mg/kg/día). Se registró la presión arterial semanalmente. Luego de 30 días de tratamiento se sacrificaron los animales, se extrajeron sus corazones y se determinó el cociente entre el peso del ventrículo izquierdo y el peso corporal (PVI/PC), el tamaño de los cardiomiocitos (superficie de sección transversal, SST), la abundancia de colágeno intersticial (CI), la expresión de las proteínas vinculadas con apoptosis Bcl-2, Bax, caspase-3 activada y PARP-1. También se evaluó el efecto del Car sobre la producción mitocondrial de ROS inducida por angiotensina II. Resultados: el tratamiento con cariporide indujo regresión de la HC sin modificar la presión arterial, provocó un aumento del índice Bcl-2/Bax con disminución de la activación de caspasa-3 y del clivaje de PARP-1 (Tabla). Por otro lado el cariporide canceló el aumento de la producción mitocondrial de ROS inducido por angiotensina II. **Conclusión:** el tratamiento crónico con el inhibidor del NHE-1 Car es eficaz para reducir la HC y e inhibir la vía mitocondrial de muerte celular programada en SHR.

	PVI/PC (mg/g)	SST (mm ²)	CI (%)
SHR-C	3.0±0.06	468±20	10.07±2.4
SHR-T	2.44±0.07	285±9	8.9±1.3

* = p<0.05, t-test.

0032 (640) REDUCCIÓN SOSTENIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL CON ROSUVASTATINA EN HIPERTENSIÓN ARTERIAL CRÓNICA. G A Giunta ¹, E Guevara ², L Marziali ¹, L Gómez Rosso ³, T Meroño ³, G Yannarelli ¹, R Toriano ³, R Favalaro ², F Brites ³, L Cuniberti ¹

¹Laboratorio de Lípidos y Aterosclerosis. Departamento de Patología. Hospital Universitario Fundación Favaloro.; ²Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Hospital

Universitario Fundación Favaloro.; ³Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. CONICET. Universidad de Buenos Aires. <ggiunta@ffavaloro.org>

Aislados estudios clínicos y experimentales mostraron reducciones discretas e inconsistentes en los niveles de presión arterial con la administración de estatinas. Prácticamente no existe información disponible sobre el uso de rosuvastatina en hipertensión arterial. El objetivo del estudio fue evaluar el beneficio de la rosuvastatina en un seguimiento a largo plazo empleando un modelo crónico de hipertensión arterial. Se instrumentaron 27 conejos New Zealand (3 Kg), con el modelo 1-riñón 1-clip de Goldblatt. Una vez desarrollada hipertensión arterial, 13 animales recibieron rosuvastatina en agua de bebida (dosis 2,5mg/Kg/d) (ROSU) y 12 no fueron tratados (HTA). Se midió presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) por método directo en la arteria central de la oreja. A los 3, 6 y 9 meses, se evaluó la repercusión cardíaca de la hipertensión arterial en parámetros anatómicos y funcionales del VI por ecocardiografía convencional y Doppler tisular (Sonos 5500 S12 MHz). Luego de la instrumentación, 25 animales desarrollaron hipertensión arterial. No hubo diferencias basales entre HTA y ROSU en PAS y PAD (126,9 ± 12 vs. 129,1 ± 10 mmHg, p=ns; 97,4 ± 12 vs. 93,2 ± 10 mmHg, p=ns). ROSU disminuyó un 25% los niveles de colesterol con respecto al basal (44,1 ± 7 vs. 33,1 ± 11 mg/dL; p=0,01); HTA, sin cambio. Sólo HTA mostró un incremento significativo de PAS y PAD a los 9 meses de seguimiento (149,8 ± 17, p=0,007; 113,9 ± 15 mmHg, p=0,01), que se acompañó por un aumento de la masa del VI (4,1 ± 1,1 vs. 7 ± 3g, p=0,02), no observado en ROSU (4,8 ± 1,2 vs. 5,4 ± 0,8g, p=ns). Sorprendentemente, hubo más muertes, en el grupo HTA (5 vs. 1; logrank test p= 0,05). La rosuvastatina redujo el incremento de PA en forma sostenida durante los 9 meses de seguimiento. Consecuentemente, promovió protección cardíaca por reducir el remodelamiento del VI. Estos Resultados, en su conjunto sugerirían un beneficio potencial de utilizar rosuvastatina en pacientes con hipertensión arterial.

0033 (656) EXPRESIÓN DE P-GP EN CARDIOMIOCITOS EN RATAS CON CRISIS CONVULSIVAS REITERADAS (CCR) O ESTATUS EPILÉPTICO FATAL (EE-F). ¿ALGUNA RELACIÓN CON SUDEP?. J A Auzmendi ¹, M Pichel ², E Girardi ², A Lazarowski ³

¹IBCyN; ²IBCyN-FMED-UBA.; ³IBCyN-FMED-UBA, INFIBIOC-FFyB-UBA-Bs. A.s. - Argentina. <jeronimo.auzmendi@gmail.com>

Introducción: El más elevado riesgo de sufrir de muerte súbita e inexplicable en epilepsia (SUDEP) se encuentra entre pacientes con CCR, Epilepsia Refractarias (ER), interrupción abrupta de medicación o post-EE. Las CCR o EE, pueden producir taquicardias/bradicardias malignas, fallos cardíacos, o apneas/hipoxia que podrían afectar la función cardíaca sin alteraciones anatomopatológicas. Previamente hemos demostrado que tanto la hipoxia crónica (J Histochem. Cytochem 2005;53:845-50) como aguda (J Histochem. Cytochem 2007;55:191-7) pueden inducir la expresión de P-gp en cardiomiocitos asociada a "stunning" (atontamiento) cardíaco. Las CCR y/o el estatus epiléptico (EE) inducen expresión cerebral de P-gp relacionada con epilepsia refractaria (ER), sin embargo la expresión de P-gp cardíaca en CCR o EE no se ha investigado. **Objetivos:** Investigar la expresión de P-gp en cardiomiocitos de ratas sometidas a CCR o EE-fatal. **Metodología:** Doce ratas Wistar (180-230g) fueron tratadas con pentilinetetrazol (PTZ) 45mg/kg/día i.p. para inducir CCR durante 4 y 7 días (PTZ-4;n=3-PTZ-7;n=3); y con PTZ (n=3) o con ac.3-mercaptopropiónico (n=3) hasta producir EE-fatal. Ratitas controladas no convulsivas fueron tratadas con filológica (n=3). Se realizó inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal anti-P-gp, en cortes de corazón y cerebrales (neocortex). Adicionalmente se estudió la expresión de P-gp cerebral (neocortex) en todos los grupos. **Resultados:** Hubo marcada expresión de P-gp en cardiomiocitos y neocortex de ratas CCR y EE-f comparada con controles. **Conclusión:** Esta primera evidencia de inducción simul-

tánea de P-gp en cardiomiocitos/neocortex por CCR y/o EE, sugieren que P-gp sería un factor que relaciona ER con SUDEP.

0034 (216) ESTUDIO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES (SOD Y GPX) Y DE LA VARIANTE GLU²⁹⁸ASP DE eNOS EN PACIENTES CHAGÁSICOS. S A Lioi¹, C Zumoffen¹, G Gerrard¹, M Corbera¹, M Turco¹, H Bottai², J Beloscar³, M D'Arrigo¹

¹Area Química Analítica Clínica Departamento Bioquímica Clínica FBIQyF UNR; ²Departamento Estadística; ³Carrera de Cardiología. Facultad de Ciencias Médicas. <salioi@yahoo.com.ar>

La capacidad de contrarrestar el estrés oxidativo y mantener la integridad de la función endotelial podría depender del polimorfismo G⁸⁹⁴T de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS); la presencia del alelo T da lugar a una reducción en la actividad de la misma respecto al genotipo nativo GG. Las enzimas como superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX) controlarían el balance en la producción de especies reactivas del oxígeno. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio descriptivo de las actividades enzimáticas de SOD y GPX y de las frecuencias alélicas (FA) de la variante Glu²⁹⁸Asp de eNOS, en pacientes chagásicos con (CC n:9) y sin cardiopatía (CsinC n:8) comparados con controles sanos (CN n:93). La genotipificación del polimorfismo G⁸⁹⁴T fue realizada mediante la técnica de PCR-RFLP, previa extracción del ADN de leucocitos sanguíneos. La actividad enzimática fue determinada por Metodologías espectrofotométricas (Kits Ransel Labs). El análisis de la distribución de genotipos para el polimorfismo G⁸⁹⁴T en la población estudiada (IC 95%) fue en CC (G 0.388, T 0.611); CsinC (G 0.312, T 0.687) y CN (G 0.742, T 0.261). Para el estudio estadístico se realizó análisis de variancia a un criterio de clasificación, para cada enzima, se aplicó Kruskal Wallis encontrándose diferencias significativas entre los grupos estudiados ($p < 0.0001$). Para comparar las FA se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal, del cual se evidencia que existen diferencias significativas entre CC, CsinC y los CN. La infección por Tripanosoma cruzi podría alterar el stress oxidativo contribuyendo a la disfunción miocárdica.

CARDIOVASCULAR 04

0035 (103) EFECTO DE LA TRANSFECCIÓN CON EL GEN DE VEGF165 ASOCIADA A ERITROPOYETINA RECOMBIANTE HUMANA SOBRE EL TAMAÑO DEL ÁREA NECRÓTICA Y LA FUNCIÓN VENTRICULAR EN OVEJAS CON INFARTO DE MIOCARDIO REPERFUNDIDO. F D Olea¹, L Cuniberti¹, A De Lorenzi¹, C Cortés², O Cendoya², G Vera Janavel¹, P Cabeza Meckert^{2,3}, A Bercovich⁴, M Criscuolo⁴, R Laguens^{1,2}, A Crottogini¹

¹Universidad Favaloro; ²Fundación Favaloro; ³CIC. Pcia. Bs. As.; ⁴Bio Sidus <dolea@favaloro.edu.ar>

El tamaño del infarto de miocardio (IAM) influye sobre la magnitud del remodelamiento ventricular que lleva a la insuficiencia cardíaca. Hemos demostrado que la transfección con un plásmido con el gen de VEGF₁₆₅ (pVEGF) reduce el tamaño del IAM en ovejas. La eritropoyetina (EPO) en altas dosis, por su acción antiapoptótica, debería reducirlo aún más, en especial el IAM reperfundido, donde la incidencia de apoptosis es alta. En este trabajo evaluamos si la combinación pVEGF-EPO reduce el tamaño (% de fibrosis) de IAM reperfundido, mejora la función ventricular (engrosamiento parietal sistólico -EPS%- y fracción de acortamiento -FA%- por eco) y la perfusión (monto isquémico por cámara gamma) más que pVEGF o EPO individualmente. Ovejas con 90 minutos de oclusión coronaria se dividieron en 4 grupos (n=8 c/u): G1: doble placebo; G2: pVEGF-placebo; G3:

pVEGF-EPO; G4: EPO-placebo. El pVEGF (3,8 mg) se inyectó intramiocárdicamente en 10 alícuotas iguales y la EPO (1000 U/kg) se infundió i.v., ambos durante la reperfusión. A los 15 días el tamaño de IAM fue menor en los 3 grupos tratados (G2: 16±5% (SD); G3: 7±1%; G4: 12±4%) que en el placebo (G1: 25±7%, $p < 0,05$ ANOVA-Bonferroni). Además, G3 mostró el IAM más pequeño ($p < 0,05$ vs. G2 y $p = 0,06$ vs. G4). Función ventricular: a los 3 días del IAM el EPS% y la FA% fueron mayores en los 2 grupos con EPO ($p < 0,01$), ya que el pVEGF aún no se había expresado, pero a los 14 días el grupo pVEGF también mostró EPS% y FA% mayores que el placebo ($p < 0,005$). El monto isquémico empeoró en el grupo placebo (22±7 segmentos isquémicos a los 14 días vs. 19±7 a los 3 días, $p < 0,03$) pero no en los otros grupos. Conclusión: los tres tratamientos reducen el tamaño de IAM reperfundido, pero el tratamiento mixto tiende a reducirlo más y mejora la función ventricular en forma precoz y tardía, a diferencia de pVEGF o EPO separadamente. Esta asociación deberá estudiarse a tiempos más prolongados antes de evaluar su utilidad en ensayos clínicos.

0036 (437) EFECTO DE LA TRH SOBRE CULTIVOS DE FIBROBLASTOS CARDIACOS DE RATA: ACCIÓN PROFIBRÓTICA Y APOPTÓTICA. M L Schuman¹, V Copa¹, M S Landa¹, A Alvarez¹, S Finkielman¹, C J Pirola¹, S I Garcia¹

¹CARDIOLOGIA MOLECULAR, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MEDICAS A. LANARI, IDIM-CONICET <schuman@ciudad.com.ar>

Demostamos que en FC de ratas Wistar macho neonatas, agentes hipertróficos (fenilefrina (Phe) e IP3) aumentan la expresión de TRH y ANP y la estimulación con TRH aumenta la expresión de BMHC y ANP. Decidimos analizar la participación de la TRH en fenómenos involucrados en la patología cardíaca como la fibrosis y apoptosis. Evaluamos la expresión del gen de colágeno III y la relación de los genes proapoptótico/antiapoptótico (Bax/Bcl2) por RT-PCR en tiempo real. Encontramos que la estimulación de cultivos de FC con TRH aumentó en forma dosis dependiente la expresión de colágeno III (24h, Cont: 0,075 +/- 0,017 vs 1iM:0,125+/-0,017, 10iM:0,160+/-0,017) alcanzando plateau a las 48hs (n=4, $p < 0,02$) sugiriendo su acción profibrótica. Además, provocó un aumento de Bax/bcl2 (48h, Cont: 100% vs 1iM:140%; 10iM:142%) que permaneció hasta las 72hs (n= 6; $p < 0,04$) indicando un aumento de la actividad apoptótica de estas células. Mas aún, la estimulación con un agente cardiotoxico proapoptótico (Doxorrubicina 100iM) aumento la expresión de TRH en un 80% vs control (n=3, $p < 0,02$). La AII, promotor de ambos procesos (1-10iM), no provocó diferencias en la expresión de TRH descartando su participación en esta vía. Datos preliminares muestran un comportamiento diferencial en los FC de hembras dado que existe un aumento en el gen de TRH comparadas con machos en condición basal y no observamos efecto al estimularlas con Phe o IP3 a las 48hs a diferencia de los FC de machos en los que aumenta su expresión. Por el contrario, la AII (1iM) que no produjo cambios en los FC de machos, disminuyó la expresión del gen de TRH a casi un 70% del control (n=6; $p < 0,04$) y no produjo cambios en colágeno III aunque sí se observó un aumento de Bax/Bcl2. Demostramos por primera vez la participación de la TRH en los procesos fibróticos y/o apoptóticos de los fibroblastos cardíacos de rata Wistar macho. Los Resultados plantean la necesidad de continuar los estudios diferenciando FC entre machos y hembras.

0037 (125) PRODUCCIÓN VASCULAR DE PROSTANOIDES EN DISTINTOS PERÍODOS DE SOBRECARGA DE FRUCTOSA EN LA RATA. A M Puyó¹, M Zabalza¹, M A Mayer¹, A Carranza¹, I R Faya¹, H A Peredo¹

¹Cátedras de Anatomía Humana (Macro y Microscópica) y Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires y CONICET. <anapuyo@gmail.com>

La sobrecarga oral de fructosa (F) provoca en la rata hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina y aumento de la presión arterial (PA), cuadro similar al síndrome metabólico. Previamente hallamos modificaciones en la producción de prostanoideos (PR) en la aorta (A) y el lecho mesentérico (LM) en este modelo. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del tratamiento con F, durante distintos períodos, sobre la producción de PR vasculares, parámetros metabólicos y PA. Se utilizaron 8 grupos de ratas Sprague-Dawley, controles (C4, C9, C15 y C22: dieta normal) y con sobrecarga de F (F4, F9, F15 y F 22: F al 10% P/V para beber) durante 4, 9, 15 y 22 semanas. La PA sistólica se midió por método indirecto. Los animales fueron sacrificados después de los distintos períodos de tratamiento y los LM y A se incubaron 60 min a 37°C en Krebs. Los PR liberados se midieron por HPLC. Se registraron cambios en prostaglandinas (PG) E₂ y 6-ceto F₂α, metabolito de prostaciclina (PGI₂). En A, F disminuyó PGI₂ (ng/mg tejido) a las 9 (F9: 65±9 vs. C9: 165±15, p<0.001), a las 15 (F15: 76±11 vs. C15: 178±21, p<0.01) y a las 22 semanas (F22: 74±12 vs. C22: 192±20, p<0.001). En LM, F disminuyó PGI₂ a las 9 (F9: 60±8 vs. C9: 99±5, p<0.05) y aumentó a las 22 semanas (F22: 208±31 vs C22: 96±12, p<0.001). El tratamiento disminuyó PGE₂ en los 4 períodos (F4: 30±5 vs C4: 93±18, p<0.001; F9: 32±4 vs. C9: 93±6, p<0.001; F15: 27±8 vs. C15: 70±8, p<0.01; F22: 25±5 vs. C22: 87±13, p<0.001). En resumen, la F reduce la producción vascular de PR vasodilatadores, y al no modificar los vasoconstrictores, desplaza el equilibrio hacia compuestos deletéreos. El incremento en PGI₂ a las 22 semanas se atribuiría a un mecanismo de compensación de la disminución de PGE₂ y otros vasodilatadores como el óxido nítrico, reportados en este modelo. Como conclusión, la F tiene consecuencias negativas para el estado metabólico y hemodinámico del animal, que ya se manifiestan a las 4 semanas de tratamiento.

0038 (232) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LOS EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL PEPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS. C C Caniffi^{1,2}, F Visintini Jaime^{1,2}, R Elesgaray^{1,2}, D Rodríguez Ierace^{1,2}, C Arranz^{1,2}, M dI Á Costa^{1,2}

¹Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²IQUIMEFA - CONICET <rosanae@ffyba.uba.ar>

En estudios previos mostramos que la activación del sistema del NO está involucrada en el efecto hipotensor del péptido natriurético tipo C (CNP) en ratas normotensas. **Objetivo:** Investigar el efecto de la infusión aguda de CNP sobre el sistema del NO cardiovascular en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Se utilizaron SHR y sus controles normotensos Wistar Kyoto (WKY) separados en dos grupos: Grupo I: Infusión salina (60 min, 0.05 ml/min); Grupo II: bolus CNP (10 mg/kg) + infusión CNP (60 min, 1 mg/kg.min). Se registró la presión arterial media (PAM) y se recolectó orina para evaluar la excreción de nitritos y nitros (NOx; nmol/min.100g) por método de Griess. Se extrajeron arteria aorta (AA) y ventrículo izquierdo (VI) para determinar la actividad NADPH-diaforasa y la actividad NOS (pmol L-[U14C]-citrulina/g tejido.min) con L-[U14C]-arginina como sustrato. Resultados: El CNP indujo un aumento en la excreción de NOx (WKY: 0.9±0.01 vs 1.5 ±0.12*; SHR: 1.4±0.5 vs 1.9 ±0.3*; *p<0.01) y una disminución de PAM (D: WKY= -7±3 vs SHR= -15±7 mmHg, ns). El CNP aumentó la actividad de la NOS cardíaca y vascular en ambos grupos, pero la respuesta al péptido fue menor en los animales hipertensos (AA: Delta: WKY= 112.9 vs SHR= 80.7; VI: Delta: WKY= 100 vs SHR= 85.4)

Actividad NADPH-d	ENDOTELIO	MUSC LISO	VENTRICULO
WKY SF	0,168 ± 0,004	0,215 ± 0,002	0,167 ± 0,001
WKY CNP	0,181 ± 0,006 *	0,229 ± 0,003 *	0,182 ± 0,002 *
SHR SF	0,198 ± 0,007 *	0,249 ± 0,005 *	0,183 ± 0,006 *
SHR CNP	0,208 ± 0,005 #	0,262 ± 0,003 #	0,196 ± 0,002 #

* p<0,01 vs WKY con SF; # p<0,01 vs SHR con SF **Conclusión:** La elevada excreción de NOx sugiere que el CNP induce un aumento en producción sistémica de NO. El aumento del NO sería, al menos en parte, responsable de los efectos del CNP en corazón y vasos sanguíneos. La respuesta al CNP en los animales hipertensos estaría alterada. Dicha alteración podría ser la responsable del desarrollo y/o mantenimiento del estado hipertensivo en este modelo animal

0039 (255) FOSFORILACIÓN CAMKII-DEPENDIENTE DEL CANAL LIBERADOR DE CA²⁺ (RYR2) DEL RETÍCULO SARCOPLASMÁTICO (RS) DURANTE EL ATONTAMIENTO Y EL PRECONDICIONAMIENTO EN EL MIOCARDIO DE RATA. R V Becerra¹, M Said¹, C Mundiña-Weilenmann¹, A Mattiazzi¹, L Vittone¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP <rogreta@hotmail.com>

La sobrecarga de Ca²⁺ es una de las principales causas de disfunción contráctil reversible o atontamiento (AT) en la injuria por isquemia/reperfusión (I/R) en el miocardio. En el AT la función del RS está deprimida y se asocia a una mayor pérdida de Ca²⁺ por RyR2. Uno o varios episodios I/R breves previos a la I/R prolongada (precondicionamiento, PC) disminuyen la pérdida de Ca²⁺ del RS y mejoran la contractilidad en el AT. Sin embargo no se conocen los mecanismos que regulan la actividad del RyR2 en AT y PC. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron un aumento de la actividad de CaMKII en la reperfusión. Esto nos llevó a hipotetizar que la fosforilación CaMKII-dependiente de RyR2 (residuo Ser2815) podría asociarse a los cambios de actividad del RyR2 en I/R. Corazones de rata aislados se sometieron a I/R de 20/30min (AT) con o sin previo (PC) 5/10min o sin I/R (Control, C). La fosforilación de RyR2 se midió con anticuerpos contra el sitio fosforilado CaMKII-dependiente (PS2815-RyR2). La actividad de RyR2 se determinó en vesículas aisladas de RS por unión de ³Hry a concentraciones similares al calcio diastólico y sistólico (pCa 7 y 5). Resultados: P-Ser2815 aumentó de 97.3 ± 2.7%(C) a 394.1 ± 57.0% (R 1min en AT). Esta fosforilación disminuyó hacia valores controles en corazones con PC. Un patrón similar se detectó en la actividad de RyR2: la unión de ³Hry (pg³Hry/mg prot RS) fue 0,177 ± 0,009 (C), 0,383 ± 0,061 (AT) y 0,192 ± 0,004 (PC) a pCa5. Resultados similares se detectaron a pCa7. **Conclusión:** los Resultados sugieren que P-Ser2815 participa del control de la actividad de RyR2 en AT y PC y que esta fosforilación facilitaría la salida de Ca²⁺ desde el RS.

0040 (523) CA/CALMODULINA QUINASA (CAMKII): UNA NUEVA SEÑAL INVOLUCRADA EN LA MUERTE DEL MIOCARDIO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN. M A Salas¹, C A Valverde¹, M Said¹, E L Portiansky², A Mattiazzi¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP; ²Cátedra de Patología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP <salasmarga@gmail.com>

Durante la reperfusión coronaria (R) que sigue a la isquemia (I/R) ocurre el mayor daño miocárdico. Conocer el mecanismo que lo produce es fundamental para reducir la muerte celular por necrosis y/o apoptosis. Previamente demostramos el rol deletéreo de la CaMKII en la I/R. Nuestro objetivo es ahora determinar la cascada de señales involucradas en este efecto. Corazones perfundidos (Langendorff) de ratas, ratones transgénicos (TG) con inhibición de CaMKII a nivel del retículo sarcoplasmático (RS) y controles (WT) fueron sometidos a un protocolo de I/R (45/120min). En ratas, la I/R se realizó, en presencia o no de los siguientes inhibidores: rutenium red (uniporter mitocondrial, UM), ciclosporina A (poro mitocondrial, PM), taspigarguina (Ca ATP-asa del RS, SERCA), dantrolene (canal de rianodina, RyR2) y KN-93 (CaMKII). Se midió: tamaño de infarto (TTC), liberación de LDH, grado de apoptosis (TUNEL, caspasa-3 activada, relación bax/bcl2) y fosforilación del residuo Thr¹⁷ de fosfolamban (PThr-PLN) sustrato específico de CaMKII. PThr-PLN aumentó a 52.2 ± 8.0

en la R vs 11.5 ± 3.0 % (preisq), confirmando la activación de CaMKII en la R. KN-93 redujo el tamaño de infarto (59 ± 7.4 vs 33 ± 4.7 %), los niveles de LDH (863 ± 135 vs 296 ± 87 U/L), el número de núcleos apoptóticos (3.3 ± 0.6 vs 1.3 ± 0.4 %), la relación bax/bcl2 y la actividad de caspasa-3. Los ratones TG disminuyeron el tamaño de infarto y la LDH vs los WT. La inhibición de SERCA, RyR2, UM y apertura del PM, disminuyeron significativamente el tamaño de infarto y la apoptosis (TUNEL). En todos los casos $p < 0.05$. Los Resultados en animales TG y la disminución de la relación bax/bcl2 en presencia de KN-93, indican que la CaMKII forma parte de una cascada que involucra al RS y las mitocondrias en la muerte celular por I/R. Se sugiere que CaMKII, a través de la fosforilación de proteínas del RS (RyR2), induciría la pérdida de Ca del mismo, con sobrecarga de Ca mitocondrial y muerte por necrosis y apoptosis.

0041 (610) CROSS TALK ENTRE RECEPTORES ALFA1 Y AT1 EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLÉMICOS. S Jerez^{1,2}, L Sierra^{1,2}, F Scacchi^{1,2}, M Peral de Bruno^{1,2}.

¹Fac. Ciencias Naturales y Fac. Medicina; ²Depto Bioingeniería (INSIBIO-CONICET-UNT) <sjerez@herrera.unt.edu.ar>

Previamente demostramos una desensibilización heteróloga (cross talk) dependiente de endotelio entre receptores alfa1 y AT1 en aorta de conejo. **Objetivo:** analizar dicho fenómeno en condiciones de disfunción endotelial generada por hipercolesterolemia. **Metodologías:** conejos se alimentaron 6-7 semanas con una dieta rica en colesterol al 1% (DH) o con una dieta control (DC). Se midió presión arterial media (PAM), CT, LDL, HDL y TG. En aorta torácica se midió reactividad y potenciales de membrana en reposo (Pm). Para evaluar la influencia del estímulo de: A) los receptores alfa 1 sobre la respuesta a Ang II: se realizó una CDRA a NA control y en presencia de losartan 10-7 M, se lavó el tejido y se efectuó una CDRA a Ang II en iguales condiciones. B) los receptores AT1 sobre la respuesta a NA: se realizó una CDRA a Ang II control y en presencia de prazosin 10-6 M, se lavó el tejido y se efectuó una CDRA a NA. Se realizaron mediciones de Pm antes y después de estimular con Ang II o NA y después de 20 min de lavados. Resultados: La PAM fue similar en conejos con DC y DH. Los valores de CT y LDL fueron mayores en conejos con DH. En arterias de conejos con DH: 1) La reactividad a Ang II fue mayor pero la respuesta a NA fue similar. 2) Ang II sensibilizó la respuesta a NA. El losartan no modificó la sensibilidad a la NA pero bloqueó el efecto de la Ang II. 3) Un estímulo previo con NA desensibilizó la respuesta a la Ang II. El prazosin no modificó la sensibilidad a Ang II pero incrementó la desensibilización inducida por NA. 4) Ang II dejó la membrana despolarizada y NA la dejó hiperpolarizada después del lavado. Conclusiones: la persistencia de desensibilización heteróloga a Ang II en la hipercolesterolemia sería un mecanismo compensador del aumento de reactividad. Sin embargo Ang II sensibiliza la respuesta a NA. Este cross talk contribuiría a sostener la PAM normal a pesar de la disfunción endotelial. El mecanismo de este fenómeno involucraría modificaciones del Pm.

0042 (646) HIPERTENSIÓN, ALTA INGESTA DE SAL Y ESTRÉS OXIDATIVO: EFECTO DE LOSARTAN VERSUS ATENOLOL E Cavanagh¹, M Ferder¹, I Stella¹, L Ferder², F Inserra¹.

¹Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Fac. Medicina, UBA; ²Physiology and Pharmacology Department, Ponce School of Medicine, Ponce, Puerto Rico <elenacavanagh@yahoo.com.ar>

La hipertensión y las dietas ricas en sodio estimulan la producción de oxidantes, lo que contribuye al daño de órganos blanco. La inhibición del sistema renina-angiotensina, reduce la presión arterial, e inhibe la formación de oxidantes derivados de la unión de la angiotensina-II a su receptor AT1. Se investigó la capacidad de un bloqueador AT1 (losartan) para proteger el corazón y cerebro del

daño oxidativo provocado por los efectos combinados de la hipertensión y alta ingesta de sal. Ratas SHR (n=10/grupo) recibieron (durante 5 meses) agua de beber pura (grupo SH), o con 1,5% NaCl (SH+S), o 1,5% NaCl y 30mg losartan/kg/día (SH+S+L), o 50mg atenolol/kg/día (SH+S+A). Diez ratas WKY (W) fueron controles. PAS: W=119±3¹, SH=180±4, SH+S=210±5², SH+S+L=141±3³, SH+S+A=140±4³ mmHg (¹p<0,05 vs SH, SH+S, SH+S+L, SH+S+A; ²p<0,05 vs SH, SH+S+L, SH+S+A; ³p<0,05 vs SH). **Inmunomarcaciones en Corazón:** W=44±91, SH=60±122, SH+S=150±263, SH+S+L=76±15, SH+S+A=91±17 μm² Colágeno III (¹p<0,05 vs SH+S, SH+S+A; ²p<0,05 vs SH+S; ³p<0,05 vs SH+S+L) y W=2,0±0,61, SH=28,3±6,5, SH+S=32,0±4,82, SH+S+L=11,8±2,9, SH+S+A=16,6±4 [μm²×10⁻³] NTir (marcador de oxidación a proteínas) (¹p<0,05 vs SH, SH+S, SH+S+A; ²p<0,05 vs. SH+S+L). **Inmunomarcaciones en Cerebro:** a) RECA-1 (marcador endotelial): W=2,93±0,92, SH=1,96±0,30, SH+S=1,69±0,34, SH+S+L=2,42±0,50, SH+S+A=2,15±0,47 % (¹p<0,05 vs SH, SH+S); b) MCP-1 (marcador de inflamación): W=2,24±1,61, SH=6,43±1,75; SH+S=10,1±3,3, SH+S+L=6,42±1,9, SH+S+A=7,56±2,44 [μm²×10⁻³] (¹p<0,05 vs SH, SH+S, SH+S+A), y c) NTir: W=361±104¹, SH=474±84, SH+S=596±66², SH+S+L=359±78, SH+S+A=516±134 μm², (¹p<0,05 vs SH+S, ²p<0,05 vs SH+S+L). Las defensas antioxidantes mostraron un patrón complejo de cambios. En corazón NTir correlacionó con Colágeno III (r=0,475, p=0,0025). En este modelo experimental de hipertensión con alto consumo de sal, losartan pero no atenolol, protege al miocardio y al cerebro del daño oxidativo asociado al deterioro estructural.

CARDIOVASCULAR P1

0043 (191) EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO ATENUA LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y REDUCE EL TAMAÑO DE INFARTO EN EL CORAZÓN AISLADO DE CONEJO. B Buchholz¹, V Miksztoiwicz², V D'Annunzio¹, A Quiroga¹, C Lorenzo Carrión¹, G Berg², M Donato¹, R J Gelpi¹

¹Instituto de Fisiopatología Cardiovascular Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires; ²Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires <vdannunzio@gmail.com>

Las metaloproteasas de la matriz (MMP) han sido involucradas en el daño por isquemia/reperusión. El precondicionamiento isquémico disminuye el daño isquémico, en parte atenuando la actividad de MMP-2, sin embargo no fueron estudiados los efectos del poscondicionamiento (Pos-con) sobre la actividad de MMP-2. **Objetivo:** Evaluar el efecto del Pos-con sobre la actividad de MMP-2 y su relación con el tamaño de infarto. Corazones aislados de conejos fueron perfundidos según la técnica de Langendorff. En el grupo 1 (G1, n=7), se realizó una isquemia global de 30 min seguida de 120 min de reperusión (R). En el grupo 2 (G2, n=7) se repitió G1 pero se realizó al inicio de la R dos ciclos de reperusión/isquemia (30 seg cada uno, Pos-con). En el grupo 3 (G3, n=6), se repitió G1, pero durante los primeros 2 min de la R se administró doxiciclina. Se tomaron muestras de efluente coronario para medir actividad de MMP-2 en situación basal y a los 2, 5 y 30 min de la R. Se midió el tamaño de infarto utilizando trifenil tetrazolium. X±ESM.* p<0.05 vs. G1. AR: Área relativa. ND: no detectable. El infarto fue de 16.2±1.2 en G1 y se redujo a 5.6±0.9 y 4.9±0.9 en G2 y G3, respectivamente (p<0.05).

	MMP-2 Basal	MMP-2 2 min R	MMP-2 5 min R	MMP-2 30 min R
G1 (%)	100±0	88.2±12	63.7±13	40.8±10
G2 (%)	100±0	38.2±8*	27.3±10*	1.1±0*
G3 (%)	100±0	ND	ND	ND

El Pos-con reduce el tamaño de infarto y atenúa la actividad de la MMP-2 durante la reperusión, la administración de

doxiciclina abolió la actividad de las MMP- 2 y redujo significativamente el tamaño de infarto. Nuestros datos sugieren que la MMP-2 podría estar involucrada en el mecanismo de protección del poscondicionamiento isquémico.

0044 (235) PAPEL DE LOS CANALES MITOCONDRIALES SENSIBLES AL ATP (K_{ATP}) EN LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL AYUNO (24 H) (AY) SOBRE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA (I)-REPERFUSIÓN (RP). M G Marina Prendes¹, M S González¹, M E Torresín¹, N Pascale¹, E Savino¹, A Varela¹

¹Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA. IQUIMEFA-CONICET <mgabymp@yahoo.com.ar>

Trabajos previos mostraron que el AY mejora la recuperación contráctil en corazones perfundidos Langendorff sometidos a I (25min)-RP (30min), efecto que es revertido por el 5-hidroxi-decanoico (HD), bloqueante de los K_{ATP}, administrado 10 min antes de la I hasta el fin de la RP. **Objetivos:** explorar si la protección ejercida por el AY se acompaña de preservación de la funcionalidad mitocondrial y evaluar si el HD modifica los efectos del AY. Se midió la transición de la permeabilidad mitocondrial (TPM) *in situ* mediante el atrapamiento mitocondrial de ³H-2-desoxiglucosa. Los Resultados fueron expresados como 10⁵ × Hdpm mitocondrial/unidad de citrato sintasa/dpm total/g. La producción de ATP (µmoles/min/mg proteína), en mitocondrias aisladas al final de la I-RP, se midió por luminometría. Se midió el lactato (µmol/gseco) al final de la I. Para descartar efectos directos del HD sobre la glucólisis, se midió el consumo de glucosa (mmol/L/30min) y la producción de lactato (mmol/L/30min) en extractos de corazón conteniendo las enzimas glucolíticas. Coincidiendo con la menor TPM la producción de ATP fue mayor en mitocondrias de corazones AY vs AI: TPM: 69,37±6,48 vs 96,36±14, p<0,05; ATP: 393,53±39,37 vs 203,58±24,00, p<0,01. El lactato fue menor en AY (112,53±15,00 vs 163,00±14, p<0,05). El HD no modificó la TPM (106,42±17,99) ni la producción de ATP (163,97±14,99) en AI, pero revirtió los efectos del AY (TPM: 92,95±10,96, p<0,05; ATP: 184,84±30,60, p<0,01;). El HD redujo el lactato en AI y AY (57±1, p<0,01 y 55,9±7,3, p<0,05) y no cambió el consumo de glucosa y la producción de lactato en el extracto glucolítico. Los datos indican que la atenuación de la TPM por el AY se acompaña de preservación de la funcionalidad mitocondrial y sugieren la participación de los K_{ATP} en este efecto. Sin embargo, los efectos del HD podrían también ser consecuencia de su propia oxidación parcial, lo que explicaría la menor producción isquémica de lactato por efecto Randle en presencia de este agente.

0045 (277) EFECTOS DEL PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN RATAS HIPERTENSAS ESPONTÁNEAS FRENTE A ISQUEMIAS DE DISTINTA DURACIÓN: PAPEL DEL ÓXIDO NÍTRICO. J C Fantinelli¹, I A Pérez Nuñez¹, S Mosca¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares <smosca@atlas.med.unlp.edu.ar>

Trabajos previos muestran que las ratas hipertensas espontáneas (SHR) seniles son menos tolerantes a la isquemia-reperfusión que las ratas normotensas. Sin embargo no es clara la respuesta de SHR adultas como así también existen pocos datos sobre los efectos y mediadores del preacondicionamiento isquémico (PI). Para dar contestación a estos interrogantes corazones aislados de SHR y de ratas WKY (normotensas) de 5 meses de edad, fueron asignados a los siguientes protocolos, después de 25min de estabilización: 1) 35min de isquemia global (IG) y 2 hs de perfusión (R); 2) 50min de IG y 2hs de R; 3) PI: 1 ciclo de 5min de IG y 10min de R previo a la IG35 y 50; 4) PI: 3 ciclos de 2min de IG y 5min de R previos a IG50. Para dilucidar la participación del óxido nítrico (NO) en el PI se realizaron los protocolos 3 y 4 en presencia de L-NAME, inhibidor de la óxido

nítrico sintetasa. Al final de la reperusión se midió el tamaño del infarto (TI) a través de la tinción con sales de tetrazolio y se expresó como % del área de riesgo. El PI 1 ciclo disminuyó significativamente el TI obtenido en el protocolo 1 en ambas cepas de ratas (14 ± 1% vs 29 ± 6% en WKY y 13 ± 3% vs 35 ± 5% en SHR). Sin embargo, el PI 1 ciclo disminuyó el TI obtenido con IG50 sólo en WKY (10 ± 2% vs 25 ± 2%, p< 0.05) y no lo modificó en SHR (56 ± 7% vs 55 ± 7%). El PI 3 ciclos disminuyó significativamente el TI obtenido con IG50 en ambas cepas de ratas (WKY=13 ± 5%; SHR= 25 ± 3%). El tratamiento con L-NAME anuló el efecto protector del PI en SHR (29 ± 3% y 42 ± 3% con 1 y 3 ciclos, respectivamente), pero no alteró la protección en las ratas WKY. Estos datos muestran que a isquemias más prolongadas las SHR adultas muestran TI mayores que las ratas normotensas, siendo necesaria la aplicación de un mayor número de ciclos preacondicionantes para lograr protección. Independientemente de la duración de la isquemia, los efectos cardioprotectores del PI en SHR son mediados por el NO.

0046 (303) EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL PREACONDICIONAMIENTO ISQUEMICO EN EL MIOCARDIO HIPERTRÓFICO. I A Pérez Nuñez¹, J C Fantinelli¹, G Schinella², S M Mosca¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares; ²Cátedra de Farmacología Básica, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP <i.a.p.n@hotmail.com>

El óxido nítrico (NO) ejerce acciones beneficiosas y perjudiciales durante la isquemia y reperusión. Estos efectos opuestos han sido vinculados a la relación del NO con las especies reactivas del oxígeno. Con el objeto de determinar esta relación en el miocardio hipertrófico, corazones aislados de ratas hipertensas espontáneas (SHR) fueron asignados a los siguientes protocolos, después de 25min de estabilización: 1) 35min de isquemia global (IG) y 2 hs de reperusión (R); 2) 50min de IG y 2hs de R; 3) Preacondicionamiento isquémico (PI): 1 ciclo de 5min de IG y 10min de R previo a IG35; 4) PI: 3 ciclos de 2min de IG y 5min de R previos a la IG50. Estos dos últimos protocolos se repitieron en presencia de L-NAME, inhibidor de la óxido nítrico sintetasa. Al final de la R, se midió en el tejido cardíaco el contenido de glutatión reducido (GSH), la actividad citosólica de la enzima superóxido dismutasa Mn-dependiente (SODMn) y la peroxidación lipídica, a través de la concentración de sustancias sensibles al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Ambos protocolos de PI atenuaron la disminución de GSH obtenida en los protocolos 1 y 2 (8.3 ± 2.1 vs 3.8 ± 0.5 mg/mgprot con IG35 y 7.1 ± 1.3 vs 1.7 ± 0.2 mg/mgprot con IG50, p<0.05). Las TBARS disminuyeron en los corazones preacondicionados con respecto a los no preacondicionados (0.35 ± 0.02 vs 0.52 ± 0.05 con IG35 y 0.71 ± 0.04 vs 0.84 ± 0.05 nmol/mgprot con IG50, p< 0.05). Ambos protocolos de PI disminuyeron la actividad de la SODMn en aproximadamente un 70% y un 50% con respecto a los valores obtenidos en los controles con IG35 e IG50, respectivamente. El tratamiento con L-NAME anuló parcialmente los efectos del PI, detectándose en los corazones un bajo contenido de GSH y un aumento de la actividad citosólica de SODMn y de la peroxidación lipídica. Estos Resultados muestran que el estrés oxidativo producido por la isquemia y reperusión en SHR disminuye con el PI y que este efecto es mediado por el NO.

0047 (498) EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS, EL ESTADO DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LA ATEROGENESIS EN RATAS.

H G Scoppa¹, M Bianco¹, A Niebyski¹, N Bensi¹, M Mugnaini², G Chiostrri¹, M García³, H F Gauna¹

¹Fisiología Animal Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Río Cuarto; ²Dpto Embriología. Facultad de Agronomía y Veterinaria UNRC; ³Química Biológica Facultad de Ciencias Exactas

tas Físico-Químicas y Naturales Universidad Nacional de Rio Cuarto <hscoppa@exa.unrc.edu.ar>

El estrés crónico intermitente (inmovilización en plancha 2hs/día/3 veces por semana (IMO), durante 180 días) puede interferir en la biosíntesis, composición de ácidos grasos y en el metabolismo de las lipoproteínas. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios producidos en los ácidos grasos plasmáticos (AGP), el estado de estrés oxidativo (EO) y la aterogénesis en ratas. Se utilizaron ratas Wistar macho en condiciones estándar de bioterio, divididas en controles (C) y estresadas (E). Se determinaron los AGP por cromatografía gaseosa (GC), se separaron las lipoproteínas por ultracentrifugación y se cuantificaron; se calcularon los índices aterogénicos y se cuantificó la concentración de apolipoproteína B, colesterol no-HDL y lipoproteína (a). Como biomarcadores de estrés oxidativo se determinaron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma y nitrorosina en aorta de ratas. El grupo E presentó valores aumentados (GC) de los ácidos monoinsaturados oleico (57%) y palmítico (251%) y menores valores de los ácidos poliinsaturados araquidónico (32%) y linoleico (44%) con respecto al grupo C. Las concentraciones de colesterol en las fracciones VLDL (30%, $p=0,0019$), LDL (61%, $p=0,0002$) y HDL (41%, $p=0,0002$) fueron mayores en el grupo E que en el C, respectivamente. Los índices aterogénicos colesterol-LDL/triacilglicéridos-LDL, apolipoproteína B, colesterol no-HDL y lipoproteína (a) fueron superiores en E respecto de los C ($p=0,005$). Los valores plasmáticos de TBARS fueron mayores (31%, $p=0,00003$) en los E que en C y la nitrorosina presentó reacción positiva en animales E. No hubo compromiso del estado general de los animales. Se puede concluir que el IMO prolongado produce un aumento significativo en los patrones aterogénicos del plasma sanguíneo, incrementa el EO y modifica marcadamente el perfil de los AGP, lo que sugiere la participación de estos parámetros en la regulación del metabolismo de lipoproteínas y en la aterogénesis.

0048 (532) DINÁMICA DE LOS PEQUEÑOS PROTEOGLICANOS RICOS EN LEUCINA DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR EN UN MODELO ANIMAL DE ATEROESCLEROSIS. G C Calabrese ¹, R Oberkersch ¹

¹ *Cátedra De Biología Celular-Facultad De Farmacia Y Bioquímica - Universidad De Buenos Aires <gcalabe@ffyb.uba.ar>*

El remodelado de la matriz extracelular vascular adquiere relevancia en la aterosclerosis. Los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRPs), decorina y biglicano, desempeñan papeles importantes en la organización de la matriz extracelular vascular y en la regulación de la proliferación y migración endotelial. Nos propusimos estudiar la producción de los SLRPs y los mecanismos de señalización intracelular involucrados, en un modelo animal de aterosclerosis. Ratas Wistar macho (150-175 gr) alimentadas durante 4 semanas con una dieta suplementada con colesterol (2%) y ácido cólico (1%) (Hcol) fueron comparadas con el grupo control (C). La secreción de los SLRPs fue analizada por inmunohistoquímica sobre los criocortes de las aortas, previa digestión con condroitinasa ABC. Las células endoteliales aórticas (CEAs) fueron aisladas y sometidas al fraccionamiento celular por centrifugación diferencial. La producción de SLRPs y de las citoquinas TGF β y TNF β se realizó sobre la fracción correspondiente a las membranas biológicas por Western Blot; al igual que la distribución núcleo/citosol de NF-kappaB y STAT3. Los Resultados fueron: 1) La degradación enzimática en los criocortes permitió la visualización de decorina en la íntima ensanchada de las aortas Hcol; 2) la digestión con condroitinasa de las membranas biológicas de las CEAs fue un requerimiento necesario para detectar la producción de decorina en los Hcol, 3) se observó una disminución en la producción de TNF α en animales Hcol (DO 8.79 vs 17.34; Hcol vs C, respectivamente) junto a una menor translocación al núcleo de NF-kappaB y STAT3 ($P<0,01$, $n=4$) y

4) No se detectó producción de TGF α en los animales Hcol. Los Resultados sugieren que el balance TNF α /TGF β , se inclina hacia la citoquina proaterogénica TNF α , la cual modularía la expresión de genes proinflamatorios, dentro de los cuales la modificación del patrón de glicosilación de SLRPs parece adquirir relevancia en el ensanchamiento difuso de la íntima aórtica.

0049 (629) FOSFORILACIÓN DEL RESIDUO SER67 DE LA SUBUNIDAD REGULADORA DE LA FOSFATASA TIPO 1 (PP1GM) DURANTE LA ESTIMULACIÓN BETA-ADRENÉRGICA DEL MÚSCULO CARDÍACO Y EN LA PROGRESIÓN HACIA LA INSUFICIENCIA CARDÍACA. Lucotti ¹, M Said ¹, L Vittone ¹, G Rinaldi ¹, A Mattiazzi ¹, C Mundiña-Weilenmann ¹

¹ *Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas de La Plata <ignaciolucotti@hotmail.com>*

La fosfatasa tipo 1 (PP1) es la principal fosfatasa que regula la desfosforilación de proteínas involucradas en el manejo del Ca intracelular en el músculo estriado. La PP1 esta compuesta por una subunidad reguladora (PP1GM) y una subunidad catalítica (PP1c). PP1GM localiza a la PP1c en diferentes sitios subcelulares modulando la especificidad de PP1c. PP1GM es blanco de señales extracelulares: en músculo esquelético de conejos, la adrenalina aumenta la fosforilación de PP1GM asociada a las partículas de glucógeno en los residuos Ser48 y Ser67. En estas condiciones PP1c se disocia de PP1GM y es menos activa para desfosforilar el glucógeno sintetasa y la fosforilasa a. No se conoce hasta el momento si un mecanismo similar de regulación de PP1GM ocurre en el músculo cardíaco. El propósito de este trabajo es estudiar esta posibilidad. Para ello tratamos ratones con adrenalina (0,5 ug/g intracardíaca) y propranolol (40 ug/g). Cuadriceps y corazones fueron removidos y congelados para su procesamiento. El tratamiento con adrenalina aumentó la fosforilación de la Ser67 de PP1GM en el músculo cardíaco (6,5 veces respecto a propranolol) de manera similar a lo que ocurrió en músculo esquelético (7,7 veces respecto a propranolol). El aumento de la fosforilación de los sitios de PP1GM ocurrió sin cambios en la expresión de la proteína. En corazones de rata sometidos por 5 meses a coartación aórtica, la fosforilación del residuo Ser67 de PP1GM aumentó respecto a ratas Sham operadas (130.6 \pm 8.8% $n=5$) y esto se acompañó de un aumento de la fosforilación del residuo Ser16 de fosfolamban (PLN), proteína que es el principal sustrato de la PP1c en el retículo sarcoplasmático cardíaco (196.80 \pm 31.90%, $n=8$ respecto a ratas sham). Estos Resultados son los primeros en indicar que en el músculo cardíaco la fosforilación de PP1GM podría ser un mecanismo de regulación de la actividad de PP1c, cuyo sustrato PLN es clave en la contractilidad y relajación miocárdicas.

0050 (631) CARACTERIZACIÓN HORMONAL Y FUNCIONAL EN LA HIPERTROFIA DE MIOCARDIO EN MODELOS CRÓNICOS COMBINADOS DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL RENOVASCULAR (RV) Y DOCA-SAL (DS). C S Cerrudo ¹, F Matorra ², I Seropian ², S Cavallero ¹, G E González ², C Morales ², C M Hertig ³, R J Gelpi ², B E Fernández ¹

¹ *Cátedra de Fisiopatología, INFIBIOQ, Facultad de Farmacia y Bioquímica;* ² *Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina. UBA;* ³ *INGEBI-CONICET <cerrudocarolina@yahoo.com.ar>*

Se continuó caracterizando modelos crónicos RV y DS en ratas a las 6 semanas (RV6, DS6) y 12 semanas (RV12, DS12), grupos combinados (RV6/DS6, DS6/RV6) y sham. El BNP en plasma (RIA) tendió a aumentar en RV6 y RV12 y en RV6/DS6 los niveles fueron similares a RV12 (pg/ml \pm ES, Sh6: 33,5 \pm 7,9; Sh12: 46,6 \pm 9,6; RV6: 127,1 \pm 67,9; RV12: 167,3 \pm 66,8; RV6/DS6: 188,3 \pm 82,4; $n=5-6$). El BNP aumentó por igual en DS6 y DS6/RV6, y con niveles mayores en DS12 (Sh6: 33,5 \pm 7,9; Sh12: 46,6 \pm 9,6;

DS6: 89,8±38,4; DS12: 243,5±144,7*; DS6/RV6: 104,9±22,1; * p<0,05 vs Sh12 y DS6, n=3-5). El ARNm-BNP (Northern Blot) aumentó en ventrículo derecho 1,5-2 veces en todos los grupos hipertensos, mientras que el ARNm-ANF no se modificó en RV6, pero aumentó al doble en DS12 y DS6/RV6 y 3-4 veces en DS6, RV12 y RV6/DS6. La expresión de ANF y BNP no cambió en aurícula izquierda. La función ventricular *in vivo* mostró en DS aumento de presión diastólica final (PDFVI) (mmHg±ES, Sh6: 2,63±0,57; Sh12: 3,76±0,82; DS6: 5,12±1,72; DS12: 7,09±1,94). La PDFVI no cambió en los grupos RV pero tendió a aumentar en RV6/DS6 (Sh6: 2,63±0,7; Sh12: 3,76±0,82; RV6: 4,63±1,91; RV12: 4,55±0,57; RV6/DS6: 5,66±2,68). La presión desarrollada (PDVI) aumentó en RV12 pero no en RV6/DS6 (Sh6: 112±8; Sh12: 108±5; RV6: 129±5; RV12: 176±7*#; RV6/DS6: 127±3#; *p<0,001 vs Sh12, #p<0,01 vs RV6, \$p<0,01 vs RV12). La PDVI disminuyó en DS12, pero no en DS6/RV6 (DS6: 103±1; DS12: 82±8*; DS6/RV6: 131±5#; *p<0,05 vs Sh12, #p<0,05 vs DS6, \$p<0,001 vs DS12). Se evaluó relajación a través de $T_{1/2}$ y τ . $T_{1/2}$ aumentó en DS12 y se normalizó en DS6/RV6 (ms±ES, Sh6: 8,5±1,2; Sh12: 8,5±0,9; DS12: 16,2±2,1*; DS6/RV6: 7,9±1,4#; *p<0,01 vs Sh12, #p<0,01 vs DS12). No hubo cambios en los grupos RV. τ mostró un comportamiento similar. Concluimos que el modelo DS presenta función ventricular más afectada con menor PDVI y deterioro de la relajación. El aumento de BNP que caracteriza modelos RV de 4 a 12 semanas, acompaña la disfunción ventricular global de DS12.

0051 (661) PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES BETA-2 ADRENÉRGICOS HIPOTALÁMICOS EN EL CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO. E A Silberman¹, M Mayer¹, C Höcht¹, J Opezzo¹, C Taira¹, B Fernandez¹, A Puyó¹

¹Facultad de Medicina y Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA <kelo_silberman@hotmail.com>

En trabajos anteriores demostramos, mediante la aplicación intrahipotalámica de metoprolol un compromiso de receptores β adrenérgicos hipotalámicos en el control de la presión arterial en el modelo de hipertensión arterial por sobrecarga con fructosa (F). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad del receptor β 2-adrenérgico pre y post sináptico en ratas F y animales control (C) mediante la perfusión intrahipotalámica de clenbuterol, un agonista β 2 selectivo. Ratas macho fueron divididas en dos grupos: fructosa (10% peso/volumen por 6 semanas) y grupo C. Se canuló la arteria carótida izquierda para la medición de la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC). Se colocó una sonda de microdiálisis en el área hipotalámica anterior para la perfusión de clenbuterol (3 mg/ml), y se evaluaron los cambios hemodinámicos y los efectos sobre las concentraciones de noradrenalina y 3-metoxi-4-hidroxi-fenil-etilglicol (MOPEG) en dializados hipotalámicos. La perfusión intrahipotalámica de clenbuterol descendió la PAM. La respuesta hipotensora fue significativamente menor en ratas F (-23,3 ± 3,0; n=0; p<0,05 versus ratas C) con respecto a animales C (-36,4 ± 3,5; n=6). No se observaron cambios significativos en la FC comparando ambos grupos. El clenbuterol incremento las concentraciones de noradrenalina y MOPEG en dializados hipotalámicos de ambos grupos. Mientras que el incremento de MOPEG fue similar en ratas F (188±27%; n=6) y animales C (210±27%; n=6), el aumento de noradrenalina inducido por clenbuterol fue significativamente menor en ratas F (174±44%; n=6; p<0,05 versus ratas C) con respecto al grupo C (294 ± 44%; n=6). En conclusión, considerando la menor respuesta hipotensora del clenbuterol y el menor incremento hipotalámico de noradrenalina inducido por el agonista, la actividad de receptores β 2-adrenérgico hipotalámicos, tanto post como presinápticos, se encuentra reducida en hipertensión arterial por sobrecarga de fructosa.

CARDIOVASCULAR P2

0052 (150) EFECTO DEL ÁCIDO HIALURÓNICO SOBRE LA FLUIDEZ DE MEMBRANA ERITROCITARIA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA. G Pistone¹, L Urli¹, M J Svetaz², A M Gennaro^{3,4}, R Volpintesta⁵, G Rombo⁵, S Palatnik⁵, A Luquita^{1,6}, M Rasia^{1,6}

¹Cátedra de Biofísica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.; ²Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas; ³INTEC, CONICET, UNL, Santa Fe; ⁴Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL; ⁵Cátedra de Reumatología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.; ⁶CIURN <giselapistone@hotmail.com>

En un trabajo anterior hemos demostrado que la disminución de la deformabilidad eritrocitaria de pacientes artríticos (AR) activos (DAS 28-4 > 2,6) correlacionaba significativamente con los niveles séricos elevados de ácido hialurónico (AH). Estos Resultados nos condujeron a la hipótesis de que el AH presente en sangre de estos pacientes rigidiza la membrana eritrocitaria disminuyendo la fluidez de la misma, lo que nos propusimos demostrar en este trabajo. *Métodos:* En la sangre de 12 pacientes artríticas (mujeres (39 ± 9 años) con diferentes DAS 28-4) y de 12 controles (dadoras sanas de similar edad) se midió la concentración sérica de AH (por ELISA). Pacientes y controles firmaron el consentimiento por escrito. Por otro lado, los eritrocitos de pacientes y controles fueron sometidos a lisis hipotónica (con buffer fosfato 5mM, 30 minutos a 4° C) para obtener membranas libre de hemoglobina. En ellas se estimó la movilidad de proteínas de membrana (W/S) por resonancia paramagnética electrónica utilizando Maleimida Tempo como marcador de spin. Resultados (mediana y IC95%): W/S controles: 3,2 (3-3,5) vs. W/S artríticos: 2,65 (2,55-2,75) p< 0,01; [AH] sérico controles: 20,00 (10,00-44,98) vs. [AH] sérico artríticos: 155,80 (44-346,34) p< 0,01. Correlación (coeficiente de Spearman: r_s) entre W/S y el [AH] sérico: $r_s = 0.81$ (p< 0.0000) y entre DAS 28-4 y [AH] sérico: $r_s = 0.87$ (p< 0.0000). *Conclusión:* Los espectros de EPR (W/S) indican que AH produce rigidización del citoesqueleto de membrana. La disminución en el parámetro W/S en pacientes con AR activa correlacionó significativamente con los niveles séricos elevados de AH, lo que sugiere la interacción del AH con las proteínas del citoesqueleto de membrana modificando su conformación y disminuyendo la fluidez de la membrana eritrocitaria de estos pacientes.

0053 (154) INFLUENCIA DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LA INERVACIÓN ADRENÉRGICA SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIDA EN FORMA INDIRECTA EN LA COLA DE RATAS WISTAR Y SHR. M Fritz¹, G Rinaldi²

¹Facultad de Ciencias Médicas UNLP; ²Centro de Investigaciones Cardiovasculares. Facultad de Ciencias Médicas UNLP <marianafritz@hotmail.com>

La presión arterial sistólica (PAS) se mide frecuentemente en ratas por un método indirecto en la cola utilizando un manguito de compresión y un detector de pulso. Usualmente se puede tomar una lectura cuando el pulso desaparece al inflar a una presión superior a la PAS, y otra cuando el pulso reaparece al desinflar por debajo de la misma. Habitualmente la lectura de deflación es la que se usa para estimar la PAS. Sin embargo nosotros encontramos que en 73 ratas Wistar normotensas la presión de deflación (PD) era 6 ± 0,6 mmHg inferior a la presión de inflado (PI), y en 51 SHR esa diferencia se incremento a 16 ± 1,4 mmHg. Aumentando el intervalo de compresión de la cola (lo cual provoca isquemia) a 4 minutos la diferencia PI/PD aumento a 27 ± 3 mmHg en Wistar y 31 ± 5 mmHg en SHR (p < 0,05), sugiriendo la acumulación de un metabolito vasodilatador. Este aumento fue prevenido totalmente en Wistar y parcialmente en SHR por administración de papaverina, indicando una relación con el estado contráctil del músculo liso de la arteria de la cola. El

bloqueo adrenérgico con compresión de 4 minutos redujo la diferencia PI/PD a 13 ± 5 mmHg en SHR ($p < 0,05$), pero fue inefectivo en Wistar. Por el contrario la administración de L-NAME disminuyó la diferencia PI/PD a 5 ± 2 mmHg en Wistar ($p < 0,05$) pero fue inefectiva en SHR. La medida simultánea de la PAS en la cola y por canulación carotídea mostró que el valor indirecto de inflación coincidía con la lectura intraarterial directa. **Conclusiones:** 1- El valor de PI debe ser considerado representativo de la PAS ya que el valor de PD puede subestimarla dependiendo del tiempo que dure la compresión de la cola. 2- La acumulación de óxido nítrico debido a la interrupción del flujo sería la principal causa de subestimación en Wistar. 3- En las SHR la acumulación de óxido nítrico fue escasa y la activación simpática más otros factores físicos parecieron predominar en el descenso de PD con respecto a PI.

0054 (204) EFECTO DE LA INMOVILIZACIÓN (IMO) SOBRE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DE LA PRESIÓN ARTERIAL (PA) EN RATAS VIEJAS. S N Binotti ¹, L Boccolini ¹, M Puebla ¹, N Bensi ¹, H Gauna ¹, A Nieblyski ¹

¹Fisiología Animal Facultad de Ciencias Exactas Físico-Química y Naturales UNRC <sbinotti@exa.unrc.edu.ar>

Es conocido que la actividad del sistema antioxidante de los tejidos disminuye con la edad, llevando a un desbalance entre los niveles de prooxidantes y antioxidantes. La edad asociada con el estrés podría potenciar este desbalance. El aumento de las especies oxidadas removerían al NO vascular y estarían involucradas en la patogénesis de la hipertensión arterial. Se investigó el efecto de la IMO sobre la inducción de estrés oxidativo y la PA en ratas viejas. Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 meses de edad, que fueron divididas en: control (C), estrés agudo (Ea) ratas sometidas a 1 h de IMO y estrés crónico (Ec) ratas sometidas a 1h de IMO/día durante 14 días. Se evaluó el malonildialdehído (MDA) hepático y renal y la superóxido dismutasa hepática (SOD). Se registró la PA sistólica (PAS), diastólica (PAD) y media (PAM) inmediatamente y a las 6 hs post-estrés. Se cuantificó la excreción renal de sodio y el volumen de orina. El Ec incrementa el MDA renal ($p=0.00003$); el Ea y el Ec aumenta el MDA hepático ($p=0.00007$ y $p=0.00003$). El estrés disminuyó la SOD (Ea $p=0.03$ y Ec $p=0.008$). El Ea y el Ec aumentó la PAS ($p=0.001$ y $p=0.0003$) y la PAM ($p=0.005$ y $p=0.00004$) inmediatamente post-estrés. El aumento de la PA fue mayor en el Ec que en el Ea (PAS $p=0.005$ y PAM $p=0.03$). El estrés aumentó la PAD (Ea $p=0.05$ y Ec $p=0.000001$), la que retornó al valor basal solo en el Ea ($p=0.01$). La excreción renal de sodio ($p=0.00007$ y $p=0.0006$) y de la diuresis ($p=0.01$ y $p=0.02$) disminuyó en respuesta al Ea y al Ec. Si bien es conocida la acción de las catecolaminas en el aumento de la PA, la antinatriuresis y antiuresis observada en respuesta al estrés podría ser una de las causas del incremento de la PA a largo plazo. Además, no podría descartarse al estrés oxidativo evidenciado por un aumento en la peroxidación lipídica y una disminución de la defensa antioxidante, como otro factor que incidiría en la génesis de la hipertensión.

0055 (223) EXPOSICIÓN AGUDA A PARTICULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL: CAMBIOS TEMPORALES EN EL METABOLISMO OXIDATIVO EN CORAZÓN. T Marchini ¹, N Magnani ¹, D Tasat ², S Alvarez ¹, P Evelson ¹

¹PRALIB-CONICET Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín, Buenos Aires <tmarchini@ffyb.uba.ar>

La exposición a contaminantes ambientales desencadena una respuesta inflamatoria que repercute en el sistema cardiovascular, donde la producción de especies activas del oxígeno y del nitrógeno estarían involucradas en el mecanismo molecular

fisiopatológico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética del metabolismo oxidativo cardíaco en ratones expuestos a contaminantes ambientales particulados. Se utilizó un modelo *in vivo* de exposición aguda a partículas ambientales (ROFA), mediante instilación intranasal (0,20 mg/kg peso) en ratones Swiss hembras de 20-25 g. Se evaluó el consumo de oxígeno en cortes de tejido, la producción de óxido nítrico (NO), el daño oxidativo a macromoléculas a través del contenido de TBARS y carbonilos, la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa y la capacidad antioxidante total (TRAP) en homogeneizados de corazón. Las determinaciones se realizaron transcurridas una y tres horas luego de la instilación. La exposición a las partículas produjo a las 3 hs una disminución del 50% en la producción de NO (control: $1,0 \pm 0,1$ nmol NO/min mg prot., $p < 0,05$). Se observó un aumento del 150% en el contenido de carbonilos (control: $2,5 \pm 0,2$ nmol/mg prot., $p < 0,01$) y del 75% en la actividad de SOD (control: $3,1 \pm 0,3$ USOD/mg prot., $p < 0,01$) a las 3 hs de la instilación, mientras que el resto de los parámetros estudiados no mostraron cambios significativos. No se observaron diferencias significativas en los parámetros mencionados transcurrida una hora luego de la instilación. Los resultados muestran la presencia de daño oxidativo junto con una posible respuesta adaptativa evidenciada por el aumento en la actividad de SOD. La disminución de la producción de NO a las tres horas estaría asociada a una disminución en la respuesta inflamatoria generada por la exposición a partículas ambientales.

0056(231) DIFERENTE POTENCIAL DE LÍNEAS DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS PARA DIFERENCIARSE HACIA EL LINAJE CARDÍACO. M Questa ^{1,2}, M E Scassa ³, D D Fernandez Espinosa ³, A S Guberman ⁴, G E Sevelever ³, S G Miriuka ³

¹FLENI; ²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; ³Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLENI; ⁴Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en el Crecimiento, Supervivencia y Diferenciación Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA <mariaquesta@gmail.com>

Las células madre embrionarias (CME) humanas pueden diferenciarse eficientemente hacia cardiomiocitos. Las CME provenientes de diferentes líneas presentan una morfología similar, expresan marcadores de pluripotencialidad y son capaces de dar origen *in vitro* a progenitores de las tres capas germinales. Sin embargo, el desarrollo hacia un linaje específico y la eficiencia del proceso puede variar entre líneas celulares. En este estudio analizamos el potencial que presentan cuatro líneas humanas de ESC: H5, H9, H16 y S, para dar origen a cardiomiocitos. Las ESC fueron cultivadas sobre Matrigel en medio condicionado por fibroblastos embrionarios murinos, suplementado con 10% suero sustituto (KSR) y bFGF con el objetivo de proveer una plataforma inicial estandarizada para su posterior análisis. La diferenciación se indujo a través de el cultivo en suspensión de cuerpos embrioides (CE) en medio conteniendo 20% de suero fetal bovino. El análisis por RT-PCR de los CE a los 7 días de iniciado el proceso de diferenciación reveló la inducción de genes cardíacos específicos como GATA-4, GATA-6, Nkx2.5, Islet-1 y Troponina T Cardíaca (cTnT). Notablemente, el porcentaje de CE contráctiles varió significativamente entre líneas celulares. Luego de 15 días se detectó la expresión de Péptido Natriurético Auricular, cTnT, GATA-4 y Nkx2.5 en los CE contráctiles, mediante inmunofluorescencia. Contrariamente, cuando los CE fueron generados en medio de cultivo de composición definida, éstos no presentaron zonas contráctiles, exhibiendo una reducida expresión de genes cardíacos y una aumentada expresión del marcador de ectodermo Pax-6. Este trabajo permitió identificar a la línea H5 como la de mayor potencial para diferenciarse hacia cardiomiocitos. La caracterización de líneas y el establecimiento de protocolos que permitan generar eficientemente cardiomiocitos funcionales representan un desafío para su aplicabilidad en terapias regenerativas.

0057 (262) PAPEL DE LA GLUCOSA-6-P DESHIDROGENASA (G6PDH) EN LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) EN CORAZONES SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL 25 MIN (I) – REPERFUSIÓN 30 MIN (RP) EN DISTINTAS CONDICIONES METABÓLICAS. M G Marina Prendes¹, M E Torresín¹, M S González¹, N Pascale¹, E Savino¹, A Varela¹

¹Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA. IQUIMEFA-CONICET <mgabymp@yahoo.com.ar>

El objetivo fue explorar si el PC afecta la actividad de la G6PDH, enzima clave de la vía de las pentosas que contribuye al mantenimiento de un entorno citosólico reducido, fenómeno que aumenta la resistencia a la injuria por I-RP. Se trabajó con corazones perfundidos Langendorff de ratas alimentadas ad libitum (AL) y ayunadas 24 hs (AY) (n=8/grupo). La transición de permeabilidad mitocondrial se midió *in situ* mediante la técnica del atrapamiento mitocondrial de ³H-2-desoxiglucosa. El atrapamiento mitocondrial (DG_{mito}) fue expresado como 10⁵ ³H d.p.m.mitocondrial/unidad de citrato sintasa/dpm total/gh y el contenido celular (DG_{cel}) en dpm total/gh. Se midió la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG); y el daño oxidativo mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Resultados: los datos que figuran en la tabla corresponden al final de la I-RP (* p<0,05 vs AL Control, # p<0,01 vs control igual condición alimenticia, ^a p<0,01 vs AL PC)

	AL Control	AL PC	AY Control	AY PC
G6PDH (UI/g prot)	1.28 ± 0.15	2.25 ± 0.22 *	2.25 ± 0.36 *	2.75 ± 0.35 *
GSH/GSSG	7.92 ± 1.7	18,24 ± 2,94 #	24.58 ± 5.98 *	40,02 ± 5,41 # ^a
TBARS (nmol/gh)	20.75 ± 2.10	17,33 ± 1,92	15.57 ± 2.20 *	13.89 ± 2.51
DG mito	96.36 ± 14.00	26.40 ± 6.30 #	69.37 ± 6.48 *	28.99 ± 4.98 #
DG cel	58954 ± 5150	93394 ± 6534 #	45358 ± 3474	75722 ± 10428 #

Los corazones AY mostraron mayor actividad de G6PDH, mayor relación GSH/GSSG, menor daño oxidativo y preservación parcial de la permeabilidad mitocondrial con respecto a los AL. El PC aumentó la actividad de la G6PDH sólo en AL, pero aumentó la relación GSH/GSSG en ambas condiciones, efecto que se acompañó de preservación de la permeabilidad mitocondrial y de la integridad del sarcolema. Estos Resultados sugieren que la activación de la vía de las pentosas ya sea por el PC o por el ayuno previo es beneficiosa para el corazón sometido a I-RP, pero los Resultados en corazones AY sugieren que el PC también actúa mediante otros mecanismos para preservar la relación GSH/GSSG.

0058 (300) ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE LA ERK1/2 Y LA CAMKII DURANTE LA ACIDOSIS INTRACELULAR EN MIOCITOS: SU ROL EN LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL NHE-1. N Lezcano¹, M Vila-Petroff¹, A Mattiazzi¹, C Mundiña-Weilenmann¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares <noarlez@hotmail.com>

El NHE-1 es la principal isoforma del intercambiador Na⁺/H⁺ expresada en cardiomiocitos. La activación del NHE-1 en respuesta a la acidosis, produce un intercambio electroneutral de Na⁺ y H⁺ que tiende a la normalización del pH intracelular (pHi). Se ha propuesto que numerosas proteínas quinasas podrían fosforilar y estimular al NHE-1 (ERK1/2 y su sustrato p90rsk, p160rock, Nik, CaMKII). La participación de ERK1/2 en la acidosis sostenida es conocida. Previamente describimos que la acidosis hipercápnica activa a la CaMKII. Esta quinasa fosforila sustratos esenciales para la recuperación de la contractilidad miocárdica y contribuye a la recuperación del pHi vía activación del NHE-1. El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación de la vía CaMKII con la vía de las ERK1/2 en la activación del NHE-1 durante la acidosis. Se midieron el pHi (SNARF1-AM) y la fosforilación de ERK1/2 (immunoblot) en miocitos aislados de rata sometidos a acidosis

intracelular sostenida (HS) generada por exposición a CINH4 y lavado del mismo previo al pasaje por una solución libre de Na⁺ para inhibir el NHE-1. El protocolo se repitió en presencia de los inhibidores de ambas vías de fosforilación. La HS aumentó la fosforilación de las ERK1/2 (201,8±23,3% n=10 respecto del control). Este efecto fue abolido por el inhibidor de esta vía PD98059 (59,9±27,4% n=3) y no afectado por el inhibidor de la CaMKII, KN-93 (157,5±17,4% n=11). La velocidad de recuperación del pHi en la HS (0,22±0,02 min⁻¹ a pH: 6,8 n= 6) fue significativamente menor en presencia de PD98059 (0,14±0,02 n=5) y de KN93 (0,14±0,01 n=5). La velocidad de recuperación del pHi se enlenteció aún más cuando los miocitos se preincubaron con ambos inhibidores simultáneamente (0,06±0,02 n= 3, p<0.05). Los Resultados indican que tanto la vía de la ERK1/2 como la CaMKII activan al NHE-1 en forma independiente y que ambas vías son funcionales en la recuperación del pHi durante la HS. Premio M. C. Camilión de Hurtado

0059 (577) FACTORES DE RIEGO INDEPENDIENTES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL SECUNDARIA EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA CARDIACA. G H Guzman Montesana¹, R Domínguez², R Córdoba³, A Báez¹, S Lo Presti¹, W Rivarola¹, P Pons⁴, R Fretes⁴, P Paglini¹

¹CATEDRA DE FISICA BIOMEDICA, FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA; ²INSTITUTO NACIONAL DEL CORAZON - LA RIOJA - ARGENTINA; ³Sanatorio Allende - Córdoba - Argentina; ⁴CATEDRA DE HISTOLOGIA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA, FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS, UNIVERSIDAD NACIONAL DE CORDOBA, ARGENTINA <drgzmanmontesana@argentina.com>

Se define al factor de riesgo cardiovascular como una característica mensurable que tiene una relación causal con la frecuencia de la Insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) y constituye un factor predictivo independiente y significativo del riesgo de contraer una enfermedad. Evaluamos la estimación del riesgo relativo (RR) de la disfunción mitocondrial secundaria en pacientes con ICC, según algunos factores de riesgo para el desarrollo de insuficiencia cardiaca. Se incluyeron 22 pacientes que fueron sometidos a cirugía cardiovascular de los cuales 14 presentaron ICC e Hipertensión Arterial (HTA), Diabetes Mellitus, Dislipidemia, Enfermedad Coronaria, Valvulopatías y 8 pacientes con comunicación auricular solamente (control) obteniendo biopsias de ventrículo izquierdo. Se analizó la actividad enzimática del complejo III mitocondrial, medida por espectrofotometría y la ultraestructura mediante el Axionvision. Los datos se analizaron con ANOVA y riesgo relativo. Se obtuvo una reducción en el área de las mitocondrias en un 78% en pacientes con ICC con respecto al control (160,37µm² ±9,87), (936,81µm²±78,48) respectivamente, p<0.0001 y reducción del 70% en la actividad del complejo III medido en mM ubiq.mim-1.mg prot, comparada con el control (1,9 10⁻² ±12,6); (5,79 10⁻²±36,6) respectivamente, p<0,001. Estos Resultados se correlacionaron con los factores de riesgo para desarrollar disfunción mitocondrial y se obtuvo que la HTA presenta un RR 2, diabetes RR 1,3, dislipidemia RR 1,5, enfermedad coronaria RR 1,4 valvulopatías RR 1,5. Si bien es indispensable aumentar el número de casos los RR no difieren de los descriptos en el estudio de Framingham por lo que se ha estimado que los factores de riesgo analizados podrían tener efecto sobre la morfología y la actividad funcionalidad de las mitocondrias a nivel cardiaco.

0060 (660) LA INHIBICIÓN PARCIAL DE LA NA⁺/K⁺-ATPASE CON OUABAÍNA INDUCE APOPTOSIS EN MIOCITOS ADULTOS DE RATA. L Sapia¹, A Mattiazzi¹, M Vila Petroff¹

¹Centro de Investigaciones Cardiovasculares <lucianasapia@hotmail.com>

El efecto inotrópico positivo producido por la inhibición parcial de la bomba Na⁺/K⁺-ATPasa mediante el uso de digitálicos, ha

sido usado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca por más de 200 años. Se ha demostrado recientemente que la administración en forma aguda de dosis tóxicas de ouabaína induce apoptosis en miocitos cardíacos. Sin embargo hasta el momento no se ha explorado si la administración a largo plazo de dosis no tóxicas podría promover la muerte celular. El objetivo de este estudio fue comprobar si dosis no tóxicas de ouabaína podrían inducir apoptosis en miocitos de rata y examinar los mecanismos subcelulares involucrados en este fenómeno. Para este propósito, miocitos aislados de rata se cultivaron durante 24hs en presencia y ausencia de ouabaína 2µM. La medida de viabilidad/apoptosis muestra que la ouabaína produce una disminución de la viabilidad en un 43±5% en parte debido a la apoptosis detectada con el aumento en la actividad de caspasa-3 y del cociente Bax/Bcl-2. La reducción en la viabilidad celular producida por la ouabaína fue completamente prevenida por el inhibidor del NCX, KBR-R7943 y el inhibidor de la CaMKII, KN-93. La inhibición de la CaMKII no modificó el efecto inotrópico positivo inducido por la ouabaína. Por otro lado, mientras que la inhibición de la ERK1/2 con PD-98059 no afectó la muerte celular inducida por ouabaína, la inhibición de la ruta PI3K/AKT con wortmanina, exacerbó el efecto deletéreo de la ouabaína en los miocitos cardíacos de rata. Concluimos que el incremento de Ca²⁺ responsable del efecto inotrópico positivo de la ouabaína también promueve la activación de una cascada apoptótica que involucra a la CamKII como un efector clave. La Ouabaína activa simultáneamente una cascada antiapoptótica que involucra a AKT, la cual es insuficiente para inhibir completamente al apoptosis.

ENDOCRINOLOGIA 01

0061 (153) MECANISMO DE ACCION DE PROGESTERONA EN CELULAS ENDOTELIALES: CROSS-TALK ENTRE EFECTOS RAPIDOS Y GENOMICOS. P H Cutini^{1,2}, V Massheimer¹, ²

¹Catedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca; ²CONICET <pcutini@criba.edu.ar>

En la última década se ha propuesto que el mecanismo de acción de las hormonas esteroideas comprendería acciones no genómicas de activación de sistemas de señalización intracelular que contribuirían a la regulación de la transcripción génica. En este trabajo investigamos la existencia de interacciones entre los efectos genómicos y no genómicos de progesterona (Pg) en células endoteliales (CE). Se emplearon CE, obtenidas por cultivo primario de explantes de anillos de aorta de ratas Wistar, tratadas con concentraciones fisiológicas de Pg. Como efecto no genómico se evaluó la acción de Pg sobre la síntesis de óxido nítrico (NO) por el método de Griess. Se demostró que 20 min de tratamiento con Pg (1, 10 y 100 nM) estimuló la síntesis de NO (42%, 29% y 103% s/control, p<0.02). La preincubación con inhibidores de la transcripción y de síntesis proteica (actinomicina, 10 µg/ml, cicloheximida, 100 µM) no alteró la acción hormonal, demostrando la naturaleza no genómica del efecto. Como parámetro genómico seleccionamos la proliferación celular (incorporación de [³H]-timidina). Se observó una inhibición de la proliferación de CE luego de 24 h de tratamiento con 10 nM Pg (207±45 vs 110±25, control vs Pg, p<0.02). El efecto antiproliferativo fue suprimido completamente por cicloheximida y actinomicina. Obtuvimos evidencia de que la síntesis de ADN dependiente de Pg comprende la vía NOS, al bloquear completamente la acción del esteroide por el inhibidor de NOS (L-NAME, 10 µM). Considerando que previamente hemos descrito que Pg estimula en forma no genómica la actividad MAPK, estudiamos el rol de esta vía sobre la regulación de la proliferación. El pretratamiento con PD98059 (inhibidor MAPK) suprimió el efecto del esteroide (185.0±18.5 vs 86.9±11.3; 180.8±19.2 vs 198.8±28.4 cpmx10³/mg prot, control vs 10nM Pg +/- PD98059, p<0.001). Concluimos que a nivel del endotelio vascular Pg actúa a través de un mecanismo de acción de dos pasos que vincula acciones genómicas y no genómicas.

0062 (206) CARACTERIZACIÓN DE FACTORES DE INHIBICIÓN LIPÍDICA SECRETADOS POR CÉLULAS MAMARIAS: EFECTO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN Y METABOLISMO OXIDATIVO DE ADIPOCITOS. F Adot¹, P Sacca², J C Calvo^{1,2}, L N Guerra¹

¹Departamento de Química Biológica, FCEN - UBA;

²BYME <liliana@qb.fcen.uba.ar>

Factores proteicos (TgIF) presentes en medios condicionados (MC) por células de NMMG (epitelio mamario), JEG-3 (citotrofoblastos) y C6 (glioma) son activos para la inhibición de la acumulación de lípidos (Tg) en adipocitos 3T3-L1 (NMMG (66%), JEG-3(37%) y C6 (17%)). El ensayo de actividad consiste en inducir la diferenciación de 3T3-L1 en presencia o ausencia del MC y cuantificar Tg. Con el objetivo de purificar y caracterizar estos TgIF, cromatografamos los MC por columna de HiPrep Sephacryl S-200, y analizamos los eluidos activos por proteómica, realizando electroforesis bidimensional de poliácridamida (EF) y caracterizando la/s proteína/s de interés por MALDI-TOF. Se analizó el efecto temporal del MC de NMMG sobre el nivel de Tg y de glutatión reducido (GSH). Se compara el nivel de Tg en células diferenciadas (CP), no diferenciadas (CC) y tratadas con MC. La acumulación de Tg está significativamente aumentada al día 14 post diferenciación (CP: 2.74 ± 0.49 vs CC: 0.45 ± 0.21 µg Tg/µg prot, p< 0.01). MC-NMMG produce inhibición de 70 % en acumulación de Tg a partir del día 6 post diferenciación (CP: 0.09 ± 0.01 vs CP+MC: 0.03 ± 0.01 p< 0.01), que se mantiene hasta el día 14 post diferenciación. El nivel de GSH aumenta durante la diferenciación, siendo significativo al día 14 post diferenciación (CP: 510 ± 25 vs CC: 320 ± 16 µmol GSH / g proteína, p< 0.01), MC-NMMG produce disminución significativa en GSH (110 ± 12 µmol GSH/ g proteína.). La fracción activa de los MC fue eluida en columna calibrada a un volumen similar (NMMG = 109, JEG3= 95, C6 = 100 ml), estos eluidos dieron en la EF una banda de aproximadamente 60.000 que fue caracterizada. **Conclusión:** TgIF provoca tempranamente la inhibición sobre la acumulación de Tg, aunque esta inhibición no sería total; como efecto colateral evitaría el incremento de GSH observado durante la diferenciación. Nuestros primeros Resultados indicarían que TgIF podría ser una galactosa 3-O- sulfotransferasa.

0063 (362) HORMONAS LACTOGÉNICAS INDUCEN LA EXPRESIÓN DE UNA PROTEÍNA REGULADORA DE LA ESTABILIDAD DEL ARN MENSAJERO EN EL EPITELIO MAMARIO. V Slomiansky¹, M V Goddio¹, F di Pietro¹, A Quaglino¹, A Gattelli¹, E C Kordon¹

¹Laboratorio de Expresión Génica en Mama y Apoptosis (LEGMA), Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), UBA. <slomiansky@leloir.org.ar>

Los AREs son secuencias identificables dentro de ciertos ARN mensajeros (ARNm), a las cuales se unen proteínas denominadas AUBPs, las cuales modulan su estabilidad. Una de las AUBPs más caracterizadas es tristetraprolina (TTP). La misma provoca desestabilización de ARE-ARNm de citoquinas pro-inflamatorias como TNFα. Nuestro grupo ha demostrado que este factor es inducido al finalizar la lactancia y cumpliría una función relevante en la involución mamaria. Además, se ha reportado que los glucocorticoides inducen TTP y su actividad inhibitoria sobre TNFα en distintos tipos celulares. Nuestro objetivo fue determinar si las hormonas lactogénicas, prolactina y glucocorticoides, serían capaces de inducir la expresión de TTP en la mama como parte del mecanismo para prevenir la involución. Hallamos que en la mama de ratones BALB/c existía un incremento de TTP, tanto a nivel de ARNm como de proteína, durante la lactancia. Además, durante la diferenciación de células mamarias en cultivo (HC11) se indujo la expresión de TTP de manera similar a lo observado con proteínas de la leche como b-caseína. También encontramos que el tratamiento con glucocorticoides no ejerce efectos significativos

en la inducción de TTP en HC11 confluentes, o en la glándula mamaria *in vivo*. El análisis *in silico* del promotor de TTP reveló la presencia de sitios putativos de pegado para los factores de transcripción Stat5. Es sabido que la activación del Stat5A es el mecanismo fundamental que media la actividad de la prolactina en el epitelio mamario. Análisis de western blot indicaron que el tratamiento con glucocorticoides *in vivo* no es suficiente para inducir de manera significativa la activación de Stat5A en la mama. Basados en estos Resultados proponemos que la activación de la vía prolactina-Stat5A es necesaria para inducir la transcripción de TTP en el epitelio mamario. Esto indica la relevancia fisiológica de TTP durante la lactancia, contribuyendo a la prevención de la involución mamaria.

0064 (420) LA EXPOSICIÓN IN UTERO A BISFENOL A PROMUEVE ANGIOGENESIS Y MODULA LA RESPUESTA MEDIADA POR RECEPTORES DE ESTEROIDES EN LA GLÁNDULA MAMARIA POST-PUBERAL. M.L Durando¹, L Kass¹, V Perdomo¹, E H Luque¹, M Muñoz deToro¹

¹Lab. de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (LETH). Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL <mdurando@fbc.unl.edu.ar>

La exposición *in utero* al xenoestrógeno bisfenol A (BPA) modifica la histoarquitectura de la glándula mamaria (GM) post-puberal, promueve el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y aumenta la sensibilidad al carcinógeno químico N-nitrosometilurea. Nuestro objetivo fue dilucidar los posibles mecanismos asociados con estas alteraciones. Previamente habíamos demostrado mayor sensibilidad de la GM a estrógenos, reclutamiento de mastocitos (asociados a angiogénesis?), aumento del *turn over* celular y reacción desmoplásica. En este trabajo, ratas Wistar recibieron a través de bombas osmóticas sc, desde el día (d) 8 de gestación hasta el parto: vehículo, 25BPA o 250BPA (25 o 250 ug/kg/d, respectivamente). Las crías hembras se sacrificaron en diestro a los 50 ó 110d de edad. Evaluamos el área vascular (AV) y por inmunohistoquímica: los receptores de estrógeno alfa y progesterona (ERa y PR), dos coreguladores de receptores nucleares, el SMRT (*silencing mediator for retinoic acid and thyroid hormone receptor*), y el SRC-3 (*steroid receptor coactivator 3*); y VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Los animales expuestos a 250BPA presentaron menor expresión de SRC-3 asociado con aumento en la expresión de ERa, tanto a los 50 como a los 110d. Entre los 50d y 110d hubo un incremento en la expresión de SMRT, este aumento no ocurrió en 25BPA. La mayor expresión de PR en este último grupo sugiere que la respuesta mediada por ERa escapa a la posible represión ejercida por SMRT. El AV del estroma mamario fue mayor en los animales de 250BPA, observándose una tendencia similar en 25BPA. Este incremento en el AV no se asoció con cambios en la expresión del VEGF. Los cambios en la expresión de los coreguladores, que modificarían la respuesta mediada por ER y PR mamarios, y el aumento del AV facilitarían el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas.

0065 (376) LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS alfa ASOCIADO A MEMBRANA (MERalfa) EN LACTOTROPOS ES MODULADA POR ESTEROIDES GONADALES. S.Zárate¹, G Jaita¹, V Zaldivar¹, D Radl¹, G Eijo¹, J Ferraris¹, D Piserá¹, A Seilicovich¹

¹IDIR Facultad de Medicina UBA <szarate@fmed.uba.ar>

Previamente hemos observado que tanto el estradiol (E2) como el E2-BSA, un conjugado sintético que no difunde hacia el interior de la célula, inducen una rápida respuesta apoptótica en células adenohipofisarias totales (CA), lactotrofos y somatotrofos. El ICI 162,780, un antagonista de receptores estrogénicos clásicos (ERα y β), revierte completamente este efecto sugiriendo que la activación de receptores asociados a la membrana plasmática estaría involucrada en el efecto proapoptótico del E2. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de ERα asociado a membrana (mERα) en CA, lactotrofos y somatotrofos durante el ciclo

estral y el efecto de los esteroides gonadales sobre dicha expresión mediante citometría de flujo. El mERα es expresado en 21.5 ± 1.0% de CA, 41.6 ± 6.6% de lactotrofos y 11.3 ± 3.6% de somatotrofos provenientes de adenohipófisis de ratas sacrificadas en estadios al azar del ciclo estral. En adenohipófisis de ratas sacrificadas en proestro (P) o diestro (D) no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de CA (P: 24.4 ± 1.5%; D: 21.7 ± 1.3%) o somatotrofos (P: 10.8 ± 1.4%; D: 17.0 ± 3.6%) que expresan mERα. Sin embargo, el porcentaje de lactotrofos que expresan mERα fue mayor en proestro que en diestro (P: 38.2 ± 0.9%; D: 24.0 ± 4.6%, p<0.05, Student's t test). El tratamiento agudo de ratas ovariectomizadas con E2, progesterona (P4) o una combinación de ambos esteroides no modificó el porcentaje de CA que expresan mERα (VEH: 16.9 ± 0.2%; E2: 16.8 ± 0.03%; P4: 14.0 ± 1.4%; E2+P4: 12.3 ± 0.2%). Sin embargo, el E2 aumentó el porcentaje de lactotrofos que expresan mERα y la P4 revirtió este efecto (VEH: 15.4 ± 2.4%; E2: 31.5 ± 2.0%; P4: 10.2 ± 4.4%; E2+P4: 11.8 ± 1.7%, p<0.05 ANOVA) Estos Resultados indican que la expresión de mERα en lactotrofos varía durante el ciclo estral y sugieren que cambios en los niveles circulantes de esteroides gonadales estarían involucrados en dicha variación.

0066 (503) PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EFECTO DE LA ALTA GLUCOSA SOBRE LA VIABILIDAD, APOPTOSIS Y PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA. R Rubinstein¹, A M Genaro¹, M R Wald¹

¹Cefybo-Conicet-Uba <roxirubin@yahoo.com.ar>

La literatura experimental sugiere una interrelación entre el estado diabético y la inmunosupresión. En estudios previos observamos una disminución en la respuesta inmune en un modelo murino de diabetes. Dada la participación de la hiperglucemia en las complicaciones de la diabetes, se estudió el efecto de altas concentraciones de glucosa (HG) sobre la actividad linfocitaria normal. HG disminuyó la viabilidad celular, incrementó la apoptosis e inhibió la respuesta proliferativa de linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) estimulada por mitógenos. Se postula que el evento inicial en la patogénesis de las complicaciones en la diabetes es el estrés oxidativo, es así que el objetivo del presente trabajo fue estudiar sus niveles y el efecto de los antioxidantes sobre la acción de la HG. Se observó un incremento del estrés oxidativo (presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica) causada por HG. Se estudió el efecto de dos antioxidantes hidrosolubles: Vitamina C (Vit C) y N-acetylcysteine (Nac). Concentraciones de Vit C entre 0.1 y 0.5 mM inhibieron la proliferación linfocitaria normal e indujeron apoptosis. Se utilizaron concentraciones que inhiben la producción de estrés oxidativo sin modificar la viabilidad y la proliferación linfocitaria normal (Vit C: 31 μM para LT y 62 μM para LB. Nac: 5 mM para LT y LB). Ambos revirtieron el efecto de la HG sobre la viabilidad celular (incorporación de azul tripan) y la apoptosis (marcación con anexina V-FITC/Ioduro de propidio) tanto en LB como en LT. En cuanto a la proliferación (incorporación de ³H-timidina y CFSE) sólo se observó una reversión parcial. Concluimos que la HG interacciona con los linfocitos disminuyendo la viabilidad y actividad linfocitaria. En este efecto participaría un aumento del estrés oxidativo ocasionando la muerte celular; mientras que en la disminución de la proliferación celular estarían implicados mecanismos adicionales.

0067 (616) LA ACCIÓN DE TIROSINA FOSFATASAS (PTPS) Y LA GENERACIÓN Y EXPORTACIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA) INTRAMITOCONDRIAL COMO PASES COMUNES EN DIFERENTES VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES. P.G Mele¹, A Duarte¹, I Neuman¹, C Paz¹, E J Podestá¹

¹IIMHNO - Depto. de Bioquímica, Laboratorio HRDC, Facultad de Medicina, UBA <pgmele@fmed.uba.ar>

Previamente, hemos demostrado la existencia de una proteína, fosforilada en tirosina, necesaria para la expresión de un gen esencial que promueve el transporte intramitocondrial de

colecsterol. Esta proteína debe ser defosforilada por una PTP regulada a través de la vía AMPc/PKA. Una vez defosforilada, la proteína induce la expresión de ACS4, acil-CoA sintetasa que utiliza preferentemente al AA, la cual actúa en forma concertada con Acot2, tioesterasa mitocondrial de acil-CoA de ácido graso de cadena larga, para promover la liberación de AA a partir de la mitocondria. Dado que la esteroidogénesis puede ser estimulada utilizando diferentes señales de transducción el objetivo del presente trabajo fue estudiar si las PTPs y la generación y liberación de AA son activadas por diferentes vías de señalización. Para ello usamos células H295R, línea adrenocortical humana, la cual es capaz de responder a través de tres vías de señalización diferentes para sintetizar aldosterona. Usando dos inhibidores diferentes de PTP (óxido de fenilarsina, PAO; y ácido bencilfosfónico, BPA) hemos demostrado que la acción de PTP es necesaria para la síntesis de aldosterona por ACTH (AMPc dependiente) como por angiotensina II y K⁺ (AMPc independientes) (nmol de aldosterona/mg proteína: ctrl: 0,22±0,02; PAO 2µM: 0,19±0,02; BPA 0,4µM: 0,20±0,04; AngII 10⁻⁷ M: 0,85±0,05; AngII+PAO: 0,19±0,01 (P<0,01); AngII+BPA: 0,23±0,04 (P<0,01); K⁺ 14mM: 0,74±0,03; K⁺+PAO 0,29±0,02 (P<0,01); K⁺+BPA: 0,25±0,02 (P<0,01)). Esta inhibición fue sobrellevada por el agregado exógeno de AA. Además hemos observado que disruptores de la función mitocondrial que inhiben la exportación de AA de la mitocondria, inhiben la síntesis de aldosterona independientemente de la vía de transducción utilizada. Estos Resultados sugieren, por primera vez, que la acción de PTP y la liberación compartimentalizada de AA son pasos comunes en el mecanismo de activación, por diferentes vías de señalización, de la síntesis de esteroides.

0068 (172) ÉSTER DE FORBOL INDUCE TRANSLOCACIÓN SUBCELULAR DE PKC ALFA Y ÉPSILON ESTIMULANDO LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS HIPOFISARIAS TUMORALES GH3B6. J P Petiti¹, S Gutiérrez¹, C M Palmeri¹, J H Mukdsi¹, A L De Paul¹, A I Torres¹

¹Centro de Microscopía Electrónica, Fac. de Cs Médicas, Universidad Nacional de Córdoba <juanpetiti@yahoo.com.ar>

La familia de la proteína quinasa C (PKC) constituida por 10 isoformas participa en diferentes procesos tales como proliferación, diferenciación y muerte celular. Las funciones de las PKC dependen del tipo celular, de la isoforma y de su localización intracelular. Nuestro objetivo fue establecer la relación entre la activación y translocación subcelular de PKC alfa y épsilon con la proliferación de células hipofisarias tumorales somatolactotrófica GH3B6 estimuladas con éster de forbol (PMA). Cultivos de la línea GH3B6 se incubaron con PMA (400 nM) por 15min, 3, 5 y 8h. Se cuantificó la proliferación celular por inmunomarcación para BrdU. Para analizar la activación de PKC alfa y epsilon por PMA se determinó la expresión de ambas isoformas en fracción de membrana y citosol por western blot. La identificación a nivel subcelular de PKC alfa y épsilon se realizó mediante inmunocitoquímica por microscopía electrónica. Test estadístico: ANOVA-Fisher. La proliferación de células GH3B6 incrementó un 146% (p<0.001) luego del tratamiento con PMA por 15min con respecto al control, mientras que la exposición prolongada por 3, 5 y 8h disminuyó el porcentaje de células (p<0.001). La estimulación con PMA durante 15 min, activó PKC alfa y épsilon, detectándose una mayor expresión en la fracción de membrana. A nivel de microscopía electrónica, el tratamiento con PMA por 15min indujo una significativa translocación de PKC alfa y epsilon a la membrana plasmática lo cual ha sido correlacionada con la activación de ERK1/2 e inducción de la proliferación celular. Además, PMA promovió la redistribución de ambas isoformas a la membrana nuclear, lo que se asociaría con la fosforilación de laminina B, proteína fundamental en el desensamble de la envoltura nuclear durante el ciclo celular. Los Resultados obtenidos demuestran que la activación de la PKC alfa y epsilon y su translocación subcelular

inducida por PMA regula la proliferación de células hipofisarias tumorales GH3B6.

ENDOCRINOLOGIA 02

0069 (357) FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA E INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN HÍGADO DE RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS POR ESTREPTOZOTOCINA. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INSULINA. P I Ingaramo¹, M T Ronco¹, D E Francés¹, J A Monti¹, G B Pisani¹, M P Ceballos¹, M C Carrillo¹, C E Carnovale¹

¹Instituto de Fisiología Experimental <paolaingar@gmail.com>

En diabetes mellitus se ha observado un aumento plasmático del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), capaz de inducir apoptosis. No existen estudios sobre la producción y efectos hepáticos de esta citoquina en el estado diabético. En el presente trabajo evaluamos el nivel de TNF α , TNF-R1, la consecuente activación de la apoptosis vía receptores de muerte en el hígado de ratas diabéticas y los efectos del tratamiento con insulina. Ratas Wistar macho adultas se dividieron en 3 grupos (n=4 c/u): control (C), diabético (D) y diabético tratado con insulina (D+I). La diabetes se indujo con estreptozotocina (SZ) 60mg/kg p.c., inyección única i.p.. A C se le inyectó i.p. *buffer* citrato de sodio. 15 días post-SZ, a D se le inyectó vía subcutánea Insulina (30 UI/kg p.c. por día durante 15 días) (D+I). 30 días post-inyección de SZ, fueron sacrificados. Sangre e hígado fueron extraídos y procesados para las determinaciones de TNF α , TNF-R1, Caspasa 8 (p20), Bid-t e índice de apoptosis. Por western blot, expresado como porcentaje del control (C 100%) se determinaron: Expresión de TNF α en lisado hepático: D: 249,9 \pm 112,3 *; D+I: 94,1 \pm 34,6†. Expresión de TNF-R1 en membrana plasmática hepática: D: 203,2 \pm 11,9 *; D+I: 47,8 \pm 10,9 *†. Expresión de Bid-t en fracción mitocondrial: D: 371,8 \pm 42,8*; D+I: 176,1 \pm 0,4†. Por TUNEL se determinó el índice de apoptosis (%x10²): C: 1,08 \pm 0,22 D: 2,70 \pm 0,49 *; D+I: 1,15 \pm 0,14†. (*p<0,05 vs. C; †p<0,05 vs D). La expresión de Caspasa 8 activada fue significativamente mayor en D con respecto a C y revertió en D+I. En el estado diabético observamos un aumento de TNF α hepático que induce una mayor expresión del TNF-R1 en la membrana celular y apoptosis por activación de caspasa 8 y Bid-t. El tratamiento con insulina revertió parcialmente la respuesta en el hígado normalizando la producción de TNF α , con una disminución parcial de Bid-t e inhibición de la apoptosis.

0070 (397) EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL ARNM DE INGAP INSULAR SOBRE LA SECRECIÓN DE INSULINA IN VITRO. M A Raschia¹, H Del Zotto¹, V Madrid¹, J J Gagliardino¹, L E Flores¹

¹Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA) <agus_raschia@hotmail.com>

Introducción: El INGAP es un factor de crecimiento producido por células pancreáticas (acinares, ductales y células insulares no β). Promueve la neogénesis insular, puede revertir un 50% la diabetes inducida por estreptozotocina en hámsteres y aumenta la secreción de insulina en respuesta a la glucosa. **Objetivos:** Estudiar el efecto de la disminución de la producción de INGAP insular mediante la técnica del ARNi, sobre la secreción de insulina. **Metodologías:** Se cultivaron islotes pancreáticos aislados de hámsteres normales con o sin 10 ug/ml de INGAP-PP (polipéptido derivado del INGAP) y se los transfeció con liposomas vacíos (grupo control) o liposomas que llevaban a) siRNA de INGAP, b) siRNA no inhibitorio marcado con GFP. La eficiencia de la transfección se determinó por microscopía de fluorescencia y el grado de inhibición producido por el siRNA sobre el ARNm de INGAP por PCR tiempo real. El efecto del siRNA de INGAP sobre la secreción de insulina se evaluó incubando islotes con glu-

cosa 3.3 (G3.3) ó 16.7 (G16.7) mM midiendo la insulina liberada al medio por RIA. Resultados: El siRNA incorporado a los islotes produjo una disminución del 35 al 50% del ARNm de INGAP. Los islotes de todos los grupos liberaron insulina en función de la concentración de glucosa en el medio. El siRNA de INGAP disminuyó significativamente la secreción de insulina tanto con G3.3 (10%) como con G16.7 (44%), respecto de la obtenida en islotes control ($p < 0.05$ para ambos casos). Esta disminución fue del 32 y 57 % respectivamente cuando se la comparó con la registrada en islotes cultivados previamente con INGAP-PP ($p < 0.05$ para G3.3 y G16.7). **Conclusiones:** Nuestros Resultados confirman el efecto potenciador del INGAP sobre la secreción de insulina en respuesta a la glucosa y demuestran que el bloqueo del ARNm de INGAP disminuye dicha secreción. Estos Resultados sugieren el papel modulador fisiológico del INGAP sobre la secreción de insulina.

0071 (382) CAMBIOS ADAPTATIVOS MORFOLÓGICOS Y FUNCIONALES FRENTE A LA INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA POR MANIPULACION ALIMENTARIA. B Maiztegui

¹, M I Borelli ¹, H Del Zotto ¹, J J Gagliardino ¹

¹Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA) <barmaiztegui@hotmail.com>

La administración de una dieta rica en fructosa (DRF) a ratas normales induce insulinoresistencia (IR), aumento de la actividad de glucoquinasa (GQ) insular, del metabolismo de glucosa y de la secreción de insulina (SI) en respuesta a la glucosa. **Objetivo:** Estudiar los mecanismos funcionales y morfológicos involucrados en la adaptación de la célula a frente a la IR inducida por DRF. **Metodologías:** Alimentamos ratas Wistar macho durante 21 días sin (C) o con fructosa al 10% (DRF) en el agua de bebida. Previo al sacrificio hicimos una prueba de tolerancia a la glucosa (inyección intraperitoneal de glucosa 1 mg/kg); Al sacrificio medimos glucemia (G), triglicéridemia (TG) e insulinemia (I). Se extrajo el páncreas para: 1. Estudios morfológicos (morfometría y cuantificación de apoptosis) y 2. Aislar islotes pancreáticos (colagenasa) para medir actividad (producción de G-6-P) y expresión proteica (Western blot) de hexoquinasa (HQ) y GQ en homogenado entero y en fracciones subcelulares (citósol y particulada) de islotes C y DRF. Resultados: Las G fueron similares en ambos grupos. Los TG, I, índice HOMA-R y área bajo la curva fueron significativamente mayores en DRF. La actividad y la expresión proteica de GQ medidas en el homogenado y el citósol aumentaron en DRF. El Km de GQ no varió, mientras que la Vmax de la enzima fue mayor en DRF. Las ratas DRF mostraron una disminución de la masa de células y un aumento de su apoptosis. Conclusiones: La administración de DRF durante 21 días induce aumento de TG, IR e hiperinsulinemia con normogluceemia. El aumento de la actividad de GQ y consecuentemente del metabolismo insular de glucosa y de la SI, compensarían el incremento en la demanda de I secundario a la IR a pesar de la disminución de la masa de células, manteniendo la glucometria de ayunas, pero no la postprandial, dentro de límites normales. El fracaso a largo plazo de este mecanismo compensador conduciría al desarrollo de diabetes.

0072 (77) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ANGIOTENSINA-(1-7) EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN Y RESISTENCIA A LA INSULINA. J Giani ¹, M Mayer

², M Muñoz ¹, E Silberman ², C Höcht ², C Taira ², M Gironacci ¹, D Turyn ¹, F Dominici ¹

¹IQUIFIB FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA UBA; ²CÁTEDRA DE FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA UBA <jorgegiani@hotmail.com>

La Angiotensina (Ang)-(1-7) es una hormona heptapeptídica que juega un papel importante como brazo contra-regulador del sistema renina-angiotensina oponiéndose a muchas acciones de la Ang II. Recientemente demostramos que la Ang-(1-7) posee efectos insulino-miméticos ya que estimula la actividad de molé-

culas implicadas en la vía de señalización de insulina (INS). Como objetivo planteamos determinar si la Ang-(1-7) es capaz de mejorar los parámetros metabólicos de ratas alimentadas con dieta rica en fructosa, un modelo de insulinoresistencia. Para ello, 48 ratas Sprague-Dawley se dividieron en 2 grupos, uno recibió dieta estándar y agua de bebida (control: C) y el otro dieta estándar y fructosa (10%P/V) en el agua de bebida (Fructosa: F) durante 45 días. En los últimos 14 días, a la mitad de los animales de cada grupo se les implantó bombas osmóticas subcutáneas con Ang-(1-7) (100ng•Kg⁻¹•min⁻¹) [C-(1-7) y F-(1-7)] y al resto se le realizó una operación simulada (C y F). El tratamiento con Ang-(1-7) (n=12) disminuyó la presión arterial sistólica y normalizó los niveles de INS y triglicéridos en el grupo F. Además, el grupo F mostró una disminución de la capacidad de respuesta a la INS a nivel del receptor de insulina (IR), del sustrato del IR (IRS-1), la enzima Akt y la asociación entre IRS-1 y la enzima fosfatidilinositol-3 quinasa en hígado, músculo esquelético y tejido adiposo. Estas alteraciones fueron revertidas luego del tratamiento crónico con Ang-(1-7). El grupo F mostró un aumento en la fosforilación del residuo serina 307 del IRS-1, reconocido sitio de fosforilación inhibitoria que fue revertido luego del tratamiento con Ang-(1-7). El grupo C-(1-7) no mostró cambios significativos respecto al grupo C. El tratamiento crónico con Ang-(1-7) revierte la hipertensión y la resistencia a la INS asociada a una dieta rica en fructosa. Esta mejoría se acompaña de una restauración de la señalización de INS en los principales tejidos blanco de esta hormona.

0073 (55) PRUEBAS DE TOLERANCIA ENDOVENOSA A LA GLUCOSA PATOLÓGICAS - SU RECUPERACIÓN CON ACETIL-L-CARNITINA Y NICOTINAMIDA. J C Cresto ¹, I

Fernandez ², M Tonietti ², I Bergada ¹, G A Passicot ¹, A Trabucchi ³, S Valdez ³, M D C Camberos ¹, A Schenone ⁴, M Szlago ⁴, G Fretchel ⁵, M Tellechea ⁵, E Poskus ³, L Trifone ⁶

¹CENTRO DE INVESTIGACIONES ENDOCRINOLÓGICAS (CEDIE); ²SERVICIO DE DIABETES, HTAL. DE NIÑOS "R. GUTIERREZ"; ³INMUNOLOGÍA, (IDEHU-CONICET), FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, UBA; ⁴FUNDACIÓN DE LAS ENFERMEDADES NEUROMETABÓLICAS (FESEN); ⁵CÁTEDRA DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, HTAL. DE CLÍNICAS, UBA; ⁶DIABETES, HTAL. DE NIÑOS "R. GUTIERREZ" <jcrest@cedie.org.ar>

Nosotros demostramos en un trabajo experimental (Pancreas 33: 403-411, 2006) que el tratamiento con acetil-L-carnitina (50 mg/Kg/día) asociado a nicotinamida (25 mg/Kg/día) era capaz de remitir la diabetes autoinmune del ratón inducida por múltiples subdosis de estreptozocina. Esta respuesta se obtenía luego de que la agresión inmune estaba en desarrollo. Esta conducta terapéutica era completamente atóxica. Selección de pacientes - Los niños se seleccionaron para su estudio con el dosaje de L-carnitina, anticuerpos, HLA y PTEVG **Metodologías** - Se estudiaron aquellos niños con valores bajos de L-carnitina y/o anticuerpos positivos. Se les efectuó una PTEVG y se aceptó como patológicos: Primer Pico <49 µU insulina; pendiente $K_s < 1.40$ y $\log_{10}(\text{área ins}) \times K_s < 15$. Pacientes tratados - Luego del estudio de 54 niños, 5 tuvieron PTEVG patológicas. En su evolución 3 de ellos tuvieron que ser tratados por el riesgo de diabetes clínica (en 2 de ellos con hiperglucemia a los 60 min). Estos son los datos más relevantes. BL: L-carnitina 15,6 µmol/l, PP 30 µU/ml, el índice $\log_{10}(\text{área ins}) \times K_s$ 8.4 y Kg 1.34. HP: L-carnitina 32.4 µmol/l, PP 9.53 µU/ml, índice 6.2 y Kg 0.88. La glucemia a los 60 min fue 152 mg%. PVTS: L-carnitina 27.7 µmol/l, PP <2 µU/ml, índice 6.99 y Kg 1.09. La glucemia a los 60 min 169 mg%. Por estas razones se comenzó el tratamiento. Como se ha mencionado, en todos ellos la pendiente fue menor de 1.30, el primer pico estuvo ausente o muy bajo, el área de insulina fue baja o menor a 1000 µU de insulina y el $\log_{10}(\text{área ins}) \times K_s$ fué menor de 10. El período de tratamiento que informamos varió entre varios años (paciente BL) a algunos meses. En todos se logró normalizar los parámetros metabólicos alterados y en ningún niño se observa-

ron manifestaciones tóxicas o cambios en el crecimiento y desarrollo. **Conclusión** - el tratamiento remitió las alteraciones metabólicas de los niños tratados

0074 (367) IDENTIFICACIÓN DE TRES NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DEL RECEPTOR BETA DE HORMONAS TIROIDEAS RESPONSABLES DE LA RESISTENCIA A HORMONAS TIROIDEAS. M.C. Olcese¹, F.S. Belforte², F. Cassorla³, H. Niepomniszcze⁴, S. Núñez⁴, V.G. Mericq³, R. González-Sarmiento⁵, H.M. Targovnik^{2,5}, C.M. Rivolta^{2,5}

¹Cátedra de Genética y Biología Molecular FFyB; ²Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina; ³Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile; ⁴División Endocrinología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, Argentina; ⁵Unidad de Medicina Molecular, Dpto de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España <escorpiocecily@yahoo.com.ar>

El síndrome de resistencia a hormonas tiroideas (RTH) es un desorden genético con un modo de herencia autosómico dominante caracterizado por una disminución central y periférica a la acción hormonal. RTH está ligado principalmente a mutaciones en el gen del receptor beta de hormonas tiroideas (TR β), encontrándose la mayor parte de éstas en el dominio de unión al ligando (LBD). Pacientes con evidencias clínicas y bioquímicas de RTH han sido estudiados. Con el objeto de identificar mutaciones responsables de esta patología, se aisló ADN genómico a partir de sangre periférica y se amplificaron por PCR los exones 7, 8, 9 y 10 del gen TR β , junto con las regiones intrónicas flanqueantes. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados. Debido a que en todos los casos se identificaron alteraciones puntuales con cambio de sentido no descritas previamente, se determinó mediante un estudio poblacional si las mismas correspondían a polimorfismos o a mutaciones. Se analizaron 150 cromosomas normales por la técnica de Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP). El análisis de secuenciación y la posterior validación por SSCP reveló 1 nueva mutación en el exón 8: c.803C>G; p.A268G y dos nuevas mutaciones en el exón 9: c.1003 G>C; p.A335P, y c.1053C>A; p.D351E. El efecto deletéreo de dichas mutaciones fue evaluado mediante la exploración del grado de conservación evolutiva entre receptores de distintas especies y mediante el análisis de predicción de la estructura proteica secundaria. Dado que RTH se presenta sin signos ni síntomas patognomónicos, el análisis molecular conduce a un diagnóstico certero y a la implementación del tratamiento adecuado en aquellos pacientes sintomáticos para mejorar los signos de hiper o hipotiroidismo. La identificación de nuevas mutaciones en el gen TR β es de gran utilidad para la comprensión de la patofisiología de esta rara enfermedad genética.

0075 (502) CINÉTICA DE LA TRASLOCACIÓN NUCLEAR DE STAT5B EN LINFOCITOS INMORTALIZADOS DE SUJETOS CONTROLES, ESTUDIADA POR INMUNOCITOQUÍMICA. DIMORFISMO SEXUAL EN LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN RESPUESTA A RHGH. M.E. González¹, E. Chaler¹, C. Meazza², K. Laarej², S. Pagani², M.A. Rivarola¹, M. Bozzola², A. Belgorosky¹

¹Servicio de Endocrinología, Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan; ²Policlínico San Mateo. Universidad de Pavia. Pavia, Italia <marigonzalez09@yahoo.com.ar>

Retraso en el crecimiento y bajas concentraciones de IGF-1 con normal incremento de la hormona de crecimiento sérica (GH) definen la condición de insensibilidad a GH. La demora en los mecanismos de traslocación nuclear (TN) podría indicar insensibilidad,

como se ha demostrado en un tipo de resistencia a los glucocorticoides. Cinética de TN de factores de transcripción de los mecanismos de señalización de la GH no ha sido descrita. El objetivo de este trabajo fue estudiar la cinética de TN del factor Stat5b mediante inmunocitoquímica. Linfocitos inmortalizados con EBV de adultos jóvenes sanos (n=15; 7 hombres y 8 mujeres) fueron estimulados con 500 ng/ml de rhGH, por triplicado, a tiempos 0(T0), T15, T30, T45 y T60 (minutos). La inmunocitoquímica fue desarrollada con anticuerpo de ratón anti Stat5b como anticuerpo primario, y CSA K1500 (DAKO). Los núcleos marcados positivamente fueron contados, y los Resultados fueron expresados como veces de incremento del porcentaje de núcleos positivos respecto del basal. Los Resultados, Media \pm SD, de cada tiempo estudiado fueron los siguientes: T15: 1.89 \pm 0.56, T30: 2.47 \pm 0.50, T45: 1.85 \pm 0.44 y T60: 1.42 \pm 0.39, todos diferentes significativamente del basal (p<0.0001). Diferencia entre sexos fue encontrada en el área bajo el pico (veces de incremento x minuto), hombres 56.22 \pm 15.47 vs mujeres 35.02 \pm 8.42 (p<0.009). Concluimos que la inducción de TN de Stat5b, evaluado por inmunocitoquímica, podría ser un test útil en el estudio de alteraciones de los mecanismos de señalización del receptor de GH. Nuestros datos preliminares muestran un dimorfismo sexual en la respuesta a la estimulación con rhGH.

0076 (448) POLIMORFISMOS EN LOS GENES IGFBP3, IGF1 E IGFALS: SU RELACIÓN CON LOS NIVELES CIRCULANTES DE LOS COMPONENTES DEL COMPLEJO TERNARIO EN NIÑOS NORMALES Y CON TALLA BAJA Y SU UTILIDAD EN EL DIAGNÓSTICO DE LA DEFICIENCIA DE GH (DGH). P.A. Scaglia¹, H. Domené¹, A. Martínez¹, A. Keselman¹, V. Pipman², V. Bengolea³, L. Karabatias¹, G. Ropelato¹, M.G. Ballerini¹, J. Heinrich¹, H. Jasper¹

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE, CONICET), División de Endocrinología, Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez"; ²Hospital "Dr. E. Tornú"; ³Hospital "Dr. J.A. Fernández" <pscaglia@cedie.org.ar>

Los niveles circulantes de IGF-I, IGFBP-3 y ALS varían considerablemente en niños normales. Parte de esta variabilidad es consecuencia de variantes polimórficas en los genes que codifican estas proteínas. El objetivo del presente estudio es caracterizar el efecto de polimorfismos en los genes IGF1, IGFBP3 e IGFALS en niños con talla normal o baja sobre los niveles de sus respectivas proteínas y evaluar si estas determinaciones pueden mejorar el diagnóstico de la DGH. Se estudiaron 187 niños de talla normal (N; 4.9-16.6 años), 87 niños con talla baja idiopática (TBI; 3.3-17.5 años) y 25 niños DGH (3.1-17.6 años). Los niveles de IGF-I (RIA), IGFBP-3 (IRMA) y ALS (RIA) se expresan en SDS. Se estudiaron un microsatélite (PCR1) y un SNP (rs6220) en el gen IGF1, dos SNPs (-202 A/C y -185 C/T) en el gen IGFBP3 y 6 SNPs en el gen IGFALS. Los SNPs se determinaron por RFLP o secuenciación y el microsatélite por PCR con un primer fluorescente, seguida de electroforesis capilar. Análisis estadístico: ANOVA (A), test de Tukey, tendencia lineal (TL) y curvas ROC. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de IGF-I y ALS con los polimorfismos de sus respectivos genes. Los niveles de IGFBP-3 (SDS) variaron entre los distintos genotipos del polimorfismo -202 en niños N [AA: 0.34 \pm 0.16 (X \pm SEM), AC: 0.13 \pm 0.11, CC: -0.30 \pm 0.11; A: p=0.0032; AA>CC, p<0.05; AC>CC, p<0.05; LT: p=0.0036] y en niños con TBI (AA: 0.02 \pm 0.30, AC: -0.85 \pm 0.17, CC: -1.23 \pm 0.22; A: p=0.0037; AA>CC, p<0.01, AA>AC, p<0.05; LT: p=0.0037). La eficiencia diagnóstica (ED) de IGFBP-3 para el diagnóstico de DGH [ROC, valor de corte (VC) -1.69 SDS] fue de 80.4%, sensibilidad (S) 83.9% y especificidad (E) 68.0%. El uso de VC genotipo-específico (-1.27, -1.73 y -2.56 SDS para AA, AC y CC), mejora ED y S a 84.8% y 89.7% respectivamente. Los niveles de IGFBP-3 varían con los diferentes genotipos del polimorfismo -202 en niños N y con TBI y su determinación mejora el diagnóstico diferencial de la talla baja.

ENDOCRINOLOGIA 03

0077 (416) DIETA RICA EN FRUCTOSA, METABOLISMO LIPÍDICO Y ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TEJIDO ADIPOSITIVO ABDOMINAL. M E García¹, A Giovambattista², A Alzamendi², E Spinedi², A Raschia¹, C Marra³, O Rebolledo¹, J J Gagliardino¹

¹Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA); ²Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICPBA); ³INIBIOLP (UNLP-CONICET) <megmuabro@gmail.com>

Introducción: la dieta rica en fructosa (DRF) induce insulinoresistencia (IR) y aumento del estrés oxidativo (EO) en tejido adiposo abdominal (TAA) de ratas normales. Objetivo: evaluar metabolismo lipídico y EO en TAA de ratas alimentadas con DRF. Metodologías: alimentamos ratas Wistar macho (3 semanas) con dieta comercial sin (C) y con fructosa al 10% en agua de bebida (DRF). Medimos: en sangre: glucosa (G), triglicéridos (TG), insulina (I) y leptina (L); en TAA composición (HPLC) y liberación in vitro de ácidos grasos (AG), contenido de TBARS y en adipocitos aislados (Ad) actividad de NADPH oxidasa y el efecto de diferentes concentraciones de insulina (0.1 a 10 nM). Resultados: (DRF vs. C) en ratas DRF aumentaron significativamente los TG (1.9 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.1 g/l; p<0.025) y la L (6.3 ± 0.6 vs. 3.4 ± 0.5 ng/ml; p<0.05), pero no la G e I. En TAA de ratas DRF aumentaron los TBARS (379 ± 32 vs. 243 ± 12; p<0.005), la liberación de AG in vitro (0.8 ± 0.08 vs. 0.5 ± 0.07 mg FFA/g TAA; p<0.02) y la proporción de AG saturados (71.0 ± 1.1 vs. 50.9 ± 1.0; p<0.001) y disminuyó la de AG poliinsaturados (30.7 ± 1.1 vs. 56.1 ± 2.0; p<0.001). El ARNm (qRT-PCR) de L en TAA aumentó 70% en ratas DRF y disminuyó significativamente el de IRS-1 (8%) e IRS-2 (21%) (p<0.05). En Ad aislados de DRF la actividad de NADPH oxidasa aumentó (0.45 ± 0.03 vs. 0.25 ± 0.01; p<0.001). El DPI, inhibidor específico de NADPH oxidasa, redujo su actividad marcadamente en ambos grupos (38-60%). Ad incubados liberaron más L (0.36 ± 0.02 vs. 0.22 ± 0.01 ng/ml; p<0.05). Su respuesta a la insulina disminuyó significativamente (p<0.05). Conclusión: la DRF induce hipertrigliceridemia/ hiperleptinemia y cambios en 4 subsectores del TAA: a) Disminución de la sensibilidad a la insulina; b) Aumento del Estrés oxidativo; c) Dismetabolismo lipídico y d) aumento de liberación de L. El aumento del EO desencadenaría la disfunción endocrino-metabólica del TAA y probablemente la de otros órganos como el páncreas endocrino.

0078 (402) PROTEÍNA ASOCIADA A LA NEOGÉNESIS INSULAR (INGAP): SU PAPEL EN EL DESARROLLO DE CÉLULAS DE EMBRIONES DE 19 DÍAS PROVENIENTES DE RATAS-MADRE ALIMENTADAS CON DIETA RICA EN SACAROSA. V G Madrid¹, H Del Zotto¹, J J Gagliardino¹

¹Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada <vivianamadrid@hotmail.com>

Introducción: El INGAP desempeña un papel importante en el control de la neogénesis insular, promoviendo la diferenciación de células precursoras (PDX+/INGAP+) en animales con insulinoresistencia (IR). Objetivo: Verificar el papel del INGAP en embriones (19 días de gestación), de madres alimentadas con dieta rica en sacarosa. Metodología: utilizamos ratas Wistar hembra normales alimentadas durante 19 días de su gestación con dieta comercial estándar sin (C) o con el agregado de sacarosa al 10% en el agua de bebida (DRS). Se determinaron glucemia e insulinemia, índice HOMA-R y HOMA función- β . Se sacrificaron las madres y se extrajeron los embriones para aislar los páncreas, determinar su peso y realizar estudios morfológicos. Resultados: (DRS vs. C), en las madres: glucemias significativamente mayores (131 ± 21 vs. 122,67 ± 23,6 mg/dl), sin cambios significativos en las insulinemias (1,29 ± 0,2 vs. 1,13 ± 0,58 ng/ml), en HOMA-R (10,22 ± 0,5 vs. 8,19 ± 3,7 μ U.mmol) y en HOMA función- β (88,3 ± 31,91 vs. 85,6 ± 34,97 μ U/mmol). En los fetos: aumento signifi-

cativo en la masa celular \hat{a} (0,40 ± 0,1 vs. 0,13 ± 0,1 mg), la masa de células INGAP+ (0,32 ± 0,14 vs. 0,09 ± 0,12mg), el número de células PDX+ (153,7 ± 125,4 vs. 24,8 ± 21,8/mm²) y el porcentaje de células que coexpresan PDX e INGAP (7,49 ± 2,7 vs. 0,54 ± 1,2%); sin cambios significativos en el peso de los páncreas (5,8 ± 0,4 vs. 5,6 ± 1,6 mg) y masa de células Citoqueratina 19+ (0,40 ± 0,26 vs. 0,34 ± 0,10 mg). Conclusiones: La IR inducida por DRS en ratas normales durante la gestación, produjo en las madres hiperglucemia sin cambios en insulinemia ni en masa celular \hat{a} ; en los fetos: aumentó la masa celular \hat{a} , la masa de células INGAP+ y el porcentaje de células PDX/INGAP+. Estos datos sugieren que el INGAP participaría en el mecanismo de neogénesis insular compensadora del islote embrionario en respuesta a la hiperglucemia materna.

0079 (75) ¿PUEDE EL BISFENOL A (BPA) ALTERAR LA CONDUCTA SEXUAL? EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN NEONATAL A BPA SOBRE GENES MODULADORES DE LA RESPUESTA SEXUAL EN LA RATA HEMBRA ADULTA. L D Monje¹, J Varayoud¹, M Muñoz deToro¹, E H Luque¹, J G Ramos¹

¹Laboratorio de endocrinología y tumores hormonodependientes. Facultad de bioquímica y cs. Biológicas. Universidad nacional del litoral, santa fe, argentina. <lmonje@fbc.unl.edu.ar>

El BPA es un estabilizante ampliamente utilizado en la industria plástica que presenta actividad hormonal (perturbador endocrino). Previamente observamos que la exposición neonatal a BPA modifica la expresión de genes estrógeno-sensibles en el núcleo hipotalámico anteroventral-periventricular de la rata hembra adulta. En este trabajo investigamos si la exposición neonatal a BPA altera la conducta sexual receptiva y proceptiva de la rata adulta. Además evaluamos la expresión de genes moduladores de esta conducta tales como el receptor de estrógeno alfa (REa) y de progesterona (RP) en el núcleo hipotalámico medial preóptico (MPN). Crías hembra se inyectaron (sc, cada 48hs) con aceite (control), 0.02mg/kg de dietilstilbestrol (DES), 20mg/kg (BPA20) y 0.05mg/kg (BPA05) de BPA desde el día postnatal 1 (DPN1) al DPN7. En DPN80 los animales fueron ovariectomizados (OVX) y 12 días después se les evaluó la conducta sexual receptiva y proceptiva inducida por administración sc de estradiol (E2) y progesterona. Otro lote de hembras OVX recibió implantes conteniendo E2 (1mg/ml), sacrificándose 48 hs después, en el momento en que se verifica el pico de LH inducido por E2. Por inmunohistoquímica se estudió la expresión de REa y RP en MPN, y por western blot se identificaron las isoformas de RP presentes. Las hembras expuestas a DES no presentaron ningún tipo de conducta sexual, mientras que las expuestas a BPA presentaron una conducta proceptiva significativamente menor a las controles (p<0.01). Ambas dosis de BPA disminuyeron los niveles de REa (p<0.05) en el MPN, mientras que el DES aumentó los niveles de RP (p<0.01). En los grupos control y DES se detectó solo la isoforma RP-A, mientras que BPA20 y BPA05 presentaron las isoformas RP-A y RP-B. Nuestros Resultados indican que la exposición neonatal a BPA provoca una alteración permanente, y distinta a la observada con el estrógeno sintético DES, en los mecanismos que regulan el comportamiento sexual de la rata hembra adulta.

0080 (366) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE LEPTINA EN EL EJE HIPOTÁLAMO-ADENOhipófisis DURANTE EL PROCESO OVULATORIO DE LA RATA. M P Di Yorio¹, M G Bilbao¹, A G Faletti¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET <paula_diyorio@yahoo.com.ar>

La leptina, proteína principalmente producida por el tejido adiposo, es capaz de modular la función reproductiva. Esta proteína ejerce su función a través de la interacción con sus receptores

(Ob-R). Ambas isoformas, larga (Ob-Rb) y cortas (Ob-Rs) se encuentran presentes a lo largo de todo el eje reproductivo. En trabajos previos demostramos que leptina produce efectos bifásicos sobre la función ovárica y es capaz de regular en forma diferencial la expresión de sus receptores en el eje hipotálamo (H)-adenohipófisis (A)-ovario (O). En este trabajo estudiamos la acción del estradiol (E_2) y del neuropéptido Y (NPY) sobre la expresión de ambas isoformas del Ob-R en el eje HA durante el proceso ovulatorio. Se realizaron cultivos de H y A de ratas inmaduras estimuladas con eCG/hCG, en ausencia (C) o presencia de estos factores (E_2 0.01-1 ng/ml; NPY 0.3-300 ng/ml). Ambas isoformas mostraron un perfil de variación similar dentro del mismo tejido. Por Western Blot se determinó que el contenido de Ob-R en H disminuye a altos niveles de NPY, siendo significativo solo para Ob-Rb (300 ng/ml, 50%, $p < 0.05$). La concentración de LHRH en el medio de incubación, determinada por radioinmunoensayo, mostró un aumento para la misma concentración (C: 11 ± 2 , NPY 300 ng/ml: 32 ± 3 , ambos expresados en pg/H, $p < 0.01$). Por el contrario, en A observamos aumento significativo en la expresión de Ob-Rs a concentraciones intermedias (10 ng/ml, 37%, $p < 0.05$). Por otra parte, en H y A se observó, por RT-PCR, un aumento de la expresión del mensajero de ambas isoformas a altos niveles de E_2 , siendo solo significativo para Ob-Rb (H: 0.5 ng/ml, 38%, $p < 0.05$; A: 0.3 ng/ml, 79%, $p < 0.05$). Estos Resultados revelan que NPY y E_2 son capaces de regular la expresión de Ob-R a lo largo del eje HA durante el proceso ovulatorio. Es probable que estos factores modifiquen la sensibilidad tisular a leptina a través de la modulación del contenido de su receptor.

0081 (78) REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) EN EL HIPOCAMPO. G S Moreno Piovano¹, J Varayoud¹, M Muñoz deToro¹, E H Luque¹, J G Ramos¹

¹Laboratorio de endocrinología y tumores hormonodependientes. Facultad de bioquímica y cs. Biológicas. Universidad nacional del litoral, santa fe, argentina. <Gmoreno@fbcb.unl.edu.ar>

En un trabajo previo demostramos que el período de tiempo que una hembra permanece castrada antes de recibir una terapia estrogénica exógena (menopausia experimental), determina la capacidad de los estrógenos de inducir o no la expresión de BDNF en el hipocampo. El objetivo de este trabajo fue conocer los mecanismos moleculares que determinan este proceso. Ratones hembras adultas ovariectomizadas (OVX) fueron tratadas diariamente por 1 semana con 1.75mcg de estradiol (E_2) luego de 2 semanas (CPE) o de 7 meses de realizada la OVX (LPE). Los controles respectivos se inyectaron con aceite (CPC y LPC), sacrificándose todos los animales a la misma edad cronológica. La actividad transcripcional en el hipocampo de los distintos promotores del gen de BDNF se evaluó por RT-PCR en tiempo real y los niveles de metilación de regiones regulatorias de este gen se analizaron mediante PCR específica de metilación y por análisis combinado de bisulfitación-restricción de ADN. Luego del tratamiento con estradiol los animales que pasaron poco tiempo castrados antes de comenzar su terapia estrogénica (CPE) mostraron un aumento en la actividad de los promotores 2, 4 y 5 ($P < 0.001$) del gen de BDNF, mientras que en los ratones LPE sólo el promotor 2 presentó un leve incremento ($P < 0.05$). Al estudiar los niveles de metilación de secuencias regulatorias del gen de BDNF en los distintos grupos experimentales, se observó que los animales LPE presentaban mayores niveles de metilación en una isla CpG ubicada entre -140 y -60 pb del promotor 5 ($p < 0.01$) y en el sitio regulatorio CRE ubicado a -37pb en el promotor 4 ($p < 0.05$). Estos Resultados indican que el tiempo que un animal pasa privado de sus hormonas ováricas (menopausia experimental) es crítico para lograr un efecto neurotrófico por parte de una terapia hormonal de reemplazo basada en estrógenos exógenos. Estos eventos se deberían, al menos en parte, a modificaciones epigenéticas del gen BDNF.

0082 (109) EL 17BETA-ESTRADIOL Y LA PROLACTINA INHIBEN LA VÍA DEL ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS EN CULTIVO. J P Cabilla¹, S A Ronchetti¹, S I Nudler¹, E A Miler¹, F A Quinteros¹, B H Duvilanski¹

¹IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires <jcabilla@ffyb.uba.ar>

Previamente se reportó que el GnRH hipotalámico estimula la actividad de la óxido nítrico (NO) sintasa-1 (NOS-1) de adenohipófisis (ADH) y que el estradiol (E_2) al inhibir su liberación indirectamente inhibe a la NOS-1. Resultados de nuestro laboratorio muestran que el tratamiento *in vivo* e *in vitro* con E_2 modifica la expresión y disminuye la actividad de la guanilil ciclasa soluble, receptor del NO. Además, demostramos la exposición al NO inhibe la liberación de PRL desde la ADH y el E_2 modifica la sensibilidad de la glándula a este efecto inhibitorio. **Objetivos:** Examinar, en cultivos celulares de ADH, si el E_2 es capaz afectar la expresión de RNAm de la NOS-1 y la producción de NO; y evaluar si la PRL, cuya liberación es estimulada por E_2 , puede reproducir las acciones del E_2 . Se utilizaron ADH de animales ovariectomizados por 14 días (OVX) pues tienen la expresión y la actividad de la NOS-1 aumentadas. Se cuantificó el RNAm por PCR semicuantitativa y la producción de NO (como nitritos) por el método de Griess-reductasa. El tratamiento con E_2 (1 nM) disminuyó los niveles de RNAm de NOS-1 (unidades relativas como porcentaje de control (C) respectivo [UR, % del C]: E_2 24 h: 74.04; E_2 48 h: 80.28) y la actividad ($[NO_2^-]$ iM; 24 h, C: 53.5; E_2 : 54.7; 48 h, C: 55.3, E_2 : 43.9*; 72 h, C: 60.2; E_2 : 12.1**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs respectivo C). Asimismo, el tratamiento con PRL (0.5 ig/ml) redujo la expresión del RNAm de NOS-1 (UR, % del C: 24 h: 33.65, 48 h: 50.6, 72 h: 50.37) y la actividad ($[NO_2^-]$ iM; 24 h, C: 23.68; PRL: 10.52*; 48 h, C: 48.24; PRL: 19.3*; C: 62.28, PRL: 17.9*, * $p < 0.05$). **Conclusiones:** el E_2 ejercería un efecto directo sobre las células de ADH disminuyendo la expresión de NOS-1 y la producción de NO en forma tiempo-dependiente. La PRL reprodujo el efecto del E_2 . Teniendo en cuenta que el E_2 estimula la liberación de PRL, es posible que esta hormona esté actuando como mediadora del efecto del E_2 en la retroalimentación negativa sobre la vía del NO.

0083 (120) EL PESTICIDA ENDOSULFÁN IMITA LOS EFECTOS DE UNA DOSIS SUB-UTEROTRÓFICA DE 17-B ESTRADIOL. J Varayoud¹, L Monje¹, T Bernhardt¹, M Muñoz deToro¹, E H Luque¹, J G Ramos¹

¹Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina <varayoud@fbcb.unl.edu.ar>

El endosulfán es un pesticida organoclorado de uso masivo en nuestro país. Algunos estudios sugieren que el endosulfán puede tener actividad estrogénica *in vitro*, sin embargo su actividad hormonal *in vivo* es poco conocida. Para conocer si el endosulfán afecta la expresión de genes estrógeno-sensibles, ratas hembras adultas fueron ovariectomizadas (OVX) y 14 días después fueron inyectadas diariamente (vía sc) durante 3 días con: 1) aceite de maíz (controles), 2) 17-b estradiol (E_2) utilizando una dosis uterotrófica (UE: 0.02 mg/kg/day) o una no-uterotrófica (NUE: 0.002 mg/kg/day), 3) diferentes dosis de endosulfán: 0.006, 0.06, 0.6 and 6 mg/kg/day. A las 24 hs de la última inyección los cuernos uterinos fueron disecados y pesados (ensayo uterotrófico clásico), siendo posteriormente procesados hasta su inclusión en parafina. Por análisis de imágenes digitalizadas se determinó la altura promedio del epitelio luminal uterino y por inmunohistoquímica se cuantificó la expresión del receptor de progesterona (PR) y del receptor de estrógeno alfa (ER α). A nivel ARNm, se determinó la expresión de PR, ER α y

factor 3 del complemento (C3) mediante RT-PCR en tiempo real. El aumento del peso uterino y de la altura del epitelio luminal sólo se verificó en los animales tratados con la dosis UE de E2 ($p < 0.05$). Tanto a nivel proteínico como ARNm, el endosulfán produjo cambios en la expresión de los genes estrógeno-dependientes de una manera idéntica a como lo hizo la dosis no-uterotrófica de E2, diferenciándose de este modo del grupo UE ($p < 0.01$) y del control ($p < 0.05$). Estos Resultados indican que el endosulfán presenta actividad estrogénica *in vivo*, aún en bajas dosis consideradas ambientalmente relevantes. En base a estos y otros Resultados resaltamos la necesidad de incorporar un amplio espectro de dosis y adecuados controles positivos para la evaluación *in vivo* de compuestos con actividad hormonal.

0084 (590) CARACTERIZACIÓN DE TUMORES TESTICULARES DE RATONES TRANSGÉNICOS MEDIANTE MICROARREGLOS DE PROTEÍNAS A PARTIR DE MATERIAL MICRODISCADADO DE TEJIDO FIJADO EN PARAFORMALDEHIDO Y EMBEBIDO EN PARAFINA. S Quintana ¹, M Venara ¹, R Rey ¹, C Schott ², K Becker ², H Chemes ¹

¹CEDIE-CONICET, Buenos Aires, PIP 5479; ²Instituto de Patología, Universidad Técnica de Munich, Munich, Alemania <squintana@cedie.org.ar>

Debido a las modificaciones que produce en su estructura macromolecular, la fijación con aldehídos dificulta la extracción y estudio de expresión de proteínas. Nuestro objetivo fue extraer proteínas inmunoreactivas de tumores testiculares de ratones transgénicos fijados en paraformaldehído y embebidos en parafina para realizar análisis por Western Blot y microarreglos de proteínas. Se comparó la expresión de proteínas asociadas al crecimiento tumoral (EGFR, Ciclina D1, Ciclina D3, AKT, p-AKT, ERK y p-ERK) en extractos de 4 testículos (conteniendo tejido normal y tumoral: TT) con el de microdisecciones de áreas exclusivamente tumorales (TM) provenientes de 7 testículos diferentes. Cortes histológicos de 10 μ m se desparafinaron y las áreas de interés se microdisecaron y transfirieron al buffer de extracción (Kit Qproteome FFPE Tissue). La reactividad de las proteínas extraídas se controló con un Western Blot de beta-actina. Los extractos se aplicaron por triplicado a portaobjetos revestidos con nitrocelulosa, se detectaron con anticuerpos específicos y los niveles de expresión se calcularon densitométricamente normalizando a las proteínas totales. La expresión de AKT, p-AKT, ERK y p-ERK fue mayor en TM que en TT (1,73 \pm 0,61 vs. 0,95 \pm 0,28; 1,70 \pm 0,55 vs. 0,43 \pm 0,12; 1,47 \pm 0,52 vs. 0,69 \pm 0,29 y 3,72 \pm 1,43 vs. 0,96 \pm 0,32, $p < 0,01$). Similares Resultados se obtuvieron con EGFR y Ciclina D3 (TM: 1,17 \pm 0,37; 1,18 \pm 0,47; TT: 0,36 \pm 0,13; 0,35 \pm 0,11, $p < 0,01$). No hubo diferencias de expresión de Ciclina D1 entre TM y TT. Estos Resultados indican que es posible estudiar la expresión de proteínas mediante Western Blot y microarreglos de proteínas a partir de microdisecciones de material fijado en paraformaldehído y embebido en parafina. Los mayores niveles de expresión observados en áreas enriquecidas en tejido tumoral (TM) confirman una activación significativa de las vías vinculadas a la proliferación celular en los tejidos tumorales.

ENDOCRINOLOGIA 04

0085 (344) NIVELES DE TELOPÉPTIDO CARBOXILO TERMINAL DEL COLÁGENO TIPO I (CTX) EN SALIVA HUMANA EN FUNCIÓN DEL ESTADO ESTROGÉNICO, RITMO DIARIO Y ESTACIONAL. G G Pellegrini ^{1,2}, M M S Gonzales Chaves ^{1,2,3}, J Somoza ¹, S M Friedman ², S N Zeni ^{1,2,3}

¹Sección de Osteopatías Médicas Htal de Clínicas UBA; ²Cátedra de Bioquímica general y Bucal FOUBA; ³CONICET <gretelitak@hotmail.com>

Previamente determinamos CTX en saliva humana y observamos experimentalmente que sus niveles en saliva responden de

la misma manera que el suero frente a diferentes condiciones de remodelamiento óseo: normal, aumentado o disminuido. En el presente estudio clínico evaluamos si el CTX en saliva, como ocurre con las muestras séricas y/o urinarias, presenta: niveles diferentes en mujeres pre y postmenopausicas, ritmo circadiano y estacional. Se estudiaron los niveles de CTX en 40 mujeres sanas (20 pre y 20 postmenopausicas) que habitaban el sur de nuestro país (Cro Rivadavia, Chubut). Se recolectó sangre, orina y saliva al final del verano y al final del invierno. La sangre en tres horarios diferentes teniendo en cuenta el ritmo circadiano y la orina y saliva en intervalos de 4 hs. durante las 24hs. Se evaluó CTX (Biodiagnostic, Denark), 25hidroxivitamina D en suero (25OHD) (Diasorin) y otras determinaciones relacionadas al metabolismo óseo y mineral. Resultados: tanto al final del invierno como al final del verano los niveles de CTX en saliva y suero fueron significativamente mayores en post que premenopausicas (Prem.vs Postmen.: al final del verano: CTX saliva [ng/l]: 46.2 \pm 10.6 vs. 56.6 \pm 16.1); CTX sérico [ng/L]: 217.8 \pm 77.1 vs. 309.6 \pm 115.6, respectivamente; al final del invierno: CTX en saliva: 52,5 \pm 14,3 vs 65,8 \pm 22,3 y CTX sérico: 223,1 \pm 69,2 vs. 311,5 \pm 122,9, respectivamente [$p < 0.05$]); presentando cambios estacionales relacionados a menores niveles de 25OHD al final del invierno. El estudio de 24 hs. muestra la presencia de ritmo circadiano. Conclusiones: El CTX en saliva responde como el suero y orina frente a las condiciones estudiadas sugiriendo su utilidad como muestra alternativa para evaluar remodelamiento óseo y seguimiento terapéutico en situaciones especiales. UBACyT M099.

0086 (67) INCORPORACIÓN DE INSULINA EN MITOCONDRIAS. SU TRANSPORTE. G A Passicot ¹, M D C Camberos ¹, G Cao ², J C Cresto, ¹

¹Centro de investigaciones endocrinológicas (cedie-conicet), hospital de niños r. Gutierrez; ²Servicio de anatomía patológica, hospital de niños P. Elizalde <giselpassicot@cedie.org.ar>

Nosotros demostramos que la enzima degradante de insulina (EDI) se encuentra en la matriz mitocondrial (MM), siendo además la mitocondria sensible a los cambios hormonales. **Objetivos** - Determinar si EDI facilita la incorporación mitocondrial de insulina. **Metodologías** - EDI se obtuvo de músculo de rata por sucesivos pasos cromatográficos. Mitocondrias hepáticas aisladas según Parson, fueron recuperadas e incubadas a 25°C, oxígeno 100%, insulina: 1 ng/tubo y ¹²⁵I-insulina (10⁵ c/m). Se agregó EDI, substratos o inhibidores de acuerdo al experimento. La reacción se detuvo con 1 mM de N-etilmaleimida. La MM se aisló con digitonina y se estudió el transporte de insulina por cromatografía, electroforesis (SDS-PAGE), inmunoblot y autorradiografía. Resultados - La microscopía electrónica demuestra que las mitocondrias obtenidas no presentan alteraciones estructurales. A 25°C la insulina degradada fue: (pg/seg/mg prot), control: 0.87; EDI: 0.88, sugiriendo que se debe a proteasas mitocondriales y no a EDI. La enzima incrementa la incorporación de insulina a MM en forma dosis/dependiente (60 seg -% de incorporación: EDI "0" μ g/t = 1.46%, EDI 1.8 μ t = 2.04%; $P < 0.02$, n:4). El dinitrofenol (1 mM, desacoplante mitocondrial) y la bacitracina (1 mg/ml, competidor de la insulina) disminuyen la incorporación de EDI, 50 μ M de vanadato (inhibidor de ATPasas y fosfatasa) y 5 mM de succinato + ADP (substratos de la respiración celular) no lo modifican, la apirasa (que degrada ATP) la disminuye. Los perfiles cromatográficos de los mitoplastos demostraron que EDI forma un complejo con los transportadores mitocondriales. Al ser disociado se libera la insulina transportada. **Conclusiones** - 1) EDI transporta la insulina a través de los transportadores específicos (TOM y TIM) que utiliza la enzima para su incorporación mitocondrial. 2) La insulina es transportada dentro de EDI. 3) El transporte mitocondrial de insulina por EDI es activo.

0087 (391) EFECTO DE UN INHIBIDOR DE DIPEPTIDIL PEPTIDASA 4 (DPP-4) SOBRE LA FUNCION INSULAR. B Maiztegui ¹, V Madrid ¹, M A Raschia ¹, E Alzugaray ¹, F

Francini¹, M L Massa¹, L Flores¹, O Rebolledo¹, A Rebolledo¹, V Milesi¹, M I Borelli¹, H Del Zotto¹, J J Gagliardino¹

¹Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA) <barmaiztegui@hotmail.com>

El GLP-1 es responsable en parte del aumento de la secreción de insulina (SI) en respuesta a la ingestión de glucosa (G). Su efecto potenciador sobre la SI disminuye en la diabetes tipo 2. Los inhibidores de la DPP-4 (responsable de la degradación de GLP-1), aumentan la SI y la masa insular, desconociéndose su efecto sobre el metabolismo insular de G. **Objetivo:** Estudiar el efecto de la sitagliptina (S) (inhibidor de DPP-4) y de exendina-4 (análogo de GLP-1) en ratas alimentadas con una dieta estándar sin (C) o con el agregado de fructosa al 10% en el agua de bebida (F), sobre la función insular. **Metodologías:** Ratas Wistar macho alimentadas durante 21 días con dieta C y F se dividieron en 3 subgrupos: no tratado (C y F), tratado con S (CS y FS) y con exendina-4 (E)(CE y FE). Al sacrificio se hizo una prueba de tolerancia oral a la G (1mg/kg); medimos glucemia (Glu), trigliceridemia (TG) e insulinemia (In). Se extrajo el páncreas y se aislaron islotes (colagenasa) para medir SI *in vitro* (G 3, 8 y 16 mM) y el metabolismo de G (producción de CO₂¹⁴ y ³H₂O, G 3 y 16 mM). Resultados: Las Glu de ayunas fueron similares en todos los grupos. En las ratas F aumentaron significativamente los TG, In, índice HOMA-R, índice HOMA- β y área de glucosa bajo la curva; todos estos parámetros se normalizaron con la administración de E y S; la F aumentó significativamente el metabolismo insular de G y la SI frente a G 3, 8 y 16 mM; la administración de S y E normalizó estos valores. Conclusiones: La administración de E y de S a ratas con IR inducida por F, normaliza los triglicéridos, la tolerancia a la G, disminuye la liberación de I y el metabolismo de G insular. Estos Resultados sugieren que ambas drogas normalizan la homeostasis glucémica en ratas F, probablemente mediante un aumento de la sensibilidad a la I.

0088 (408) NEUROGENINA-3: SU CORRELACIÓN CON EL AUMENTO DE MASA β EN HÁMSTERS ADULTOS NORMALES TRATADOS CON INGAP-PP. V G Madrid¹, B Maiztegui¹, E Alzugaray¹, M A Raschia¹, L Flores¹, C Boschero¹, M I Borelli¹, H Del Zotto¹, J J Gagliardino¹

¹Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada <vivianamadrid@hotmail.com>

Introducción: Previamente demostramos que el INGAP juega un papel importante en el control de la neogénesis y función insular en animales con insulinoresistencia. Por otro lado, la neurogenina-3 (Ngn-3), participaría en la neogénesis insular en el embrión y en el adulto. **Objetivo:** estudiar la posible participación de la Ngn-3 en el aumento de la función y la masa β en hamsters adultos normales tratados con INGAP-PP. **Metodología:** Inyectamos durante 10 días INGAP-PP (500 ig/día i.p. c/12 horas) (T) o solución salina (C) a hamsters macho adultos normales. Al sacrificio determinamos: peso corporal, glucemia, trigliceridemia e insulinemia; removimos el páncreas para: análisis morfológico, aislar islotes (colagenasa) para medir contenido de ADN insular, secreción de insulina (RIA) y medir ARNm de PDX-1, INGAP y Ngn-3 (RT-PCR). Resultados: No hubo diferencias significativas (T vs. C) en: peso corporal, glucemia, trigliceridemia e insulinemia. Los hamsters T mostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) en: ARNm insular de Ngn-3 ($108 \pm 0,5$ vs. $100 \pm 1,9$); PDX-1 ($127,1 \pm 0,6$ vs. $100 \pm 3,1$); masa β ($6,6 \pm 0,04$ vs. $4,1 \pm 0,7$ mg), número de islotes/mm² ($2,8 \pm 0,3$ vs. $2,1 \pm 0,2$) y de células b extrainsulares ($2,3 \pm 0,5$ vs. $1,35 \pm 0,3$), porcentaje de islotes en contacto con ductos (77 ± 11 vs. $50 \pm 3,3$ %) e índice de replicación de células β ($3,0 \pm 0,5$ vs. $1,7 \pm 0,3$ %). Hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) en: ARNm insular de INGAP ($8,2 \pm 4,5$ vs. 100 ± 14), tamaño insular (6800 ± 692 vs. 8083 ± 785 m²), contenido de ADN insular ($0,07 \pm 0,002$ vs. $0,1 \pm 0,01$), número de células INGAP+ (130 ± 62 vs. $589 \pm 123/10$ campos) y tasa de apoptosis ($0,27 \pm 0,03$ vs. $0,47 \pm 0,05$ %); la secreción de insulina (glucosa 16,6 mM), aumentó significativamente en animales T ($74,7 \pm 5,3$ vs. $47,7 \pm 2$). Conclusión:

el incremento del ARNm de Ngn-3 registrado en los hamsters T sugiere su participación en el aumento de masa y función de las células b inducida por el INGAP-PP en animales adultos.

0089 (179) EFECTOS DEL LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO (LPS) SOBRE LA ACTIVIDAD Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA-2 Y LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES EN CÉLULAS ADRENALES Y1: POSIBLE ROL DE NFKB. C Martínez Calejman¹, F Astort¹, J M Di Roccio¹, E M Repetto¹, J M Cipelli¹, M Mercou¹, P Arias², O P Pignataro^{3,4}, C B Cymering¹

¹Laboratorio de Endocrinología Molecular, Depto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. CEFYBO-CONICET; ²Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina, UBA; ³IBYME-CONICET; ⁴Depto. de Química Biológica - FCEN - UBA <camilamartinez@hotmail.com>

El aumento en los niveles de glucocorticoides durante el proceso inflamatorio experimental inducido por LPS ha sido atribuido principalmente a sus acciones sobre niveles superiores del eje hipotálamo-hipofísico-adrenal. Sin embargo, existen evidencias de efectos directos ejercidos por el LPS sobre células adrenales. **Objetivos:** Analizar el efecto del LPS sobre la producción de esteroides en células adrenales Y1 y estudiar el mecanismo de recepción/transducción de señales involucrado. Resultados: Esta línea celular murina expresa receptores Toll-like 4 (TL4) (RT-PCR). Células Y1 transfectadas con un plásmido reportero de luciferasa con un elemento de reconocimiento de NF κ B mostraron, tras la estimulación con LPS (10 μ g/ml), un aumento en la actividad de dicha enzima (Control: $0,88 \pm 0,10$; LPS: $2,00 \pm 0,09$; $p < 0,0001$; media \pm SD; test Wilcoxon). Este tratamiento indujo además un aumento en la producción de progesterona; dicho efecto fue reducido por la co-incubación con un inhibidor de la actividad de IKK (IKK-Inh) (Control: $46,3 \pm 2,3$; LPS: $93,0 \pm 7,4$; IKK-Inh: $46,9 \pm 2,7$; LPS + IKK-Inh: $67,0 \pm 4,0$ ng/ml; Control vs LPS $p < 0,001$; LPS vs LPS + IKK-Inh, $p < 0,01$; ANOVA). La expresión de ciclooxigenasa 2 aumentó (COX-2; western blot) tras el tratamiento con LPS. El aumento en los niveles de progesterona inducido por LPS fue inhibido significativamente por indometacina y diclofenac (inhibidores no selectivos) y por parecoxib (inhibidor selectivo de COX-2). Conclusión: Los Resultados indican que el LPS estimula directamente la producción de esteroides por las células adrenales Y1. El receptor de membrana TL4 está presente en dichas células y la incubación de las mismas con LPS resulta en la activación de la vía de NF κ B, y la inducción de genes específicos. Entre éstos, demostramos un aumento en los niveles de expresión de COX-2. Por último, la actividad de esta enzima parece ser relevante para el incremento de la esteroidogénesis inducido en estas células por LPS.

0090 (205) EFECTO DE ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS Y SISTEMAS ANTIOXIDANTES ADRENALES. F Astort^{1,2,3}, E M Repetto⁴, C Martínez Calejman⁴, M E Mercou⁴, J M Cipelli⁴, P Arias⁵, C B Cymering⁴

¹Facultad de medicina; ²cefybo; ³conicet; ⁴facultad de medicina, uba, cefybo, conicet; ⁵departamento de fisiología, facultad de medicina, uba. <F_astort_lem@hotmail.com>

Introducción: La hiperglucemia induce estrés oxidativo en diversos tipos celulares, proceso relacionado con el desarrollo y progresión de las complicaciones asociadas a la diabetes. Previamente hemos demostrado que altas concentraciones de glucosa alteran la esteroidogénesis basal en células adrenales murinas Y1. **Objetivo:** analizar (1) qué etapa(s) de la esteroidogénesis son afectadas por el tratamiento con alta glucosa (AG), (2) la prevención del efecto de la AG por distintos tratamientos antioxidantes. Resultados: La producción de esteroides medida tras el agregado de los precursores pregnenolona y 22-R hidroxicolessterol se vio significativamente inhibida en las células

incubadas con AG (30 mM) durante 7 días (354 +/- 20 vs 274 +/- 22; $p < 0.01$ y 23.3 +/- 1.6 vs 18.8 +/- 0.9; $p < 0.05$, respectivamente). El tratamiento con AG produjo un incremento en los niveles de ARNm de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y hemo oxigenasa 1. La co-incubación con antioxidantes (butil hidroxitolueno, vitamina E) revirtió parcialmente el efecto producido por AG sobre la esteroidogénesis; dicha reversión no se observó tras el agregado de ácido ascórbico o melatonina. **Conclusiones:** Los Resultados obtenidos sugieren que parte del efecto del tratamiento con AG se localiza en un paso posterior a la entrada del colesterol a la mitocondria aunque no se descartan efectos adicionales en etapas anteriores. Los Resultados obtenidos mediante RT-PCR muestran una activación de los sistemas de defensa antioxidante. Postulamos la existencia de una relación causal entre el estrés oxidativo y la alteración de la esteroidogénesis. La diferente potencia antioxidante o propiedades intrínsecas características de los distintos antioxidantes utilizados podrían explicar los Resultados discordantes obtenidos.

0091 (507) ALLOPREGNANOLONA ADMINISTRADA EN GANGLIO MESENTÉRICO SUPERIOR MODIFICA LA ESTEROIDOGENESIS OVÁRICA DE MANERA DIFERENCIAL DE ACUERDO AL ESTADIO DEL CICLO EN LA RATA. A Vega Orozco¹, V Bazzocchini^{1,2}, F Nanfaro¹, F Giuliani¹, S Casas^{1,2}, R Yunes^{1,2}, S Zulema³, R Cabrera^{1,2}

¹LINCE -IMBECU- CONICET-Area de Farmacología-FCM-Universidad Nacional de Cuyo; ²Centro de Investigaciones Superiores-Universidad de Mendoza; ³Lab. Biol. de la Reproducción. Fac. Qca, Bqca. y Farmacia. Univ. Nac. de San Luis <asvega@unsl.edu.ar>

El sistema nervioso periférico juega un rol integrativo junto con el sistema endócrino en la fisiología ovárica. Resultados previos demostraron que Allopregnanolona (Allo) es un modulador de los sistemas que regulan la fisiología reproductiva en la hembra. Los objetivos fueron: evaluar el efecto de Allo en ganglio mesentérico superior (GMS) sobre la liberación de progesterona (P_4) en ovario y si Allo en GMS modifica la actividad y expresión de 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- β -HSD) en ovario de rata en proestro (P) y diestro I (DI). Para este trabajo se utilizó un sistema *ex-vivo* GMS-plexo nervioso ovárico-ovario (GMS-PNO-O). Los grupos de trabajo fueron: a-Control: (KRBG) b- Allo (120 nM) en GMS. Se extrajeron alícuotas del medio ovárico a los 15, 30, 60 y 120 min. P_4 se midió por RIA (ng/mg de prot/ml), la actividad de 3- β -HSD (mU/mg de proteína) por espectrofotometría y la expresión génica por RT-PCR. Los Resultados se expresaron como la media \pm SEM y analizados por "t" test y Anova-I. Se consideró significativo un $p < 0.05$. En P, Allo aumentó la liberación de P_4 a los 30 min. (0.073 \pm 0.023 vs 0.17 \pm 0.018; $p < 0.001$) y 60 min. (0.088 \pm 0.003 vs 0.16 \pm 0.022; $p < 0.01$), con un aumento de la actividad enzimática de 3- β -HSD a los 120 min. (6.35 \pm 0.44 vs 8.1 \pm 0.36; $p < 0.01$) con respecto al grupo control. En DI Allo provocó un aumento de la liberación de P_4 a los 15 min. (0.0278 \pm 0.0059 vs 0.0824 \pm 0.009; $p < 0.005$) y a los 30 min. (0.0388 \pm 0.0016 vs 0.107 \pm 0.014; $p < 0.001$), con un aumento de la actividad de 3- β -HSD a los 120 min. (7.51 \pm 0.24 vs 8.53 \pm 0.33; $p < 0.05$) con respecto al grupo control. En cuanto a la expresión génica de 3- β -HSD solo se observó un aumento significativo en DI ($p < 0.05$) con respecto al control. Concluimos que Allo modifica la actividad esteroidogénica del ovario modulando al plexo nervioso ovárico de manera dependiente del estadio del ciclo estral en la rata hembra, introduciendo un nuevo mecanismo de acción de los neuroesteroides a nivel periférico.

0092 (632) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR TG1019 DE EICOSANOIDES EN LA REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESTEROIDOGENESIS. H G Di Cónsoli¹, M Cooke¹, P Mele¹, C Poderoso¹, R Castilla¹, E J Podestá¹, F Cornejo Maciel¹

¹IIMHNO, Dpto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA. <hdiconsoli@gmail.com>

La regulación hormonal de la esteroidogénesis involucra al ácido araquidónico (AA) y a sus metabolitos, entre ellos al 5-HpETE, producto de la 5-lipoxigenasa. Este metabolito es un regulador de la actividad del promotor de la proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein). Por otro lado, se conoce una proteína de membrana, la TG1019, que une una serie de compuestos derivados del AA. El 5-HpETE es uno de los ligandos de mayor afinidad y respuesta y el ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso de cadena larga, es antagonista de este receptor. El objetivo fue evaluar la participación del receptor TG1019 en la esteroidogénesis. Para ello se usó la línea MA-10 (Leydig de testículo de ratón) en la que se evaluó el efecto del DHA sobre la producción de esteroides (por radioinmunoensayo de progesterona en los medios de cultivo) y la actividad del promotor de StAR (por determinación de la actividad de luciferasa, gen reportero en una construcción dirigida por el promotor en estudio y transfectado en las células con lipofectamina). Mientras el tratamiento de células MA-10 durante 5 hs. con 8Br-AMPC (0,5 mM) incrementó los niveles de progesterona 20 veces con respecto al control ($p < 0,01$), el tratamiento simultáneo con DHA (10 μ M) redujo la esteroidogénesis en un 66% ($p < 0,01$), efecto repetido por estímulo con hCG. Esta inhibición parcial se debe a que el AA per se u otros de sus metabolitos ejercerían efectos independientes de TG1019. En el mismo sentido, la actividad del promotor disminuyó cuando las células se expusieron al DHA, siendo la actividad de luciferasa (en unidades relativas): control: 0,32 \pm 0,09; 8Br-AMPC 1,3 \pm 0,1 ($p < 0,01$ vs. control); DHA: 0,33 \pm 0,07; DHA + 8Br-AMPC: 0,6 \pm 0,1 ($p < 0,01$ vs. 8Br-AMPC). En conclusión, los Resultados indican que la estimulación hormonal de la esteroidogénesis involucraría la activación del receptor TG1019, probablemente por metabolitos lipoxigenados del AA.

ENDOCRINOLOGIA P1

0093 (335) COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON RANELATO DE ESTRONCIO (RASR) A NIVEL ÓSEO Y MINERAL SUMINISTRADO POR DIETA O POR SONDA GÁSTRICA EN AYUNAS. ESTUDIO EXPERIMENTAL. M Gonzales Chaves^{1,2,3}, C Marotte^{1,3}, G Pellegrini^{1,4}, A Pighin⁵, M C de Landeta⁵, P Mandalunis⁶, S Zeni^{1,3,4}

¹Sección de Osteopatías Médicas Hospital de Clínicas José de San Martín; ²Cat. Bioquímica Gral. y Bucal, Facultad de Odontología - UBA; ³CONICET; ⁴Cat. Bioquímica Gral. y Bucal, Fac. Odontología UBA; ⁵Cat. Ciencias Básicas. Dpto de Analítica. Universidad Nacional de Luján; ⁶Cat. de Histología. Fac. Odontología UBA <macagch@yahoo.com.ar>

El RaSr se utiliza para tratar osteoporosis. Previamente, usando un modelo de osteopenia establecida y deficiencia de vitamina D (D) observamos que suministrado por dieta no estimulaba la formación de nuevo hueso. Como clínicamente se administra en ayunas, nuestro objetivo fue comparar los efectos sobre marcadores de formación y masa ósea en dicho modelo experimental suministrando el RaSr (900mg/kg/d) por sonda gástrica (sg) en ayunas o por dieta. A T=0, se ovariectomizaron (OVX) 30 ratas que no recibieron tratamiento durante 60 días para obtener osteopenia además recibieron durante los últimos 45 días una dieta que no aportaba D para lograr deficiencia. A T=60 durante 45 días adicionales (T=105) se alimentaron con una dieta con 200UI% D y se dividieron en grupos (n=10) según tratamiento: G2:Vh; G3:RaSr por dieta; G4:RaSr por sonda. Como control con dieta normal se analizó un grupo (n=10) SHAM (G1). A T=0, 60 y 105 días se midió densidad mineral en tibia (DMO), contenido mineral óseo de esqueleto total (CMO) por DXA y calculó cam-

bios (D) entre T=105 y T=60. Se evaluó FAO (colorimetría) y osteocalcina (OC) (ELISA) a distintos tiempos y a T=105 se analizó contenido de Sr en tibia por absorción atómica y volumen óseo total (VO) de tibia distal por histomorfometría. Resultados ($\bar{X} \pm \text{DS}$): Letras distintas $p < 0.05$.

	G1	G2	G3	G4
Sr tibia (ppm)	5.6±0.4 a	9.6±0.8 a	479.0±154.0 b	359.0±42.0 b
OC(ng/dl) T=105	108±25 a	132±30 b	91.3±22 a	97.6±25.7 a
DCMO(T105-T60)	-0.68±0.27 a	0.17±0.02 a	0.78±0.07 b	2.30±0.05 c
DDMO(T105-T60)	-3.0±0.3 a	3.0±1.0 b	19.5±5.3 c	13.2±3.9 c
VO (%)	35.5±9.4 a	1.76±1.0 b	3.8±1.8 c	4.5±1.6 c

G3 y G4 no presentaron diferencias en: contenido de Sr en tibia, OC, DDMO y VO. DCMO fue menor en G3 vs. G4. El VO fue menor y DCMO y DDMO fue mayor en G3 y G4 vs.G1. Conclusiones: la forma de tratamiento no produjo modificaciones significativas en el marcador de mineralización ósea, sin embargo el CMO fue mayor por dieta posiblemente por la tendencia a mayor contenido de Sr en tibia. PIP 6483

0094 (95) EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA NEONATAL CON EL GEN DE TIMULINA SOBRE LA POBLACIÓN CORTICOTROPA EN RATONES ATÍMICOS. E V Martines

¹ P Reggiani ^{2,3}, C Ferese ⁴, R Goya ³, G Cónsole ^{2,4}

¹Universidad Adventista del Plata; ²Cátedra B de Citología, Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP; ³INIBIOLP-CONICET; ⁴CICPBA <evmartines@hotmail.com>

Introducción: Se han comunicado alteraciones del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en ratones atímicos. El defecto tímico congénito causó una menor respuesta pituitaria a estímulos hipotalámicos y un descenso significativo de la ACTH pituitaria en ratones Swiss nude sometidos a estrés. En ratones atímicos se halló un marcado descenso de la secreción de corticosterona con estímulo de serotonina en células adrenocorticales, aunque la corteza adrenal mantendría su respuesta ante la ACTH. **Objetivo:** Implementar una terapia génica neonatal mediante un vector adenoviral RAD-FTS en ratones inmunodeficientes (nude) con el fin de prevenir cambios en la población corticotropa pituitaria. **Materiales y Metodologías:** Se utilizaron ratones nude hembras (H) y machos (M) homocigotas (nu/nu) y heterocigotas (nu/+). El día 1 postnatal cada ratón recibió una única inyección bilateral i.m. de 10^9 unidades formadoras de placa (pfu) de RAD-FTS o de un vector control (RAD-GFP). En el día 51 postnatal fueron sacrificados. Se midió timulina sérica. Las pituitarias se inmunomarcaron con un sistema anti-ACTH-EnVision. La densidad de volumen ($\text{DV} \times 10^{-2}$), densidad celular ($\text{DC} \times 10^{-4}$) y tamaño celular (TCum^2) se registraron mediante un analizador de imágenes. Resultados: La terapia génica con timulina neonatal previno el descenso de la población corticotropa. Se registró aumento significativo ($p < 0.01$) en TC y DC de RAD-FTS vs controles, en hembras y machos: TC: M: 57.9 ± 7.1 vs 43.6 ± 5.2 y H: 57.7 ± 7.5 vs 47.1 ± 6.2 ; DC: M: 4.9 ± 0.9 vs 2.5 ± 0.3 y H: 4.1 ± 0.5 vs 2.1 ± 0.6 . Hubo ascenso significativo ($p < 0.01$) en los niveles de timulina sérica (fg/ml) en nude RAD-FTS vs controles (H: 282 ± 42 vs 39 ± 8 y M: 288 ± 39 vs 33 ± 6). **Conclusión:** La terapia con el gen de timulina previno el descenso de la población corticotropa pituitaria y el déficit de timulina sérica en el ratón nude adulto, pudiendo inferirse un importante rol de la timulina en el eje timo-corticotropo.

0095 (114) EVOLUCIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS Y MARCADORES NUTRICIONALES EN EL PACIENTE EN HEMODIALISIS. C M Meilillo ^{1,2}, M O Suescun ^{1,3}

¹Cátedra de Endocrinología, Fac Cs Exactas UNLP; ²Instituto Médico Mater Dei La Plata.; ³Instituto Multidisciplinario de Biología Celular IMBICE La Plata <cmelillo@biol.unlp.edu.ar>

La Insuficiencia Renal Crónica (IRC) en estadio terminal se acompaña de profundos cambios endocrinos, metabólicos y

nutricionales. Las hormonas tiroideas se modifican como consecuencia de la patología y del tratamiento sustitutivo. La albúmina sérica, predictor de morbo-mortalidad en el enfermo renal, y el colesterol total representan y evalúan el estado nutricional de estos pacientes. Previamente observamos el eje Hipotálamo-Hipofiso-tiroideo y describimos un descenso marcado de Triiodotironina (T3), Tiroxina total y libre (T4T y T4L) y un leve aumento de Tirotrófina (TSH) con respecto a los individuos controles. El objetivo de este trabajo fue estudiar parámetros endocrinos y nutricionales en pacientes renales crónicos, y evaluar si el tiempo de permanencia bajo Hemodiálisis (HD) modifica dichos parámetros y su eventual correlación. Se evaluaron 49 pacientes adultos, de ambos sexos, con IRC, obteniendo las muestras a partir de la fístula arterio-venosa pre-diálisis. Se dividió a los pacientes en tres grupos según el tiempo de permanencia en Hemodiálisis. El grupo 1 (G1) con un tiempo menor de 2 años bajo terapia, los del grupo 2 (G2) entre 2 y 5 años y los del grupo 3 (G3) más de 5 años (con igual frecuencia). No observamos variaciones estadísticamente significativas en los niveles de T4, T4L y colesterol. Sin embargo, los niveles de T3 y albúmina descendieron significativamente en los grupos de mayor tiempo de HD (T3, G1: 0.72 ± 0.016 ; G2: 0.65 ± 0.024 ; G3: 0.60 ± 0.026 ng/dL y albúmina, G1: 3.7 ± 0.05 ; G2: 3.4 ± 0.05 ; G3: 3.1 ± 0.08 g/dL, $p < 0.01$, test de Tukey). En concordancia, se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre T3 y albúmina en los diferentes grupos (Spearman $p < 0.05$). En resumen, los pacientes con IRC en terapia de HD muestran un progresivo descenso de T3 que se correlaciona con la disminución de la albúmina sérica. Se concluye que la T3 puede ser un marcador en la evolución de dichos pacientes.

0096 (136) EFECTO DE TESTOSTERONA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN TEJIDO VASCULAR. A Campelo ^{1,2}, P Cutini ^{1,2}, V Massheimer ^{1,2}

¹Catedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca; ²CONICET <acampelo@criba.edu.ar>

El tejido vascular es considerado órgano blanco de los andrógenos ya que la presencia de su receptor ha sido demostrada. La capacidad generadora de óxido nítrico (NO) por parte del endotelio es vital para el mantenimiento de la integridad vascular. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto de la testosterona (T) sobre la producción de NO en tejido vascular. Se utilizaron anillos de aorta torácica aislados de ratas Wistar y se determinó la producción de NO por el método de Griess. Al ensayar diferentes concentraciones de la hormona (10^{-7} a 10^{-11} M), se comprobó que T estimula la producción de NO a todas las dosis ($15 \pm 125\%$ s/control, $p < 0.01$), siendo el máximo estímulo a 0.1 nM (0.224 ± 0.03 vs 0.504 ± 0.04 nmol NO/mg prot, control vs T, $p < 0.001$). Esta acción se manifiesta a tiempos cortos de tratamiento (3-20 min.). Como control positivo del ensayo se empleó un agonista natural del tejido vascular que estimula la actividad óxido nítrico sintasa, observándose una respuesta positiva del tejido a 5 min. de tratamiento con $10 \mu\text{M}$ acetilcolina (212% s/control, $p < 0.001$). Teniendo en cuenta que la enzima óxido nítrico sintasa es susceptible de regulación por fosforilación, y considerando que en nuestro laboratorio hemos demostrado que PKC y MAPK son activadas por los esteroides gonadales, evaluamos el rol de estos sistemas de señalización sobre la acción estimuladora de T. Se seleccionaron los compuestos chelerythrine (chel) y PD98059 como inhibidores PKC y MAPK respectivamente. La preincubación de los anillos aórticos con chel $1 \mu\text{M}$ suprimió totalmente el incremento en NO inducido por 0.1 nM T (126 vs 3% s/control, T vs T+chel, $p < 0.05$). Por el contrario la presencia de PD98059 $5 \mu\text{M}$ no modificó en forma estadísticamente significativa la acción hormonal. Los Resultados presentados aportan evidencias que, en tejido vascular, la testosterona estimula la síntesis de NO a través de un mecanismo de acción rápido que involucra la participación del sistema PKC dependiente.

0097 (149) EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINO SIMIL TIPO I (IGF-I) SOBRE LA POBLACIÓN GONADOTROPA EN RATAS ESTROGENIZADAS. G Camihort¹, G Luna², C Hereñú^{3,4}, M Bracamonte^{4,5}, R Goya⁴, G Cónsole^{2,5}

¹Cátedra Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.; ²CICPBA; ³NIBIOLP; ⁴CONICET; ⁵Cátedra Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP <gconsole2@gmail.com>

Introducción: El IGF-I es un factor de crecimiento que interviene en la diferenciación y proliferación celular, con aumento del efecto biológico de la FSH y del estrógeno (E). Existen receptores de estrógeno en células lactotropas, corticotropas, melanotropas y gonadotropas. Se sabe que la exposición prolongada a estrógenos produce hiperprolactinemia y formación de prolactinomas. **Objetivo:** Analizar los cambios histométricos inducidos por la terapia génica intrapituitaria con un vector adenoviral que expresa el gen de IGF-I (RAD-IGF-I) sobre la población gonadotropa de ratas estrogenizadas. **Material y Metodologías:** Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley estrogenizadas durante 50 días con cápsulas subcutáneas. Se sacrificaron a los 7 días postinyección intrapituitaria del vector RAD-IGF-I o del vector control RAD-GFP. Se inmunomarcó con anti-LH/FSH-EnVision y se analizó la densidad de células (DCx10⁴), la densidad de volumen (DVx10²) y el tamaño celular (TC: um²). Resultados: Las ratas estrogenizadas mostraron en la población gonadotropa una disminución significativa (p<0.01) de la DC (FSH: 0.9±0.1 vs 4.1±0.2 y LH: 3.1±0.1 vs 6.2± 0.1) respecto a los controles. El TC disminuyó (p<0.05) en ambas poblaciones (FSH: 62.4±1.6 vs 88.1 ± 0.5 y LH: 69.6±0.4 vs 79±1.7) La terapia combinada E+IGF-I presentó un significativo (p<0.01-0.05) aumento en DC y TC en ambas poblaciones: DC: FSH: 1.7±0.2 vs 0.9±0.1 y LH: 4.5±0.1 vs 3.2±0.1, TC: FSH: 85 ± 1.4 vs 61.4±1.5 y LH: 90.7±1.6 vs. 70.4±1.7, respecto a E+RAD-GFP. **Conclusión:** La estrogenización produjo un efecto inhibitorio sobre la población gonadotropa adenohipofisaria y la combinación de E+IGF-I durante 7 días demostró un efecto trófico restaurador de los parámetros estudiados.

0098 (195) EFECTO DE LA IL-d EN EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN UNA LÍNEA DE CÁNCER INDIFERENCIADO DE TIROIDES. L.Thomasz¹, R Oglio¹, M A Pisarev^{1,2,3}, G J Juvenal^{1,2}

¹CNEA; ²CONICET; ³Facultad de Medicina - UBA. <thomasz@cnea.gov.ar>

El iodo no sólo es utilizado por la tiroides para sintetizar hormonas tiroideas sino que también cumple una función regulatoria. El iodo inhibe parámetros tiroideos, tanto en lo que respecta a la función como al crecimiento glandular. Nosotros hemos descrito que la tiroides sintetiza la 5-hidroxi-6-eicosatrienoico delta lactona (IL-δ), derivado del ácido araquidónico, que reproduce la acción del iodo sobre algunos parámetros tiroideos. **Objetivo:** evaluar el efecto de la IL-δ sobre la proliferación celular, la muerte celular programada y el stress oxidativo en una línea de cáncer indiferenciado de tiroides (ARO). **Metodología y Resultados:** las células se trataron con dosis crecientes de IL-δ, KI o ácido araquidónico (AA) durante 24, 48 y 76 horas. La IL-δ inhibió la proliferación a partir de las 76 horas en forma dosis dependiente; a) porcentaje de inhibición respecto al control por el ensayo de MTT: IL-δ 1µM 20%, 5µM 25%, 10µM 31%(p<0,01), 50µM 47%(p<0,01); b) número de células/ml: C: 441000, IL-δ 1µM: 351000; IL-δ 10µM: 326000(p<0,05), mientras que el iodo y el ácido araquidónico no tuvieron efecto. Al analizar la expresión de PCNA por Western Blot se observó un 34% de inhibición respecto al control con IL-δ 10µM (p<0,05). La apoptosis se estudió evaluando el número de núcleos apoptóticos por microscopía de fluorescencia y cuantificando la actividad de caspasa-3 a diferentes tiempos con IL-δ 10µM. Se observó un incremento significativo en el % de núcleos apoptóticos (6% 48h, 11% 76h p<0,05) y de la actividad de Caspasa-3 a partir de las 48hs de tratamiento (actividad como pmolNA/min/ml: C_{48hs}:25, ILδ_{48hs}:30,

C_{76hs}:25, ILδ_{76hs}:31(p<0,001)). La IL-δ produjo un incremento significativo (p<0,001) en los niveles de peróxidos luego de 24 hs de tratamiento; C_{24hs}:12,6; IL-δ_{24hs}:14,6 (nmol/mg proteínas). **Conclusión:** La IL-δ inhibe la proliferación celular, induce apoptosis e incrementa los niveles de peróxidos en una línea de cáncer indiferenciado de tiroides.

0099 (215) EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE TRIIODOTIRONINA Y ACTIVIDAD DE MIELOPEROXIDASA EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES DE MUJERES HIPOTIROIDEAS SUBCLÍNICAS. M J Coria^{1,2}, A C Anzulovich^{1,2}, A I Pastrán³, D Gellon⁴, M Mercado Luna⁴, M S Gimenez^{1,2}

¹IMIBIO; ²Universidad Nacional de San Luis; ³Laboratorio de analisis clinicos hospital San Luis; ⁴Medicina Nuclear Hospital San Luis <marie_449@yahoo.com.ar>

El hipotiroidismo subclínico (HS) es una hipofunción leve de la glándula tiroides, con valores séricos de tirotrófina (TSH) ligeramente aumentados y de tiroxina libre (T4L) dentro del rango de normalidad. Está asociado a un riesgo incrementado de varias patologías, en las que los leucocitos polimorfonucleares (PMN) tienen un rol fundamental. Los PMN están altamente especializados para fagocitar y destruir microorganismos. Se sabe que los PMN humanos expresan receptores nucleares para la hormona triiodotironina (TR). No se conocía que subtipos se expresan, y si éstos son modificados por variaciones en los niveles séricos de TSH. En este estudio se determinó mRNA de los TR α y β en PMN de mujeres eutiroideas (ET) e hipotiroideas subclínicas (HTSC) en edad fértil y la actividad mieloperoxidasa (MPO), enzima esencial para que el PMN cumpla con su rol defensivo. Los PMN de 17 mujeres de 20-45 años de edad, fueron separados a partir de sangre periférica por centrifugación en gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque. La extracción del mRNA total de los PMN se realizó con TRIzol. La retrotranscripción se llevó a cabo usando MMLV-RT y random primers. El mRNA de los TR fue cuantificado por RealTime-PCR, utilizando SYBR Green en un termociclador ABI PRISM 7500 RT-PCR system (Applied Biosystems). Se usó como control endógeno gliceraldehido fosfato deshidrogenasa y como calibrador leucocitos mononucleares de mujeres ET. La actividad de MPO se midió por el método de la o-dianisidina. Los niveles séricos de TSH y T4L se midieron por quimioluminiscencia en un autoanalizador ACS: 180 PLUS (Bayer Health Care). Se detectó la expresión del mRNA de ambas isoformas del TR en los PMN, con similar nivel de expresión. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de los TR, ni en la actividad de MPO entre mujeres ET y HTSC. El HS no modifica el nivel de expresión de los TR α y β ni la actividad de la MPO en PMN no estimulados de mujeres en edad fértil.

0100 (294) EXPRESIÓN ADENOHIPOFISARIA DEL TNF-α Y SU MODULACIÓN POR ESTRÓGENOS. L.Magri¹, V Zaldivar¹, G Eijo¹, J Ferraris¹, G Jaita¹, D Radl¹, S Zárate¹, D Pisera¹, A Seilicovich¹

¹Instituto de Investigaciones en Reproducción <laumagri@hotmail.com>

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) es una citoquina proinflamatoria que juega un importante papel en la homeostasis tisular modulando los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la liberación adenohipofisaria de TNF-α es dependiente de estradiol y mayor en células provenientes de ratas en proestro (coincidiendo con el pico de estradiol circulante) que en diestro. Además, hemos demostrado que el TNF-α induce apoptosis en lactotropas y somatotropas de manera estrógeno-dependiente. Teniendo en cuenta estos Resultados y que se observó un aumento significativo del mRNA de TNF-α en células adenohipofisarias de ratas Wistar adultas en proestro y de ratas ovariectomizadas (OVX) cultivadas en presencia de estradiol, el objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión de TNF-α en distintos tipos celulares de la adenohipofisis y el efecto del estradiol sobre dicha expresión.

Mediante la técnica de inmunocitoquímica detectamos la presencia de TNF- α en lactotrofos, somatotrofos, gonadotrofos (bLH) y corticotrofos. La incubación de células adenohipofisarias provenientes de ratas OVX incubadas con 17 β -estradiol (E2, 10⁻⁹M) durante 24 horas aumentó significativamente la expresión de TNF- α en células adenohipofisarias totales (Control: 22%, E2:26.6%, p<0.01, χ^2) y en lactotrofos (Control: 32.8%, E2:41.4%, p<0.01, χ^2). Además, Resultados preliminares indican que el estradiol no modificaría la expresión de TNF- α en la subpoblación de somatotrofos. Estos Resultados indican que el estradiol aumenta significativamente la expresión de TNF- α en lactotrofos y sugieren que los estrógenos podrían favorecer el desencadenamiento de procesos apoptóticos durante el proestro en esta subpoblación adenohipofisaria. Esta citoquina podría participar como un mecanismo hormono-sensible en el control de la muerte celular programada en la adenohipofisis.

0101 (341) ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA EXPRESIÓN DE FMRP EN DISTINTOS ESTADIOS DEL DESARROLLO FOLICULAR Y EN LOS DIFERENTES TIPOS CELULARES EN OVARIO DE RATA. L.C Ferder¹, F Parborell², D Abramovich², V Chiauzzi², E Charreau², M Tesone^{2,3}, L Dain^{2,4}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; ³Departamento de química biológica FCEyN UBA; ⁴Centro Nacional de Genética Médica ANLIS <ianinaf@hotmail.com>

La falla ovárica prematura (FOP) es un síndrome 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. Entre las posibles causas, es sabido que existiría una asociación entre el estado de premutación (amplificación de tripletes CGG entre 55 y 200 repeticiones) en el gen FMR-1 y FOP. 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 los distintos estadios y tipos celulares a lo largo del desarrollo folicular. La expresión de la proteína se analizó por inmunohistoquímica (IHQ) a partir de cortes de tejido ovárico. Se utilizaron ratas prepúberes de 18 días sin tratamiento o tratadas por 3 días con DES (1mg/rata, ejemplares con ovarios inmaduros), o bien superovuladas con una dosis única de 25 UI/rata de PMSG (ejemplares enriquecidos en folículos preovulatorios). Como control se utilizaron ratas adultas sin tratar, las cuales presentan folículos en todos los estadios, y cortes de ovarios de ratón KO para la proteína FMRP (control negativo). Resultados de la IHQ estarían indicando que los folículos primordiales expresan FMRP y que su expresión varía a medida que el mismo se desarrolla. Folículos preantrales expresan la proteína en granulosa, en estroma y en menor medida en células teca. A medida que el folículo crece, la expresión aumenta en granulosa y teca, mientras que su expresión en estroma disminuye hasta hacerse casi nula en folículos antrales tardíos y preovulatorios. Los cuerpos lúteos presentan los mayores niveles de expresión. Estos Resultados estarían indicando que FMRP se expresaría de forma diferencial de acuerdo al estadio folicular, tanto en los niveles de expresión como en tipos celulares involucrados.

0102 (343) RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) SÉRICA INDUCIDA POR EL BLOQUEO DE LOS SISTEMAS SEROTONINÉRGICO Y OPIOIDE AL FINAL DE LA PREÑEZ EN LA RATA. C Villegas Gabutti¹, G Jahn¹, M Soaje¹

¹Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CONICET <cmville@gmail.com>

En la preñez tardía, los sistemas serotoninérgico y opioide (SO) inhiben la secreción de PRL sérica. pCPA (inhibidor de la síntesis de serotonina, 5-HT) aumenta PRL, efecto potenciado por el antiopioide naloxona (NAL). Mientras el SO inhibe PRL en ausencia de progesterona (P₄), 5-HT inhibe su liberación en presencia

de P₄ elevada. Por otra parte, pCPA disminuye la actividad dopaminérgica en el hipotálamo medio basal (HMB) facilitando la acción estimuladora de NAL, a pesar de los elevados niveles de P₄. **Objetivo:** Determinar si el aumento de PRL inducido por pCPA involucra cambios en los niveles de expresión del receptor de estrógeno α (RE α), receptor largo de PRL (RPRL_L), receptores μ y δ opioides (RO μ y RO δ) y del receptor de P₄ (RP₄) en HMB que puedan facilitar la acción potenciadora de NAL sobre PRL sérica. Metodología: Ratas en el día 18 de preñez se inyectaron con pCPA (200 mg/kg, sc) y NAL (2 mg/kg, i.p) ó su vehículo (V) a las 17.30 h del día 19. 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 β -actina de RE α , RPRL_L, RO μ , RO δ y del RP₄ por RT-PCR semicuantitativa. Resultados: Confirmando datos previos, pCPA aumentó PRL sérica y NAL potenció este efecto. pCPA aumentó la expresión de RE α (0.96 \pm 0.04, n=8 vs V: 0.74 \pm 0.07, n=8) y del RPRL_L (0.60 \pm 0.07, n=9 vs V: 0.39 \pm 0.05, n=9) sin modificar la expresión de RO μ y RO δ ni de RP₄. Conclusiones: 1) El bloqueo de la síntesis de 5-HT por pCPA aumentó la expresión del RE α en HMB lo que facilita la liberación de PRL y la acción potenciadora de NAL sobre la misma. 2) La mayor expresión del RPRL_L sugiere una activación del sistema de retrocontrol corto para que la PRL liberada controle su propia secreción. 3) El aumento de PRL inducido por pCPA no involucraría cambios en la expresión de los RO μ y RO δ en HMB, sugiriendo que la acción de pCPA no estaría mediada por cambios en la sensibilidad del SO.

0103 (369) EFECTOS AGUDOS DE LA INSULINA SOBRE EL TESTICULO DE RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS ÚNICA DE ALOXANO EN EL POSDESTETE. S.M Vázquez¹, N Hisano¹

¹Cátedra de Histología y Embriología, Fac. Cs. Médicas. UNR <noriyuki@cimer.org.ar>

Resultados previos (SAIC 2004-2006), indicaron que el Aloxano inyectado en ratas posdestetadas provocaba una alteración histológica testicular. Complementamos esos estudios con el efecto de la insulina sobre los testículos de las ratas inyectadas con aloxano. Ratas macho posdestetadas de la línea "m" se inyectaron con una dosis intraperitoneal de Aloxano (A) (24 mg/100 g de peso) (n=10) (Peso corporal: 40.25 \pm 1.93 g). A ratas controles (C) se le inyectó agua destilada (1cc/100g de peso corporal) (n=5). A partir de las 24 hrs se les controló la glicemia diariamente y en los casos que hubo hiperglicemia se le inyectó 1 ó 2 UI Insulina Porcina NPH (Betasint). A los animales se les determinó la glicemia, se pesaron, y se sacrificaron con sobredosis de éter a los 33 días de edad. Se diseccionaron los testículos y se pesaron. Fijados en Carnoy, refijados en formaldehído al 4% en PBS. Fueron procesados según las técnicas histológicas de rutina, coloreados con H-E. Peso corporal: 80 \pm 8.22 g(A); 82.97 \pm 7.07 g (C). Peso testicular: 0.76 \pm 0.02 g/100gPC (A); 0.75 \pm 0.09 g/100gPC(C). La observación histológica mostró túbulos seminíferos con contenido celular intraluminal con células con signos de apoptosis, cariólisis y cariorrexis, separación celular de los espermatozoides de las espermatogonias, aumento del espacio intercelular entre las células germinales. Estas imágenes fueron similares a las descritas anteriormente en animales inyectados con aloxano (con glicemia leve e intensamente elevadas) y no difieren significativamente de las ratas tratadas con insulina, por lo tanto, refuerza la concepción de que las imágenes con alteración testicular temprana se debería a un efecto tóxico directo del aloxano sobre el testículo

0104 (380) CONSUMO DE UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA POR MADRES DURANTE LA LACTANCIA: ALTERACIONES METABÓLICAS Y DE LA FUNCIÓN ENDOCRINA ADIPOCITARIA EN LA PROGENIE. A Alzamendi¹, D Castrogiovanni¹, E Spinedi¹, A Giovambattista¹

¹IMBICE <neuroend@imbice.org.ar>

El objetivo del trabajo fue evaluar (en ratas S-D) si cambios en el estado nutricional materno, durante la lactancia, condiciona el desarrollo del organismo impactando en la progenie (PG) macho adulta. Entre los días del parto y destete las madres, alimentadas *ad libitum*, se dividieron en dos grupos: uno recibió dieta rica en fructosa (10% p/v en el agua de bebida; MF) y otro dieta normal (sólo agua; MC). A partir del destete (día 21) se estudiaron las crías macho provenientes de MC y MF (grupos PG-F y PG-C, respectivamente). Se registró, cada 48 h, el peso corporal y el alimento consumido entre los 21 días y el experimental (30 ó 60 días de vida; PG-C30, PG-F30, PG-C60 y PG-F60). Se evaluaron las concentraciones circulantes de glucosa (Glu), triglicéridos (Tg), colesterol total (Col), insulina (Ins) y leptina (Lep). Adipocitos aislados de tejido adiposo retroperitoneal (PG-C60 y PG-F60) se incubaron 30 minutos sin o con Ins (0,1-10 nM). Animales PG-F presentaron un incremento significativo ($P < 0,05$ vs. PG-C) en el peso corporal durante todo el estudio. Las crías PG-F resultaron hiperfágicas ($P < 0,05$ vs. CC) entre los 49 y 60 días de vida. Los animales PG-C30 y PG-F30 presentaron similares niveles circulantes de Glu, Col y Lep; contrariamente, los PG-F30 resultaron hipertriglicéridémicos e hiperinsulinémicos ($P < 0,05$ vs. PG-C30). Los animales PG-C60 y PG-F60 tuvieron similares valores circulantes de Glu, Tg y Col; sin embargo, los PG-F60 resultaron hiperinsulinémicos e hiperleptinémicos ($P < 0,05$ vs. PG-C60). Los adipocitos aislados de ratas PG-F60 secretaron espontáneamente mayor ($p < 0,05$ vs. PG-C60) cantidad de Lep al medio, desarrollando una menor respuesta al ($P < 0,05$ vs. PG-C60). Nuestro estudio indica que el consumo excesivo de fructosa por la madre durante la lactancia, induce cambios metabólicos permanentes en la PG macho. Estas alteraciones podrían impactar aumentando la susceptibilidad para desarrollar Síndrome Metabólico/Diabetes tipo 2 durante la vida adulta.

0105 (429) NUEVA MUTACIÓN EN EL FACTOR ESTEROIDOGENICO 1 (SF1) EN 2 HERMANOS 46XY CON DESORDEN DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL (DSD). ALTERACIÓN EN EL PERFIL DE EXPRESIÓN DE LA CP450 AROMATASA (ARO) Y DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA (ERLFA). M Warman¹, M Costanzo¹, R Marino¹, J Galeano¹, M Ciaccio¹, E Berensztein¹, M Bailez¹, M A Rivarola¹, A Belgorosky¹

¹Hospital de Pediatría SAMIC, Prof. Dr. Juan P. Garrahan <dmwarman@hotmail.com>

Un amplio espectro fenotípico en la diferenciación, gonadal, adrenal y del conducto de Muller (M) ha sido descrito en pacientes 46XY con DSD y mutaciones en el gen SF1. Asimismo se ha descrito que los estrógenos inhiben enzimas limitantes de la esteroidogénesis (ELE). El objetivo es presentar dos hermanos con DSD 46 XY, con diferente grado de masculinización y función adrenal conservada y evaluar el perfil de expresión del ERalfa y la ARO en la gonada. El caso índice presentaba a los 3 meses (Me) de edad cronológica (EC), hipospadias perineal, falo de 2.5 cm, gónadas escrotales, niveles séricos basales (B) normales de FSH y LH y aumento de la testosterona (T) sérica al estímulo agudo con hCG (2.48 ng/ml). Se asignó sexo masculino. A una EC de 18 años, presenta desarrollo puberal completo espontáneo, volumen testicular (VT) de 10cc subnormal (SN), niveles séricos B de LH, FSH y T normales para edad y sexo (LH 2.82 MIU/ml, FSH 6.48 MIU/ml, T 4.3 ng/ml) y función adrenal normal. La hermana, evaluada a una EC de 9Me, con genitales externos escasamente virilizados, presencia de M y estudios compatibles con disgenesia testicular severa. Gonadectomía a los 18Me. Se detectó en el DNA genómico de ambos, una mutación puntual (MP) en forma heterocigota en el gen SF1, W279X. Esta nueva MP predice la pérdida de gran parte del sitio de unión al ligando y del dominio AF2. En la gonada se observó hiperplasia de células de Leydig (CL), ausentes a esa edad y por inmunohistoquímica ARO y ER alfa se expresaron sólo en CL en un 100% (el ERalfa no se expresa en testículo inmaduro normal). Este es el primer caso de un in-

dividuo 46 XY criado varón con MP en el gen SF1, con desarrollo puberal masculino completo espontáneo, T, LH y FSH normales y VT SN. Se propone que en presencia de una alteración de la dosis génica de SF1 gonadal durante la diferenciación sexual las ELE se podrían inhibir vía ER alfa, condicionando la insuficiente virilización de los genitales externos en un feto 46XY.

0106 (592) ESTRADIOL REGULA LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DE NF-KB MODULANDO LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS INDUCIDA POR LPS A TRAVÉS DE TOLL-LIKE 4. E T Rodrigo Fanton¹, S Gutiérrez¹, C Palmeri¹, J P Petiti¹, A Torres¹, A De Paul¹

¹Centro de microscopía electrónica <elica_rod@hotmail.com>

En investigaciones previas demostramos que LPS actúa sobre lactotropas de hipófisis hiperplásicas desencadenando proliferación celular. En este trabajo analizamos la participación de Toll-like 4, sus moléculas asociadas: CD14 y MyD88, en la proliferación de lactotropas inducida por LPS, evaluando la contribución del factor NF-kB en este proceso. Además se investigó el efecto del 17 α -estradiol (E₂) como regulador de la acción de LPS. Ratas machos fueron tratadas con 10 mg de E₂ incorporado en forma subcutánea por 60 d. Luego las hipófisis fueron cultivadas aplicándose: LPS (100ng y 2ug/ml) por 6 y 24h; E₂ (100nM) por 4 y 24h; interacción mediante co-incubación LPS-E₂ por 24h (I) y sensibilización por pre-incubación con E₂ 4h seguido de LPS por 24h (S). La expresión de TLR4, sus proteínas asociadas: CD14 y MyD88 así como NF-kB fue determinada por western blot en extractos totales (ET), citosólicos (EC) y nucleares (EN). Además se inmunolocalizaron estas moléculas a nivel óptico y electrónico. Análisis estadístico: ANOVA-Fisher. En ET, LPS solo o en interacción con E₂ (I) incrementó la expresión de TLR4, CD14, MyD88 ($p < 0.05$ vs C) El análisis de EN reveló un aumento de la expresión de NF-kB ($p < 0.05$ vs C) indicando su translocación en estos modelos. El tratamiento con E₂ no indujo cambios en la expresión de TLR4 y NF-kB respecto al control, mientras que la sensibilización con E2 promovió un aumento significativo del factor de transcripción en EC en relación al detectado en EN, resultado que revelaría un rol modulador del E₂ en la translocación nuclear de NF-kB. Además, por inmunocitoquímica, se detectó TLR4 en citoplasma asociado a RER y NF-kB en núcleos de lactotropas tratadas con LPS. Se demuestra que LPS, a través de TLR4 y sus moléculas complementarias, promueve la proliferación de lactotropas desencadenando la translocación nuclear de NF-kB. E2 regularía la localización subcelular de NF-kB modulando de este modo la proliferación de lactotropas inducida por LPS.

0107 (618) EFECTOS DEL URODILATIN COMO MODULADOR ENDÓCRINO DEL METABOLISMO DE LA DOPAMINA Y DE LA NA⁺, K⁺-ATPASA RENALES. C Medici^{1,2}, M Citarella¹, B Lee¹, F Lucano¹, G Contruffo¹, M Choi¹, M Gironacci², B E Fernández¹

¹Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Cátedra de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <ceciliamedici@yahoo.com.ar>

Demostremos que parte de los efectos renales del Urodilatin (URO) se deben al estímulo de la captación renal de dopamina (DA), a través de sus receptores NPR-A y la cascada de señalización GC particulada-GMPc-PKG [Physiol Mini-Rev 2(4):184, 2006; Medicina 66:66, 2006]. Estudiamos los efectos del URO sobre otros pasos del metabolismo de la DA renal (liberación, síntesis, catabolismo, *turn over*) y la actividad de la Na⁺, K⁺-ATPasa en cortes de corteza renal externa de ratas Sprague Dawley. Resultados: 10 nM URO no modificó la síntesis de DA (activ. esp. de DOPA decarboxilasa, nmol/mg/min \pm ES, n=8-15); Controles(C) 6.45 \pm 0.50; Carbidopa (CD) 100 μ M 2.20 \pm 0.50; URO 10 nM 6.90 \pm 0.62*, ni la liberación (espontánea e inducida por KCl 25mM) de

DA renal (pendiente de regresión lineal $k \cdot 10^2 \pm ES$) C -1.21 ± 0.17 ; URO -0.95 ± 0.09 ; KCl -0.96 ± 0.05 ; URO+KCl -0.97 ± 0.08 . Por otra parte, el URO disminuyó la activ. esp. de la MAO (nmol/mg/hora $\pm ES$): (C) 736.8 ± 35.1 ; URO $531.9 \pm 43.5^*$ y el turn over de DA ($k \cdot 10^2 \pm ES$): C -0.59 ± 0.01 ; URO $-0.29 \pm 0.01^*$. $^*p < 0.05$ vs C. Los efectos del URO sobre la Na^+, K^+ -ATPasa (%variación $\pm ES$) se estudiaron en presencia de CD $100 \mu M$, para inhibir la síntesis de DA endógena e hidrocortisona (HC) $100 \mu M$ para inhibir su captación tubular (n=7-11): C: 100 ; CD: $156 \pm 1^*$; URO: $114 \pm 8^{**}$; DA $1 \mu M$: $92 \pm 1^{**}$, HC: $155 \pm 1^*$, URO+DA: $66 \pm 6^{\#}$, HC+DA: $164 \pm 10^*$, URO+DA+HC: $119 \pm 6^{\wedge}$. $^*P < 0.01$ vs C, $^{**}P < 0.05$ vs CD, $^{\#}P < 0.05$ vs URO, $^{\wedge}P < 0.05$ vs HC+DA (ANOVA, Tukey tests) n=10-12. En conclusión, el URO no modifica la síntesis ni la liberación de DA renal, aumenta su captación y disminuye su catabolismo y velocidad de recambio, incrementando (al igual que el ANP) la disponibilidad de DA renal, la que así mediaría parte de los efectos natriuréticos del URO. Por otra parte, se comprobó que, con la síntesis endógena de DA inhibida, el URO aumenta la inhibición de la Na^+, K^+ -ATPasa renal dependiente de la DA captada.

ENDOCRINOLOGIA P2

0108 (70) SELECCIÓN DE NIÑOS EN RIESGO DE DIABETES TIPO 1. M D C Camberos ¹, I Fernandez ², G A Passicot ¹, A Trabucchi ³, S Valdez ³, E Poskus ³, I Bergada ¹, M Tonietti ², A B Schenone ⁴, M Szlago ⁴, G Fretchel ⁵, M Tellechea ⁵, L Trifone ², J C Cresto ¹

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas (Cedie-conicet), Hospital de Niños R. Gutierrez; ²Scio. de Diabetes, Htal. de Niños "R. Gutierrez"; ³Inmunología, (Ideh-conicet), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ⁴Fundación para Enfermedades Neurometabólicas (Feser); ⁵Cátedra de Genética y Biología Molecular, Htal. de Clínicas, UBA <mccamberos@cedie.org.ar>

La selección de niños en riesgo de Diabetes tipo 1 es requisito para aplicar estrategias de prevención, siendo los hermanos de niños con diabetes tipo 1 el grupo de riesgo potencial. El riesgo se establece con marcadores inmunológicos, carga genética y una prueba de tolerancia EV a la glucosa (PTEVG). Diversos trabajos han demostrado que la disminución de L-carnitina puede expresar un déficit de insulina a nivel celular, por lo que su determinación en sangre fue elegida como método de "screening". **Objetivo** - Establecer un algoritmo de diagnóstico preclínico de diabetes tipo 1 que permita detectar los niños en "riesgo" de padecer la enfermedad. **Metodologías** - Se estudiaron 54 hermanos de niños diabéticos tipo I. En ellos se determinó: L-carnitina total y libre (técnica de Hoppel); anticuerpos para glutamato decarboxilasa (GADA), tirosina fosfatasa (IA-2A) e insulina/proinsulina (IAA/PAA) (técnica: unión de radioligando) y PTEVG (que permite establecer: 1er pico de insulina [PP: 1+3 min] pendiente de glucosa [K_g] y \log_n (area ins) $\times K_g$). Resultados - Se determinó L-carnitina en 54 niños. Veintisiete niños tuvieron valores normales y en 27 los valores fueron bajos: ($x \pm DS$; L-carnitina total: $39,65 \pm 6,07$, libre: $31,51 \pm 5,39$). Los anticuerpos se determinaron en 52 niños, siendo positivos en 18. En total 11 niños con anticuerpos positivos tenían L-carnitina baja (54%). Veinte y seis niños se estudiaron con HLA, 5 fueron homocigotas (susceptibilidad) y 15 heterocigotas. En 25 niños se realizaron 35 PTEVG. Las pruebas se realizaron en niños con valores bajos de L-carnitina y/o anticuerpos positivos. Se consideró anormal una PTEVG con PP < 49 μU de insulina, $K_g < 1.40$ y \log_n (area ins) $\times K_g < 15$. Cinco niños tuvieron PTEVG anormales. De estos 5, tres presentaban autoinmunidad y tres eran homocigotas. Todos tenían L-carnitina baja. **Conclusiones:** No hubo falsos negativos con L-carnitina. La determinación de L-carnitina es útil en la selección de niños en riesgo de diabetes tipo 1.

0109 (53) PRODUCCIÓN DE RADICAL HIDROXILO, ESTRÉS OXIDATIVO Y APOPTOSIS EN EL HÍGADO DE RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS POR ESTREPTOZOTOCINA. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INSULINA. D E Francés ¹, M T Ronco ¹, J Monti ¹, P Ingaramo ¹, G Pisani ², A D Quiroga ¹, J P Parody ¹, J M Pellegrino ¹, M C Carrillo ¹, C E Carnovale ¹

¹INSTITUTO DE FISIOLÓGIA EXPERIMENTAL - IFISE; ²Area Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR) <frances@ifise.gov.ar>

La producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) derivadas de la hiperglicemia son mediadores de las complicaciones en el estado diabético. En el presente trabajo, analizamos los efectos de la diabetes y del tratamiento con insulina sobre la producción del radical hidroxilo ($\cdot OH$), el estrés oxidativo y la vía mitocondrial de apoptosis en el hígado de rata. Ratas Wistar macho adultas fueron distribuidas en tres grupos: control (C) (buffer citrato de sodio, ip), diabéticas inducidas por estreptozotocina (DIE) (60mg/kg pc, inyección única ip) y diabéticas tratadas con insulina (DIE+I) (15 días post-inyección, ratas DIE recibieron insulina 3 veces al día, por 15 días, s.c.). Todos los animales fueron sacrificados en el día 30. La producción de $\cdot OH$ fue medida como un indicador de la producción de ROS. Se evaluó la relación ácido 2,3-Dihidroxibenzoico/Ácido Salicílico (2,3-DHB/AS) determinada por HPLC equipado con detector electroquímico. También se determinó por HPLC la lipoperoxidación (como malondialdehído, MDA) y el porcentaje de glutatión oxidado (%GSSG). Las proteínas involucradas en el proceso apoptótico fueron examinadas por Western Blot. Para evaluar apoptosis se realizaron análisis de TUNEL y de actividad caspasa-3. En DIE aumentaron significativamente versus C: $\cdot OH$, MDA y %GSSG; igualmente se encontraron aumentadas Bcl-x_L y Bax mitocondriales y citocromo c citosólico. La apoptosis fue confirmada por TUNEL y actividad caspasa-3. El tratamiento con insulina (DIE+I) disminuyó la producción de $\cdot OH$, MDA y %GSSG alcanzando los valores de C. También disminuyó el nivel de Bax sin afectar ni Bcl-x_L ni citocromo c, evidenciándose una atenuación de la apoptosis comparada con DIE. Nuestros Resultados muestran que el estado diabético aumenta la producción hepática de $\cdot OH$ y MDA conduciendo a la célula a apoptosis vía la ruta mitocondrial. Significativamente, la insulina mostró tanto efectos anti-oxidantes como anti-apoptóticos.

0110 (119) REVERSIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR CADMIO EN LA ADENOHIPÓFISIS. E A Miller ¹, S I Nudler ¹, J P Cabilla ¹, S A Ronchetti ¹, F A Quinteros ¹, B H Duvilanski ¹

¹Instituto de Química y Físico-Química Biológicas (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <neuroend@ffyb.uba.ar>

El Cadmio (Cd^{2+}) es un contaminante ambiental con una persistencia muy larga en el organismo. Anteriormente demostramos que la administración de Cd^{2+} (5 ppm) durante 30 días genera estrés oxidativo en la adenohipófisis (ADH) y que este efecto es impedido si se administra conjuntamente Cd^{2+} y melatonina (Mel). Ahora investigamos si tratamientos *a posteriori* de la contaminación con Cd^{2+} eran capaces de revertir el estrés oxidativo producido por el metal en la ADH. Ratas machos (Wistar) (n=6-10) fueron tratadas con Cd^{2+} (5ppm) en el agua de bebida durante 30 días y luego con agua o Mel (0,4 $\mu g/ml$) durante otros 30 días. Se utilizaron como marcadores de estrés oxidativo los niveles de expresión del mRNA de las siguientes proteínas: hemo-oxigenasa-1 (HO-1), metalotioneína-1 (MT-1) y óxido nítrico sintasa-1 (NOS-1). El Cd^{2+} indujo un aumento significativo de la expresión de la HO-1. El tratamiento *a posteriori* con Mel revirtió totalmente el efecto del metal mientras que el agua lo revirtió parcialmente

(Densidad óptica relativa (DOR); Control:0,25±0,04, Cd²⁺:0,56±0,08, p<0,01 vs Control, Cd²⁺/Mel:0,23±0,02, p<0,05 vs Cd²⁺; Cd²⁺/agua:0,40±0,07). Resultados similares se obtuvieron con la expresión de la MT-1 (DOR; Control:100,0±2,4, Cd²⁺:178,5±21,3, Cd²⁺/agua:117,3±5,1; p<0,05). En el caso de la NOS-1 la reversión fue parcial luego de un mes en ausencia del metal en la bebida y total al cabo de dos meses (DOR; Control:0,32±0,03; Cd²⁺:0,85±0,05; p<0,001 vs Control; Cd²⁺/agua:0,58±0,05, Cd²⁺/agua:0,40±0,03, p<0,001 vs Cd²⁺). La disminución de los niveles séricos de prolactina inducido por Cd²⁺ también fue revertida luego de un mes en ausencia del metal. La Mel, ya sea administrada simultáneamente o *a posteriori*, revierte totalmente el efecto oxidativo del metal. La sola eliminación del metal contaminante del agua de bebida también sería suficiente para revertir los efectos del Cd²⁺ en los parámetros estudiados aunque los tiempos requeridos parecen ser mayores.

0111 (151) CAMBIOS MORFOLÓGICOS SOBRE LA POBLACIÓN TIROTROPA EN RATAS ESTROGENIZADAS SOMETIDAS A TERAPIA GÉNICA CON FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINO SIMIL TIPO I (IGF-I). G Luna¹, G Camihort¹, C Hereñú^{2,3}, M Bracamonte^{4,5}, R Goya^{2,3}, G Cónsole^{4,6}

¹Cátedra Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.; ²INIBIOLP; ³CONICET; ⁴Cátedra Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP; ⁵CONICET.; ⁶CICPBA. <geolu2002@yahoo.com.ar>

Introducción: El IGF-I es un factor de crecimiento que interviene en la progresión del ciclo celular, la diferenciación y la proliferación de varios tipos celulares (ej: miocitos, queratinocitos, fibroblastos, condrocitos), presentando un marcado efecto antiapoptótico. La administración diaria de estrógenos (E) incrementó los niveles circulantes de TSH, sin cambios a nivel pituitario. Poco se sabe de los efectos de la acción conjunta de E+IGF-I sobre la población tirotrópica adenohipofisaria. **Objetivo:** Analizar los cambios morfológicos cuantitativos inducidos por la terapia génica intrapituitaria con un vector adenoviral que expresa el gen de IGF-I (RAD-IGF-I) sobre la población tirotrópica de ratas estrogenizadas. **Material y Metodologías:** Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley estrogenizadas durante 50 días con cápsulas subcutáneas. Se sacrificaron a los 7 días postinyección intrapituitaria del vector RAD-IGF-I o del vector control RAD-GFP. Se inmunomarcó con anti TSH-EnVision y se analizó la densidad de células (DCx10⁻⁴), la densidad de volumen (DVx10⁻²) y el tamaño celular (TC: μm²). Resultados: Las ratas estrogenizadas mostraron una disminución significativa (p<0,01) de la DC (0,3±0,1 vs 3,1±0,2) respecto a controles. El TC (μm²) no mostró cambios significativos. La terapia combinada E+RAD-IGF-I durante 7 días demostró un aumento en la DC (0,6 ± 0,1 vs 0,3 ± 0,1) respecto a E+GFP. No hubo variaciones en el TC. **Conclusión:** La estrogenización produjo un efecto inhibitorio sobre la población tirotrópica. La terapia combinada E+IGF-I durante 7 días mostró un aumento de la densidad celular que sugiere una tendencia restauradora del efecto inhibitorio del estrógeno (E) sobre la población tirotrópica adenohipofisaria.

0112 (162) ESTRADIOL EN INTERACCIÓN CON INSULINA ESTIMULA LA VÍA ÓXIDO NÍTRICO/GUANILATO CICLASA E INHIBE LA VÍA PROTEÍNA QUINASA C/ERK1/2 MODULANDO LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS. S Gutiérrez¹, A L De Paul¹, J P Petiti¹, L D V Sosa¹, J H Mukdsi¹, A M Masini de Repiso², A I Torres¹

¹Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.; ²Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBIC-CONICET <silvina_gutierrez@hotmail.com>

Las funciones de la adenohipofisis son reguladas por el 17- α estradiol (E2) activando cascadas de señalización que interactúan con las vías utilizadas por los factores de crecimiento. Nuestro

objetivo fue evaluar la participación de las vías óxido nítrico (NO)/ guanilato ciclasa (GC) y proteína quinasa C (PKC)/ ERK1/2 en las acciones del E2 en interacción con insulina (Ins) sobre la actividad proliferativa de las células lactotropas. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra fueron tratados con E2 (1-10-100 nM) e Ins (1-100-1000 ng/ml), solos o combinados por 60 min. En forma paralela se utilizó L-NMMA (0,1 mM) un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS). Se valoró la proliferación de lactotropas por doble detección inmunocitoquímica de BrdU y prolactina y la expresión de la isoforma α del receptor estrogénico (RE), PKC α , ERK 1/2 total y fosforilada, NOS III, GC α 1, GC β 1 y α actina por Western Blot. Análisis estadístico ANOVA-Tukey. En condiciones libres de suero E2 no indujo proliferación celular, pero cuando se lo co-incubó con Ins, inhibió la actividad mitogénica promovida por este factor, efecto que fue revertido por L-NMMA (p<0,01). El tratamiento con E2, Ins o E2/Ins produjo un aumento significativo en la expresión del RE α . La expresión de PKC α y ERK 1/2 fosforilada incrementó significativamente por acción de E2 o Ins, mientras que la co-incubación de E2/Ins redujo su expresión (p<0,001) en correlación con el efecto antimitogénico observado. Con respecto a la vía NO/GC, E2 o Ins no indujeron cambios significativos en la expresión de NOS III, ejerciendo efectos opuestos sobre la expresión de las isoformas de GC (incrementaron α 1 e inhibieron β 1). La co-incubación de E2/Ins indujo un aumento significativo de NOS III y de ambas isoformas de GC. Estos Resultados evidenciaron que el E2 es capaz de inhibir la actividad mitogénica inducida por Ins estimulando la vía NO/GC e inhibiendo la vía PKC/ERK1/2.

0113 (175) SISTEMAS DE ÓXIDO NITRICO SINTASA (NOS) Y CICLOOXIGENASA (COX) CORTICADRENALES: INTERACCIONES RECÍPROCAS Y PARTICIPACIÓN EN LA MODULACIÓN DE LA ESTEROIDOGÉNESIS INDUCIDA POR EL LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO (LPS). J M Cipelli¹, E M Repetto¹, F Astort¹, R Sánchez¹, C Martínez Calejman¹, M Mercau¹, P Arias², C B Cymeryng¹

¹Laboratorio de Endocrinología Molecular, Depto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. CEFYBO-CONICET; ²Departamento de Fisiología – Facultad de Medicina, UBA <jcipelli@gmail.com>

Es sabido que tanto el NO como las prostaglandinas modulan la respuesta esteroideogénica adrenal al LPS; existirían, además, interacciones cruzadas entre ambos sistemas reguladores. **Objetivos:** en un modelo de inflamación inducida por LPS (500 μ g/kg ip) caracterizar la evolución temporal de los sistemas de COX y NOS en la corteza adrenal, analizar sus interacciones recíprocas y estudiar la influencia de dichos sistemas en la respuesta esteroideogénica. Metodología: Ratas Wistar macho fueron tratadas con vehículo (C o control), LPS, parecoxib (P, 30 mg /kg ip), LPS+P, L-NAME (50 mg/kg ip), LPS+L-NAME, ACTH (7,5 UI/kg ip), ACTH+LPS, ACTH+P o ACTH+LPS+P. Se midió corticosterona sérica (CAs) y se determinó *ex vivo* la actividad adrenal de NOS y la producción de PGE₂. Se analizaron los Resultados (media \pm SEM) mediante un test *t* o un ANOVA. Resultados: tanto la actividad de NOS como la liberación de PGE₂ aumentaron en función del tiempo de tratamiento con LPS. A las 12 hs del mismo, el aumento de la actividad de NOS fue prevenido por P (LPS:28,0 \pm 3,4; LPS+P:16,9 \pm 3,7 pmol/min/mg proteína), mientras que el cotratamiento con LPS y L-NAME potenció la liberación de PGE₂ (C: 22,2 \pm 3,3; LPS:89,1 \pm 13; LPS+L-NAME: 180,4 \pm 16,6 pg/mg proteína) y aumentó la expresión de COX-2. La administración de P disminuyó la secreción de CAs en presencia de LPS y ACTH, no así la inducida solamente por ACTH (ACTH: 9,6 \pm 2,7; ACTH+LPS: 18,6 \pm 1,6; ACTH+P:11,2 \pm 0,25; ACTH+LPS+P:10,4 \pm 0,52 ng/ml). Conclusión: detectamos una interacción recíproca entre los sistemas de COX y NOS en el contexto de la estimulación adrenal por LPS: la actividad de COX es inhibida por NO mientras que las prostaglandinas tendrían un rol estimulador sobre la actividad de NOS. A su vez las prostaglandinas modularían positivamente la respuesta

esteroidogénica adrenal a la ACTH luego del tratamiento con LPS. Estos sistemas moduladores cooperarían para lograr una respuesta esteroidogénica finamente controlada tras el estímulo con LPS.

0114 (245) VALOR DIAGNÓSTICO DEL CORTISOL EN SALIVA EN EL SÍNDROME DE CUSHING. A L Arregger¹, E M Cardoso¹, O Tumilasci², L N Contreras¹.

¹Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari; ²Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires <endoexp2000@yahoo.com>

En la actualidad el diagnóstico de Síndrome de Cushing (SC) se realiza determinando cortisol urinario total, cortisol en saliva nocturno y cortisol sérico post 1mg de dexametasona. El objetivo de este trabajo fue determinar la reproducibilidad del cortisol en saliva nocturno (SAF₂₃) utilizando una técnica de radioinmunoensayo para suero adaptada a saliva y su valor diagnóstico para el SC. Además se definieron los valores de corte del cortisol en saliva y suero matutinos luego de la administración nocturna de 1 mg de dexametasona (SAF_{dex} y F_{dex}, respectivamente). Se estudiaron 21 pacientes con probado SC y 121 individuos sanos (cortisol urinario total < 248.0 nmol/día), previo consentimiento informado. Todos los sujetos obtuvieron saliva total en tubos estériles de polipropileno a las 23 hs. A fin de evaluar la reproducibilidad de SAF₂₃ se calculó el coeficiente de correlación intraclassa (ICC) en 47 individuos (26 C y 21 SC) que recolectaron saliva en dos noches no consecutivas. A las 8 horas del día siguiente a la administración de dexametasona, se obtuvieron muestras de saliva y sangre en forma simultánea para la determinación de SAF_{dex} y F_{dex} en 51 individuos (34C y 17 SC). SAF y F se midieron por RIA y se expresaron en nM. Resultados: el ICC de SAF₂₃ fue 0.83 en C y 0.89 en SC. Un valor de SAF₂₃ > 3.8 nM diagnosticó SC con una sensibilidad (S) de 100% y una especificidad (E) de 97.5 %. Se encontró correlación positiva entre SAF_{dex} y F_{dex} (r: 0.61, p < 0.0001). Valores de corte de SAF_{dex} > 2.0 nM y F_{dex} > 50.0 nM detectaron SC con 100% de S y E. El cortisol en saliva medido por RIA demostró alta reproducibilidad y sensibilidad para la detección de SC. Su alto rendimiento diagnóstico y su escasa invasividad lo convierten en un test de primera línea.

0115 (266) LA HEMO OXIGENASA REGULA LA ESTEROIDOGENESIS EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10. B Piotrkowski^{1,2}, R M Pagotto¹, C M Monzón¹, C Reche¹, C Mondillo¹, G Rogic¹, M Besio¹, C B Cymeryng³, O P Pignataro^{1,4}

¹Lab. Endocrinología Molecular y Traducción de Señales, IByME-CONICET; ²Fisicoquímica, FFyB-UBA; ³Departamento Química Humana, Facultad Medicina, UBA; ⁴Departamento Química Biológica-FCEN-UBA <piotrkowski@dna.uba.ar>

La hemo oxigenasa (HO) es la enzima reguladora en la degradación fisiológica del hemo, produciendo biliverdina, hierro y monóxido de carbono. Previamente demostramos que las isoformas HO-1 (32 kDa) y HO-2 (36 kDa) se expresan en células de Leydig (CL) de ratas adultas y células MA-10 y que el tratamiento de los animales con LPS induce un aumento en los niveles proteicos de HO-1 (Reche y col, SAIC 2003). **Objetivos:** Estudiar a) la regulación de la expresión y de la actividad enzimática de las isoenzimas de HO por hemina (inductor), Sn-PPIX (estaño protoporfirina IX-inhibidor), hCG y db-AMPC; y b) los efectos de HO sobre la esteroidogénesis y sobre la expresión de las proteínas StAR y P450_{SCC} (CYP11A) en células MA-10. Resultados: Hemina y hCG (20 ng/ml) aumentaron la expresión y actividad enzimática de ambas isoformas de HO y Sn-PPIX las inhibió. Respecto a la esteroidogénesis, la Sn-PPIX aumentó significativamente la producción de progesterona (Pg) basal y estimulada por dosis submáximas de hCG (1 ng/ml) y db-AMPC (0.2 mM). En cambio, la hemina disminuyó significativamente la síntesis de Pg basal y estimulada. Para ubicar el sitio de inhibición en el camino esteroidogénico, las células se incubaron con 22R-HO-colesterol (análogo permeable del colesterol), y se observó que no hubo diferencias en los niveles de Pg con respecto

a las incubadas en presencia de hemina. Asimismo, la expresión de la enzima P450_{SCC}, limitante del camino esteroidogénico, no se vió modificada por el tratamiento con hemina. Por último, la hemina inhibió la expresión de la proteína StAR, responsable del transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial. Por lo tanto, la modulación de las isoenzimas de HO regula la esteroidogénesis en las células MA-10, ya que la activación de la HO, inhibe la síntesis de Pg, al menos en parte por inhibición de la expresión de la proteína StAR. (Subsidios: PICT 5-38281, CONICET-PIP 5525 y UBA-X814).

0116 (322) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO SOBRE LAS LIPOPROTEÍNAS DEL SUERO DE RATAS HEMBRAS. R Puche¹, A Rigalli¹, S Lioi¹

¹Laboratorio de Biología Osea, F. de Medicina, Rosario <rodolfopuche@ciudad.com.ar>

La administración intravenosa de 2 ug de hormona de crecimiento (rhGH) eleva la triacilgliceridemia (TAG) de ratas hembra. El efecto es paradójico para una hormona lipolítica. Este proyecto tiene como objetivo la comprensión del mecanismo involucrado y la definición de su significado fisiológico. Se utilizaron ratas hembras línea IIM/Fm, sublínea "m" de 200 g de peso. Se usó uretano (120 mg/100 g peso) en los experimentos que requirieron anestesia. El aumento de TAG está asociado a una fracción lipoproteica que en electroforesis sobre gel de acetato de celulosa tiene movilidad de VLDL. En ratas preñadas, cuyos niveles de GH aumentan durante la tercera semana de gestación, el análisis de los lípidos plasmáticos reveló que el progresivo aumento de la concentración de TGA se acompaña (o es consecuencia) de la concentración de VLDL. Se analizó el efecto la sobrecarga oral de grasa sobre los lípidos plasmáticos. Ratas controles recibieron 3 ml de crema de leche. La lipemia aumentó siguiendo una cinética sigmoidea desde un nivel inicial de 190±37 (N=23) mg/dL hasta un plateau de 280±6 mg/dL, alcanzado a las 2 horas y constante hasta la 4ª hora post sobrecarga. Simultáneamente, aumentó la concentración de TGA siguiendo una cinética diferente (exponencial del tipo TGA = TGA₀ e^{kt}; TGA₀ = 60±7 mg/dL, k = 0.254±0.04 h). El parámetro k es significativamente menor (P=0.044) que el producido por GH (k=0.688±0.200). Experimentos con animales no anestesiados demostraron que el uretano no tiene efectos adversos sobre el proceso de absorción. Las modificaciones de la concentración plasmática de TGA se acompañaron con las de VLDL. El muestreo del contenido del conducto torácico durante el proceso absorbtivo, mostró a la VLDL como única lipoproteína presente. Se concluye que la hormona de crecimiento aumenta la actividad del mecanismo de exportación de VLDL, del intestino a la linfa. El significado fisiológico de este efecto durante la gestación es desconocido.

0117 (328) CALCITRIOL REGULA LA ACTIVIDAD DEL INTERCAMBIADOR NA/CA (NCX) EN CÉLULAS INTESTINALES. G Picotto¹, V Centeno¹, A Pérez¹, N Tolosa de Talamoni¹

¹Bioquímica y Biología Molecular, Ciencias Médicas, Univ Nac de Córdoba <gpicotto@biomed.uncor.edu>

El calcitriol regula la función de los enterocitos modulando la expresión génica e induciendo efectos no genómicos, lo que afecta el transporte transcelular de calcio. La salida del catión hacia la lámina propia, se efectúa por la Ca²⁺-ATPasa y el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (NCX1). El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de modulación del calcitriol sobre el NCX1 de células intestinales. Para ello, se aislaron enterocitos de pollos controles y raquíticos; estos últimos se trataron con calcitriol y/o vehículo. Se midió la actividad NCX1 trabajando en modo reverso. Los cambios en los niveles de ARNm para el NCX1 se midieron por RT-PCR y por western-blot la expresión de NCX1 y de VDR. La actividad basal del NCX1 resultó menor en los enterocitos de animales raquíticos en comparación con los controles. La administración crónica de vitamina D o de calcitriol

incrementó la actividad NCX1. La exposición directa a calcitriol de las células intestinales aumentó la actividad del intercambiador, efecto bloqueado por el tratamiento previo con cicloheximida (CHX). La administración intraperitoneal de calcitriol incrementó los niveles de ARNm, lo que no fue revertido completamente por el tratamiento con CHX. El calcitriol incrementó la expresión de NCX1, efecto bloqueado por CHX. La expresión del VDR no se modificó por el secoesteroide. El tratamiento de las células con calcitriol (10^{-8} M) y con forskolina ($10 \mu\text{M}$) por tiempos cortos resultó en una rápida inducción de la actividad NCX1. Tanto el inhibidor específico de la proteína quinasa A (PKA), Rp-cAMPS ($150 \mu\text{M}$), como el inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), staurosporina (10^{-6} M), bloquearon el efecto del calcitriol sobre la activación rápida de NCX1. Los Resultados sugieren que el calcitriol induce la actividad del NCX1 de intestino por un mecanismo rápido, que involucra las vías de PKA y PKC, y estimula la transcripción del gen NCX1 y de su producto, sin alterar los niveles intracelulares de VDR.

0118 (394) EFECTO DE LA ANDROGENIZACIÓN NEONATAL EN LA RATA HEMBRA SOBRE EL DESARROLLO DE SÍNDROME METABÓLICO DURANTE LA VIDA REPRODUCTIVA. A. Alzamendi¹, D Castrogiovanni¹, A Giovambattista¹, E Spinedi¹

¹IMBICE <neuroend@imbice.org.ar>

Nuestro objetivo fue evaluar el impacto de la androgenización neonatal, en la rata hembra, sobre el desarrollo de Síndrome Metabólico inducido por ingesta de dieta isocalórica rica en fructosa (F) a la edad adulta. Ratas S-D hembra de 5 días de vida se inyectaron s.c. con 50 ml de aceite de maíz sólo (C) o conteniendo propionato de testosterona (1,25 mg; T), y se estudiaron el día 100 de vida. Las ratas C y T se alimentaron "ad libitum" y recibieron, durante 21 días previos al experimento, F (10 % p/v, en el agua de bebida; C-F10 y T-F10) o sólo agua (C-F0 y T-F0). En las ratas C, la F incrementa ($P<0,05$; C-F10 vs. C-F0) los niveles periféricos de triglicéridos (TG) y ácidos grasos no saturados. La androgenización (T-F0) aumenta ($P<0,05$ vs. C-F0) las insulinemia y leptinemia, y reduce ($P<0,05$ vs. C-F0) la adiponectinemia. La F incrementa los niveles de TG y leptina en animales T ($P<0,05$; T-F10 vs. T-F0). La androgenización ó el consumo de F incrementa ($P<0,05$) la masa de tejido adiposo parametrial (TAP) (T-F0 vs. C-F0 y C-F10 vs. C-F10, respectivamente). La expresión de ARNm de ob en TAP no se modifica por la F (C-F10 vs. C-F0) aunque sí aumenta por la androgenización ($P<0,05$; T-F0 vs. C-F0); y este efecto se exagera en ratas T ($P<0,05$; T-F10 vs. T-F0). Por último, los Resultados de incubados de adipocitos de TAP indican que la androgenización disminuye ($P<0,05$) la secreción de leptina estimulada por insulina, independientemente de la dieta consumida. Este estudio sugiere que la androgenización neonatal induce un aumento de la masa y disfunción del TAP; y disminuye la sensibilidad a la insulina. Estos Resultados refuerzan la hipótesis que postula que la disminución en la sensibilidad a la insulina es dependiente, al menos en parte, de la hiperandrogenemia. De acuerdo a nuestro estudio la temprana hiperandrogenemia disminuiría la producción de adiponectina y, en turno, la insulino-sensibilidad, predisponiendo al organismo para el desarrollo de Síndrome Metabólico

0119 (510) TGF β 1 EN HIPÓFISIS DE RATONES DEFICIENTES DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO TIPO 2. M.C Guida¹, M V Recouvreux¹, D Becu-Villalobos¹, G Díaz-Torga¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Buenos Aires <clara_guida@hotmail.com>

Ha sido descripto que TGF β 1 posee acción inhibitoria sobre los lactotropos actuando a través de sus receptores tipo II (TGF β RII): inhibe la proliferación y la secreción de prolactina basal o inducida por estrógenos. Esta citoquina es sintetizada y secretada por los mismos lactotropos y un tratamiento estrogénico reduce la síntesis y secreción de TGF β 1 y la expresión TGF β RII en lactotropos. Recientemente se ha descripto que la inhibición de

la proliferación de células hipofisarias inducida por dopamina (DA) a través de su receptor tipo 2 (RD2), es mediada por TGF β 1. El objetivo de este trabajo fue evaluar la función y expresión hipofisaria de TGF β 1 en ratones hembra deficientes de RD2, que desarrollan espontáneamente prolactinomas. Los estudios fueron realizados comparativamente en ratones salvajes (WT) y en ratones carentes de RD2 (KO). En cultivo primario de células hipofisarias TGF β 1 inhibió la secreción de prolactina y la proliferación celular sólo en el grupo WT. Por ELISA se observó una menor expresión de TGF β 1 activo (libre) en hipófisis KO, sin encontrarse diferencias en la expresión de TGF β 1 latente (inactivo, unido a LAP = proteína de latencia), medido por western blot. En correlación la expresión del TGF β RII estaba disminuida en hipófisis de KO (western blot). Por último, demostramos que un tratamiento in vivo con haloperidol en animales WT reduce la expresión de TGF β 1 latente hipofisario. Nuestros Resultados demuestran claramente que la falta del RD2 modifica la expresión de TGF β 1 y su receptor en hipófisis. Ratones hembra KO expresan menos TGF β 1 activo y menos TGF β RII, lo que conduciría a una pérdida de la capacidad inhibitoria de la citoquina.

0120 (556) BISFENOL A ADELANTA LA MADURACIÓN SEXUAL EN RATAS HEMBRA. PROBABLE MECANISMO HIPOTALÁMICO MEDIADO POR AMINOÁCIDOS EXCITATORIOS. N.P Cardoso¹, B Szwarcfarb^{1,2}, M Pandolfi³, O Ponzó¹, S Carbone^{1,2}, M Aboud¹, P Sacchi^{1,2}, R Reynoso¹

¹Laboratorio de Endocrinología Departamento de Fisiología Facultad de Medicina UBA; ²CONICET; ³Laboratorio de Embriología Animal DBBE FCEyN UBA <ncardoso@fmed.uba.ar>

Bisfenol A (BPA) es un compuesto con actividad estrogénica utilizado en la fabricación de plásticos policarbonatos, posee efectos deletéreos sobre el eje reproductor en los individuos expuestos y en su progenie. La bibliografía sugiere que BPA actúa sobre el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal de ratas hembra modificando los procesos de maduración del mismo. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del BPA sobre la maduración del eje reproductor de ratas hembra peripúberes (30 días) expuestas al DE desde el inicio de la gesta y durante la lactancia. Se administró a la rata madre BPA en el agua de bebida (25mg/l) o etanol al 0.1% (grupo control), (n=10/grupo). Se determinó LH, FSH (RIA ng/ml); estradiol (ELISA pg/ml); liberación de Gn-RH, ácido glutámico (GLU) y aspártico (ASP) por hipotálamo medio basal y área preóptica anterior (RIA pg/HMB-APOA, HPLC nmol/HMB-APOA). Se evaluaron peso corporal y pesos relativos de útero y ovario. Se realizaron estudios histológicos de cortes de ovario y útero. Los niveles de LH y estradiol aumentaron significativamente en animales tratados, (Control: 11 ± 1.0 vs BPA: 40 ± 4.0 , $p<0.001$; Control: 20 ± 0.5 vs BPA: 40 ± 2.0 , $p<0.0001$), los de FSH mostraron tendencia al aumento pero no fue significativo. La liberación de Gn-RH y GLU aumentó significativamente, (Control: 0.11 ± 0.02 vs BPA: 0.35 ± 0.04 , Control: 9.0 ± 0.2 vs BPA: 13.0 ± 0.4 , $p<0.001$), mientras el de ASP no fue significativo. Los pesos corporales y los pesos relativos de ovario y útero no se modificaron con el tratamiento. El estudio histológico mostró mayor número de folículos maduros y mayor desarrollo de células de la teca y estroma ovárico, y presencia de epitelio cilíndrico en el útero de los animales tratados. Los Resultados obtenidos sugieren que BPA acelera la madurez sexual de la rata hembra. BPA actuaría a nivel hipotalámico estimulando la liberación de Gn-RH vía aminoácidos excitatorios, y de gonadotropinas hipofisarias las que estimularían el desarrollo ovárico.

0121 (584) IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA TIROPEROXIDASA HUMANA RESPONSABLES DE BOCIO CONGÉNITO Y DEFECTOS DE ORGANIZACIÓN DEL YODO. F S Belforte¹, M C Olcese¹, L Gruñero-Papendieck², A Chiesa², R González Sarmiento³, H M Targovnik^{1,3}, C M Rivolta^{1,3}

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

versidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ²Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET, División Endocrinología, Hospital de niños "Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina; ³Unidad de Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca, España <fiorellabelforte@hotmail.com>

Aproximadamente el 10% de los recién nacidos con hipotiroidismo congénito son incapaces de organificar yodo. Este bloqueo tiene una prevalencia de 1/30.000 nacidos y puede ser causado por defectos en la tiroxidasasa (TPO) o en las proteínas vinculadas con la generación de H₂O₂ (Sistema DUOX). El modo de herencia es autosómico recesivo. Se analizó una población de pacientes con bocio congénito y test de descarga de perclorato positivo, con el fin de identificar nuevas mutaciones y desarrollar nuevas herramientas diagnósticas. Se procedió al aislamiento de ADN genómico a partir de sangre periférica y a la amplificación por PCR de los 17 exones de la TPO incluyendo las regiones intrónicas flanqueantes. Los productos fueron analizados por la técnica de SSCP y aquellos que presentaban migración diferencial respecto a los controles fueron secuenciados. Se identificaron dos nuevas mutaciones c.796C>T, p.Q266X y c.2000G>A, p.G667D en los exones 7 y 11 respectivamente. El efecto deletéreo de la segunda mutación fue evaluado mediante la exploración del grado de conservación evolutiva de la Glicina de la posición 667 entre tiroperoxidases de distintas especies y mediante el análisis de predicción de la estructura proteica secundaria. El alineamiento de secuencias reveló que la Glicina se encuentra conservada estrictamente en todas las especies analizadas. Por otra parte la sustitución de aminoácido produce un cambio en la estructura secundaria proteica. Adicionalmente se han identificado dos polimorfismos descriptos, uno silencioso (c.1998C>T) en el exón 7 y otro en el exón 11 el cual reemplaza la Alanina de la posición aminoácida 257 por Serina (c.769G>T). El uso de las citadas técnicas de biología molecular constituyen una herramienta útil para la comprensión de la fisiopatología del hipotiroidismo neonatal de alta prevalencia y para mejorar el diagnóstico asegurando no sólo el tratamiento adecuado sino también el asesoramiento genético a las familias afectadas.

0122 (633) EFECTO DE LA HIPOXIA NEONATAL SOBRE LA SECRECIÓN DE PRL INDUCIDA POR ESTRÉS EN RATAS HEMBRA Y MACHO ADULTAS. G Jahn ¹, S R Valdez ¹, N M Torrecilla ¹, M E Ezquer ¹, A M Seltzer ²

¹Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET.; ²IHEM-CONICET. <gjahn@mendoza-conicet.gov.ar>

La hipoxia neonatal (HN) es frecuente en el nacimiento y sus consecuencias a largo plazo han sido poco estudiadas. Previamente observamos que la HN afecta transitoriamente la expresión de receptores esteroidales y opioides en el hipotálamo asociada a senescencia reproductiva prematura en ratas hembra. También hay cambios transitorios en la expresión de proteínas asociadas a la sinaptogénesis en SNC. Además, a los 3 meses de edad en los animales hipoxiados al 4to día postnatal (4DPN) se observó una disminución de la ansiedad en el test de exploración en la cruz elevada sin alteración en la memoria medida con el test de evitación pasiva. Estos hallazgos nos condujeron a evaluar los efectos de la hipoxia neonatal sobre la respuesta al estrés. Se determinó la secreción de PRL inducida por éter en ratas hembra y macho de 3 y 9 meses de edad. La HN se realizó por exposición de crías Sprague Dawley en 4DPN a una atmósfera de 6.5% de O₂ por 70 min. Los controles respiraron aire atmosférico. El estrés se indujo por inhalación de vapores de éter por 2 min y 5 min después se tomó sangre por la vena de la cola. Se determinaron los niveles séricos de PRL por RIA, expresados en ng/ml. En ratas controles hembra se observó la máxima respuesta al estrés en el día del estro y en las HN la respuesta estuvo atenuada (Control basal (Co Bas) 22±3; Estrés (Co Estrés) 210±31 vs HN bas 26±6; HN Estrés 60±14). En Proestro y Diestro no hubo

diferencias en la respuesta al estrés. A los 9 meses de edad, la PRL basal aumentó en HN y no hubo diferencias entre Co y HN estresadas (Co bas 21±4; Co Estrés 60±19 vs HN bas 41±8; HN Estrés100±24). Los machos HN de 3 meses tienen bloqueada la secreción de PRL (Co bas 9.2±1.6; Co estrés 34.0±4.9 vs HN bas 18.6±5.5; HN estrés 23.5±4.6), mientras que a los 9 meses no se observó respuesta en ambos grupos. Concluimos que la HN adelanta la disminución de la respuesta al estrés que se observa con la edad, en una magnitud que depende del ambiente esteroideal.

0123 (652) LOS ESTEROIDES SEXUALES MODULAN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES μ , δ OPIOIDES Y RPRL EN EL HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL (HMB) AL FINAL DE LA PREÑEZ EN LA RATA. C Villegas Gabutti ¹, G Jahn ¹, M Soaje ¹

¹Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CONICET <cmville@gmail.com>

En la preñez tardía, el Sistema Opiode (SO) inhibe la secreción de PRL en ausencia de progesterona (P₄). El bloqueo de P₄ por el antagonista Mifepristone (Mp) disminuye la expresión de ARNm de tirosina hidroxilasa (TH) y aumenta la del receptor de estrógeno α (RE α) en HMB facilitando la acción estimuladora de antagonista opioide naloxona (NAL) sobre los niveles séricos de PRL. Por otra parte, el tratamiento con el antiestrógeno tamoxifeno (Tm) los días 14-15 de preñez revierte la caída en la expresión de TH inducida por Mp y previene parcialmente el aumento de PRL inducido por Mp y NAL. **Objetivo:** Determinar si los tratamientos con Mp y/o Tm modulan la acción potenciadora de NAL sobre PRL sérica por medio de cambios en los niveles de expresión de los receptores μ y δ opioides (RO μ y RO δ), de PRL largo (RPRL_L) y de P₄ (RP₄) en HMB. Metodología: se usaron ratas preñadas tratadas con Tm ó vehículo (V) los días 14-15 (0.5 mg/kg, vo, 12.00 h), Mp ó V (5 mg/kg sc, 08.00 h, día 19). 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 β -actina de RO μ y RO δ , RPRL_L y del receptor de P₄ (RP₄) por RT-PCR semicuantitativa. Resultados: la administración de Mp a ratas tratadas con V aumentó significativamente la expresión del RPRL_L (V: 0.77 ± 0.03 n=9 vs Mp: 0.93 ± 0.05 n=8) y RP₄ sin modificar los RO μ y RO δ . Cuando Mp se administró a ratas tratadas con Tm disminuyó la expresión de RO μ (Tm: 0.44 ± 0.02 n=6 vs Tm+Mp: 0.27 ± 0.04 n=6) y del RO δ (Tm: 0.47 ± 0.01, n=9 vs Tm+Mp: 0.30 ± 0.03, n=9) y no modificó la expresión de RPRL_L. Tm solo no tuvo efecto. Conclusiones: 1) P₄ necesita de la acción estrogénica para bloquear la expresión de RPRL_L, 2) Mp puede inhibir la expresión de los RO μ y RO δ en presencia de Tm, 3) Los esteroides sexuales podrían regular la PRL sérica al final de la preñez modulando la expresión de los RO μ , RO δ y RPRL_L en HMB.

0124 (145) PREVENCIÓN POR TRATAMIENTO ANTICATABÓLICO DE LA PÉRDIDA DE MASA ÓSEA INDUCIDA POR BAJA INGESTA DE PROTEÍNAS Y DEFICIENCIA ESTROGÉNICA. C Marotte ^{1,2}, M M S Gonzales Chaves ^{1,2,3}, G G Pellegrini ^{1,3}, P Mandalunis ⁴, S M Friedman ^{2,3}, S N Zeni ^{1,2,3}

¹Sección Osteopatías Médicas-Hospital de Clínicas-Universidad de Buenos Aires; ²CONICET; ³Cátedra de Bioquímica General y Bucal-Facultad de Odontología-Universidad de Buenos Aires; ⁴Cátedra de Histología-Facultad de Odontología-Universidad de Buenos Aires <clarisa128@hotmail.com>

Además de calcio y vitamina D, la ingesta proteica es importante para la formación ósea ya que forma parte de la matriz orgánica de hueso, optimiza niveles de IGF1 y estimula la absorción intestinal de calcio. Los adultos mayores presentan baja ingesta de alimentos disminuyendo la ingesta proteica y otros nutrientes que junto a baja exposición solar incrementa prevalencia de osteopenia y riesgo de fracturas. Si bien existen estudios

experimentales de deficiencia proteica, todos ellos se realizaron en ratas macho. El objetivo de este estudio fue evaluar las alteraciones óseas producidas por ingesta proteica deficiente en ratas hembras ovariectomizadas (OVX) y la prevención por tratamiento con un aminobisfosfonato (BP) olpadronato (OPD) (Gador Arg). Se tomaron 30 ratas Wistar, 20 fueron OVX y el resto SHAM operadas. Durante los 15 posteriores a la cirugía recibieron una dieta comercial con 15% de proteínas (Pr); luego por 45 días se dividieron en 3 grupos: G1:OVX+2.5%Pr; G2:OVX+2.5%Pr+ OPD y G3:SHAM+15%Pr. La dosis de OPD fue 0.8 ug /100g de rata/semana intraperitoneal. En sangre se evaluó calcemia, osteocalcina (BGP), fosfatasa alcalina ósea (FAO) por colorimetría. Se realizó densitometría ósea de esqueleto total (DMOet) y DMOtibia por DXA y al final (Tf) volumen óseo (BV/TV) por histomorfometría. Resultados:(letras diferentes indican $p < 0.05$):

	G1	G2	G3
FAO Tf (UI/L)	74±11a	50±5b	45±4b
Calcemia (mg%) Tf	9.6±0.1a	8.7±0.1b	10.3±0.1c
BGP (ng/ml) Tf	131.0±15.1a	111.2±12.7b	178±55c
[DMOf -DMO basal] et (mg)	253±19a	1512±343b	2706±556c
[DMO f -DMO basal] tibia (%)	0.0±0.4a	22.0±2.1b	59.2±5.2c
BV/TV (%)	2.9±0.2a	7.1±0.9b	25.1±3.2c

G1 presentó valores de FAO, calcemia, BGP mayores y cambios en DMOs (tibia y et) y BV/TV menores que G3. El tratamiento con BP aumentó las DMOs y BV/TV sin alcanzar los niveles de G3 y redujo FAO, BGP y calcemia. Conclusiones: la pérdida ósea inducida por OVX y deficiencia proteica pudo prevenirse parcialmente por tratamiento anticatabólico.

FARMACOLOGIA O1

0125(82) EFECTOS DIFERENCIALES DE SILMARINA (SIL) Y SU COMPONENTE ACTIVO SILIBININA (SB) SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LA LISIS HEPATOCELULAR. C L Basiglio ¹, E J Sanchez Pozzi ¹, A D Mottino ¹, M G Roma ¹

¹INSTITUTO DE FISIOLÓGIA EXPERIMENTAL (IFISE-CONICET) <cbasigli@fbioyf.unr.edu.ar>

SIL es un extracto natural ampliamente utilizado como hepatoprotector. Está compuesto principalmente por flavonolignanos, siendo SB el más abundante. SB ha sido considerada responsable de la mayoría de sus propiedades beneficiosas, aunque esto no se ha corroborado sistemáticamente. Aquí analizamos comparativamente los efectos de SIL y SB sobre la estabilización de la membrana hepatocelular, uno de los principales mecanismos hepatoprotectores de SIL. La disrupción de membrana se evaluó *i*) en hepatocitos aislados, mediante la liberación de las enzimas citosólicas lactato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa, y *ii*) en membrana plasmática hepatocelular aislada, mediante el ensayo de auto-extinción de la fluorescencia de la sonda membranotrópica octadecilrodamina B. SIL (500 µM en SB) protegió en ambos modelos a la membrana plasmática del daño inducido por el detergente Tritón X-100 (TX-100) y por la sal biliar endógena tensioactiva tauroquenosoxicolato (TQDC). En cambio, SB (500 µM) exacerbó la disrupción de membranas aisladas inducida por TX-100 hasta la concentración del detergente que indujo máxima lisis hepatocelular, mostrándose como estabilizador sólo a concentraciones mayores de tensioactivo. Similarmente, SB, pero no SIL, exacerbó la lisis hepatocelular inducida por estrés osmótico. Cuando se utilizó TQDC como detergente, SB tuvo siempre un menor efecto estabilizador comparado con SIL en ambos modelos. Concluimos que SIL y SB tienen efectos diferenciales sobre la estabilidad de membrana: mientras que SIL muestra consistentemente efectos estabilizadores, SB puede exacerbar la

lisis hepatocelular (por ej., por TX-100 o estrés osmótico) o ejercer sólo mínimos efectos estabilizadores (lisis por TQDC). Tal efecto diferencial debe considerarse cuando se diseñan formulaciones alternativas de SIL conteniendo sólo SB (tendencia actual), ya que otros componentes de SIL pueden ejercer efectos hepatoprotectores que, incluso, contrarrestan efectos deletéreos de SB.

0126 (135) ACCIONES DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA SOBRE EL ENDOTELIO VASCULAR. M J Sandoval ^{1,2}, M B Rauschemberger ^{1,3}, P H Cutini ^{1,3}, V L Massheimer ^{1,3}

¹UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR; ²UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL FACULTAD REGIONAL BAHÍA BLANCA; ³CONICET <msandova@criba.edu.ar>

Diferentes líneas de investigación proponen que el fitoestrógeno (FE) Genisteína (Gen) ejercería una protección cardiovascular en mujeres postmenopáusicas. Nuestro objetivo fue evaluar los efectos de Gen en ciertos procesos celulares implicados en la homeostasis vascular: proliferación, migración, adhesión y apoptosis de las células endoteliales (CE). Se realizaron cultivos primarios de CE a partir de explantes de anillos de aorta de rata. Empleando la técnica incorporación de ³H-timidina se demostró que Gen estimula la proliferación a 24h de tratamiento (70 y 60 % s/C (sobre el control), Gen 0,01 y 0,1 nM, $p < 0,001$). A concentraciones mayores (1 y 10 nM) el efecto es inhibitorio (30 y 40% de inhibición, $p < 0,001$). La incubación con el antagonista del receptor de estrógeno ICI 182780 1µM suprimió la acción mitogénica de Gen 0,1 nM (80±3,5 vs 128±7,8; 78±3,7 vs 84±5,5 $\text{cmpx}10^3/\text{mg prot}$; C vs Gen/+ ICI, $p < 0,001$). La migración celular se estudió contando el nº de células movilizadas a través de un corte transversal de la monocapa. El FE estimuló la movilidad (24,4±3,3 vs 34,6±2,3 cél./campo, C vs Gen 0,1nM, $p < 0,05$). Empleando la técnica de fragmentación de ADN observamos que la Gen no promueve la apoptosis de CE. Por el contrario, la preincubación con Gen previo al tratamiento con H₂O₂ (inductor de muerte celular) previene el efecto proapoptótico del H₂O₂ 200 µM. Se estudió la adhesión de monocitos/macrófagos (m/mf) a las CE tratadas con FE. Los m/mf se aislaron de sangre entera por gradiente de densidad y posterior adhesión al plástico. Como C positivo de adhesión se usó el LPS bacteriano, observándose un incremento del 65% s/C luego de 21 h con el LPS 1µg/mL. La adición de Gen 10 nM 4h antes del tratamiento con LPS suprimió parcialmente su acción. Los Resultados presentados sugieren una acción potencialmente positiva de Gen sobre el endotelio vascular estimulando la proliferación y migración de las CE, y previniendo la inducción de adhesión leucocitaria y apoptosis.

0127 (170) EFECTO DE DENATONIO SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA Y EXPRESIÓN DE RECEPTORES T2R EN GLÁNDULA SUBMAXILAR MURINA. M C Dasso ¹, M E Castro ², R A Diez ¹, M E Sales ², M P Cecchini ³, F Merigo ³, A Sbarbati ³

¹Facultad de Medicina UBA; ²CEFYO-CONICET; ³Dipartimento Di Scienze Morfologico-biomediche, Sezione Di Anatomia E Istologia, Università Degli Studi Di Verona, Italia <maxdasso@yahoo.fr>

Se han descrito efectos específicos de compuestos amargos en tracto gastrointestinal y glándulas exócrinas. Previamente hemos demostrado que el compuesto amargo teofilina (TEO) inhibe la secreción de amilasa salival en glándulas submaxilares (GSM) murinas, tratadas *ex vivo* y evaluadas mediante un método colorimétrico la actividad de amilasa secretada (mg maltosa/min.g.tej.húm.) con respecto a la actividad enzimática total. Al igual que TEO, el compuesto sintético denatonio (DEN) inhibió la secreción de amilasa en forma concentración-dependiente, siendo 10⁻⁹M la concentración inhibitoria máxima (DEN: 0,144±0,015; Basal: 0,263±0,017; $p < 0,001$). Investigamos el rol de fosfolipasa C (PLC) y óxido nítrico sintasa (NOS) en el efecto de DEN (10⁻⁹M), tratando previamente las GSM con el inhibidor no selectivo de PLC, NCDC (10⁻⁹M) y de NOS, L-NMMA (10⁻⁴M). Tanto NCDC como L-NMMA revirtieron el efecto de DEN

(NCDC: $0,453 \pm 0,025$; $n=3$; L-NMMA: $0,343 \pm 0,023$; $n=3$; $p<0,001$). Además el agregado de DEN ($10^{-9}M$) a las GSM inhibió significativamente la producción de nitrito (mM/mg tej.húm.) ($31,8 \pm 8,5$; $n=3$) con respecto al control sin tratamiento ($67,2 \pm 5,2$; $n=3$) ($p<0,001$). Se ha demostrado que en células gustativas DEN activa (a diferencia de TEO, que puede atravesar la membrana celular) un receptor de membrana T2R acoplado a PLC para la señalización del gusto amargo. Hemos demostrado por WB e IHQ la expresión de estos receptores en GSM. Concluimos que DEN inhibe la liberación de amilasa en GSM por un mecanismo que sería T2R-dependiente, reduciendo la producción de óxido nítrico mediante la activación de PLC.

0128 (524) REGULACIÓN NEGATIVA DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA POR INHIBIDORES DEL NF- κ B. E Malaver ¹, M A Romaniuk ¹, L P D'Atri ¹, R G Pozner ¹, J Etulain ¹, R Benzádon ², M Schattner ¹

¹Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; ²Banco de Sangre, CEMIC <elisa.malaver@gmail.com>

Previamente demostramos que la inhibición específica de la activación del factor de transcripción NF- κ B con Bay 11-7082 (Bay) inhibe la función plaquetaria sugiriendo un novedoso rol no genómico de este factor de transcripción en la activación plaquetaria. En este trabajo profundizamos los mecanismos involucrados en la acción de este inhibidor. La formación de filopodios y lamelipodios asociados a la reorganización del citoesqueleto, son unos de los primeros cambios morfológicos que sufre la plaqueta estimulada. Ambos fenómenos fueron significativamente disminuídos en presencia de Bay (evidenciada por la polimerización de actina, microscopía de fluorescencia). La estimulación de plaquetas con agonistas clásicos promovió la activación de NF- κ B (determinada por la unión de NF- κ B a sus secuencias regulatorias en el ADN por ELISA, $n=3$) y la misma fue revertida por el Bay. Tanto la agregación inducida por ácido araquidónico (turbidimetría) como la liberación de ATP intraplaquetario (luminiscencia) y la formación de TXB₂ (ELISA) no fueron modificadas por el tratamiento con Bay indicando que la vía de la ciclooxigenasa no está comprometida. Sin embargo, la generación de TXB₂ mediada por agonistas que actúan a través de la liberación endógena de ácido araquidónico así como la actividad de PLA₂ (ensayo colorimétrico) mostraron una inhibición del $64 \pm 8\%$ y $25 \pm 7\%$ respectivamente ($n=3$, $p<0,05$). Los efectos mediados por Bay parecerían estar específicamente relacionados a la activación del NF- κ B ya que otro inhibidor de este factor de transcripción estructuralmente no relacionado con el Bay (Ro 106-9920), reprodujo todos los efectos antiagregantes obtenidos con el Bay. Estos Resultados sugieren que la activación del NF- κ B, probablemente a través de la interacción con la PLA₂, participa en la generación de respuestas efectoras de las plaquetas.

0129 (557) IDENTIFICACIÓN DE POTENCIALES AGENTES TERAPÉUTICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD HIDATÍDICA: IMPORTANCIA DE LA HOMEOSTASIS DE CALCIO EN ECHINOCOCCUS GRANULOSUS. P Lamenza ¹, G M Denegri ¹, A C Cumino ¹

¹Laboratorio de Zoonosis Parasitarias - FCEyN - Universidad Nacional de Mar del Plata <acumino@gmail.com>

El tratamiento quirúrgico de la hidatidosis involucra el uso de algunos agentes escolicidas efectivos contra protoescolices de *Echinococcus granulosus*, estadio en el que este cestode puede ser diseminado en la cavidad peritoneal durante la cirugía causando potenciales reinfecciones en los pacientes. Actualmente, ningún agente escolicida es completamente eficaz para provocar mortalidad intraquistica de protoescolices en humanos. En este parásito, estudiando los procesos dependientes de las señales de calcio, hemos reportado efecto antihelmíntico con drogas que alteran los niveles de calcio intracelular. El objetivo de este trabajo fue identificar entre diferentes compuestos inhibidores de la corriente de calcio celular previamente aprobados por FDA para el tratamiento

de otras enfermedades humanas, el posible efecto tóxico de los mismos sobre protoescolices en cultivo *in vitro*. Fueron realizados experimentos frente a distintas dosis y períodos de incubación con 9 drogas, determinándose DL50 para loperamida, tamoxifeno, amiodarona y trifluoperazina. El aumento de calcio intracelular fue determinado mediante experimentos fluorométricos con fluoroscan y microscopía confocal con Fluor3-AM. Los procesos de alteración morfológica temprana fueron registrados mediante microscopía electrónica de barrido, determinándose 100% de mortalidad de los protoescolices después de 12 hs de incubación con estas drogas. Consistente con recientes estudios que involucran a la movilización de calcio en la regulación de los procesos de autofagia (Zhang *et al.*, 2007) fueron realizados experimentos para determinar la actividad metabólica de lisosomas intactos mediante coloración vital y localización por microscopía confocal con naranja de acridina y determinación de fosfatasa ácida total, utilizando rapamicina como posible control positivo. Futuros experimentos *in vivo* en modelos animales permitirán diseñar posibles protocolos para tratamientos clínicos en humanos.

0130 (314) EFECTO DE LAS PROTEÍNAS SÉRICAS SOBRE LA ESTRUCTURA – ACTIVIDAD DEL SURFACTANTE PULMONAR EXÓGENO. M M Martínez Sarrasague ¹, G Facorro ¹, A Cimato ¹, T Poklópovich ¹, F Massot ¹, M Cassanelli ¹, F Capani ², E Rubín de Celis ¹

¹Cátedra de Física Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA; ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA <marga@ffyba.uba.ar>

El surfactante pulmonar está constituido por una mezcla de fosfolípidos y cuatro proteínas, dos de ellas esenciales para su función tensioactiva. Coexisten en él dos formas, la fracción pesada o activa y la liviana o inactiva. Las proteínas séricas comprometen severamente la función biofísica del surfactante. En el presente trabajo se analizaron *in vitro* los efectos de albúmina (BSA) y suero sobre la tensión superficial, la microviscosidad, la estructura y la composición de ambas fracciones del surfactante pulmonar exógeno (SPE) Prosurf®. El coeficiente de tensión superficial (CTS) y el porcentaje de reducción del área de burbuja (%DA₁₀) se obtuvieron con un surfactómetro de burbuja pulsátil. Los cambios estructurales se analizaron por espectroscopía de espín electrónico (ESR) y microscopía electrónica (técnica osmio-uranilo-citrato de plomo). La composición del SPE nativo y de sus fracciones fue analizada por TLC reveladas con Yodo y ninhidrina. La adición de proteínas ($cc > 10$ mg/ml) incrementó el CTS (4.2 ± 0.1 a 17.5 ± 0.1 mN/m; $p < 0.01$), y aumentó el %DA₁₀ (40 ± 3 a 46 ± 4 %, $p < 0.01$). El porcentaje de fracción activa, obtenida por centrifugación, disminuyó en presencia de suero o BSA, aumentando la inactiva en el sobrenadante. El análisis de ESR del SPE nativo, con 5 y 16 doxilesteárico como marcadores de espín, mostró que la fracción inactiva presenta mayor fluidez. La adición de albúmina o suero modificó los perfiles espectrales, evidenciando cambios que se correlacionan con las alteraciones de la estructura y la funcionalidad. Las TLC mostraron igual patrón de lípidos para el SPE nativo y su correspondiente precipitado, los sobrenadantes presentaron cambios en la composición fosfolípídica. El agregado de suero y BSA alteró la intensidad y la morfología de las manchas. Los Resultados obtenidos indican que la interacción de suero o BSA produciría una desorganización en la estructura nativa del SPE responsable de la pérdida parcial de su actividad biológica.

0131 (467) ALTA EXPRESIÓN DE MDR-1, EPO-R Y HIF-1A EN CARDIOMIOCITOS DE RATAS SOMETIDAS A UN MODELO DE APNEA DEL SUEÑO POR HIPOXIA INTERMITENTE. R AvilésReyes ¹, A Merelli ¹, M F Angelo ¹, A Lazarowski ², A J Ramos ¹

¹Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof De Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ²INFIBIOC Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires <raviles@fmed.uba.ar>

La apnea del sueño (AS) es una interrupción respiratoria prolongada, involuntaria, transitoria por trastornos obstructivos o por fallo del control cerebral, produciendo hipoxia intermitente. La AS afecta a 4% de hombres y 2% de mujeres mayores de 40 años. El objetivo de este trabajo fue verificar si la exposición a hipoxia intermitente (HI) induce cambios en la expresión del factor de transcripción sensible a la hipoxia HIF-1 α y de otros genes HIF-1 α dependientes con capacidad antiapoptótica como EPO-R (receptor de eritropoyetina) y MDR-1 (resistencia múltiple a drogas) en cardiomiocitos. Para ello se expuso a HI a ratas cepa Wistar colocándolas en una cámara de hipoxia donde se alternó la condición hipoxica (90% N₂; 10% O₂) con normoxia (21%O₂; 79% N₂), en ciclos de 6 min durante la fase del sueño de las ratas durante 10 días. Luego se sacrificaron los animales y se realizó inmunocitoquímica para los marcadores antes mencionados. Los Resultados mostraron que la expresión de HIF-1 α en cardiomiocitos se incrementa por la exposición a HI. La expresión de MDR-1 y EPO-R están prácticamente ausentes en animales sometidos a normoxia, mientras que la exposición a HI induce la expresión de MDR-1 y EPO-R. La aparición de estos productos proteicos es probablemente consecuencia de la activación de HIF-1 α , ya que sus promotores son blancos moleculares de este factor de transcripción. La inducción de la expresión de MDR-1 en hipoxia focal continua tanto en cerebro como en corazón había sido previamente demostrada (Lazarowski et al., 2007). Debido a la estrecha relación de MDR-1 y EPO R con la sobrevida celular, especulamos que estos genes podrían ser responsables en parte de la mejor sobrevida que muestran pacientes apneicos a episodios de isquemia posteriores, probablemente por mecanismos conocidos como preconditionamiento o tolerancia hipoxica. Adicionalmente La expresión del EPO-R podría indicar una incrementada sensibilidad a la EPO liberada por la HI.

0132 (583) PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES AT₁ DE ANGIOTENSINA II CEREBRAL EN LOS CAMBIOS NEUROQUÍMICOS Y CONDUCTUALES A LARGO PLAZO INDUCIDOS POR ANFETAMINA. M.C Paz¹, R J Cabrera², L M Cancela³, C Bregonzio³

¹Departamento de Farmacología Facultad de Ciencias Químicas UNC IFEC-CONICET; ²Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo (IMBECU)-Laboratorio de Investigaciones Neuroquímicas Comportamentales y Endócrinas (LINCE), Facultad de Ciencias Médicas de la universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.; ³Dpto. Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas UNC, IFEC-CONICET. Ciudad Universitaria Córdoba. <mcpaz@fcq.unc.edu.ar>

Los psicoestimulantes inducen sensibilización conductual, neuroadaptación que implica cambios celulares y moleculares en sistemas dopaminérgicos y glutamatérgicos. Las evidencias muestran que Angiotensina II cerebral interactúa con la neurotransmisión dopaminérgica a través de receptores AT₁. Nuestro objetivo fue evaluar la participación del sistema renina angiotensina (RAS) cerebral en este fenómeno. Ratas macho Wistar 300-350g tratadas por 5 días con candesartan, antagonista AT₁ 3mg/kg po y 24 h después de la última administración recibieron anfetamina (ANF) 5 mg/kg ip. Los controles recibieron vehículo e inyección de salina. Tres semanas después se monitoreó la actividad locomotora inducida por ANF 0.5 mg/kg ip. Otro grupo fue implantado en estriado ventral con cánula de microdialisis y se cuantificó *in vivo* por HPLC liberación de dopamina basal e inducida por ANF 0.5 mg/kg. En otro grupo se extrajo el cuerpo estriado y se cuantificó liberación de 3H-DA en respuesta a K⁺ 28 mM. Por inmunohistoquímica se evaluaron cambios en receptores AT₁ en distintas áreas cerebrales. El bloqueo de receptores AT₁ atenuó en forma significativa la sensibilización conductual y neuroquímica a ANF. Candesartan bloqueó el aumento inducido por ANF en la liberación de 3H-DA *in vitro* en respuesta a K⁺. ANF aumentó en forma significativa la densidad de receptores AT₁ en cuerpo estriado dorsal, ventral y amígdala que se acentuó por una segunda exposición al psicoestimulante. Los Resultados muestran una fuerte participación

de RAS a través de receptores AT, en el fenómeno de sensibilización. La discusión se realiza en relación a los mecanismos de acción de RAS: liberación de DA, control de la neurotransmisión noradrenérgica central y activación del eje HHA. La sensibilización juega un rol clave en el desarrollo de adicción y recaída a drogas de abuso y es importante el aporte de nuevas herramientas farmacológicas para el tratamiento de esta creciente patología

FARMACOLOGIA P1

0133 (49) SILENCING THE ANDROGEN RECEPTOR: NEW SKILLS FOR OLIGONUCLEOTIDE SKIN AND HAIR THERAPY. A.V Dugour¹, K Hagelin¹, C Smus¹, M E Balaña¹, N Kerner¹

¹Fund. Pablo Cassara <adugour@fundacioncassara.org.ar>

La alopecia androgenética (AGA) es una condición dermatológica común que afecta a hombres y mujeres. Los niveles de andrógeno se correlacionan directamente con la caída del cabello. Reducir la expresión génica del receptor de andrógeno (RA) localmente provee una mejor estrategia para el tratamiento tópico de AGA y otros desórdenes de la piel ligados a andrógenos. OBJETIVOS: Evaluar el efecto de oligonucleótidos antiandrogénico (ODNs) sobre la expresión del RA en papilas dérmicas (DPC) y en fibroblastos de piel (FP) para establecer nuevas estrategias terapéuticas dermatológicas. Analizar la penetración cutánea de una formulación liposomal con oligonucleótidos antisense (AS) en piel de ratón. METODOS: Las células PC3RAII, DPC y FP se transflectaron con AS o con pequeños RNA de interferencia (siRNA) contra el RA mediante diversos Metodologías de transfección. Se evaluó el efecto sobre la expresión del RA mediante RT-PCR, inmunoblotting y expresión del gen reportero luciferasa. Se utilizó microscopía confocal de escaneo láser para monitorear la transfección y microscopía de fluorescencia para evaluar la penetración cutánea de los AS en piel de ratón. Resultados: La estimulación con DHT de genes respondedores de andrógeno fue inhibida por AS y siRNA. Los niveles del RA y mRNA se redujeron por tratamiento con ODNs. Solo las regiones blanco reconocidas por los AS en el mRNA fueron también accesibles al clivaje inducido por siRNA. La formulación liposomal testada mostró una buena eficacia en DPCs. La penetración de los AS se logró mediante el uso tópico de dicha preparación liposomal. Conclusión: Este estudio confirma que ciertos dominios accesibles a los AS y siRNA permiten la inhibición de la expresión del RA en DPC y FP. Estos ODNs tendrían un potencial terapéutico para el tratamiento local de enfermedades de la piel relacionadas con el metabolismo androgénico. Las formulaciones liposomales podrían ser útiles para el tratamiento tópico de dichas patologías.

0134 (111) MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE P-GLICOPROTEÍNA INTESTINAL EN DIFERENTES TRATAMIENTOS CON PARACETAMOL. C.I Ghanem^{1,2}, G Delli Carpini², S M Villanueva³, A Arias³, A Novak², A D Mottino³, M C Rubio¹

¹Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA) CONICET-UBA; ²Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.; ³Instituto de Fisiología Experimental (IFISE) CONICET-UNR. <cghanem@ffy.uba.ar>

P-glicoproteína (P-gp), transportador ABC expresado en membrana apical intestinal, disminuye la absorción de numerosas drogas de uso terapéutico. El uso de paracetamol (P) como analgésico y antipirético es cada vez más difundido pero su efecto sobre la barrera intestinal mediada por P-gp se desconoce. Objetivo: Evaluar el efecto de P sobre la expresión y actividad de P-gp intestinal en ratas. Metodologías: Grupos experimentales: P1D: ratas Wistar machos recibieron una dosis única de P (1 g/kg, i.p.); P3D: ratas Wistar machos recibieron dosis crecientes de P por 3 días consecutivos (0.2, 0.3 y 0.6 g/kg, i.p.); C: Recibieron sólo vehículo. A las 24 h se evaluó la actividad de P-gp en sacos intestinales evertidos

usando rodamina 123 (Rho, 15 μM) como sustrato, en presencia o ausencia de su inhibidor selectivo verapamilo (100 μM). La expresión/localización de P-gp se estimó por western-blot e inmunofluorescencia. Resultados: La actividad intestinal de P-gp se incrementó en los grupos P1D y P3D vs C (nmol Rho/40min/g intestino: P1D=2.6 \pm 0.3, P3D=1.5 \pm 0.3 y C=1.1 \pm 0.3; $p < 0.05$, n=6). La cinética de excreción fue lineal (20-40 min) y su pendiente expresada en nmol Rho /min/g intestino se incrementó en P1D (0.085 \pm 0.005) y P3D (0.060 \pm 0.003) respecto de C (0.046 \pm 0.004), $p < 0.05$, n=6. La presencia de verapamilo abolió estas diferencias, confirmando el rol de P-gp. La expresión intestinal por western-blot también se incrementó en ambos grupos con respecto al control (P1D=188 \pm 25 %, P3D=233 \pm 19% y C=100 \pm 25%; $p < 0.05$; n=3). Estos Resultados fueron confirmados por inmunofluorescencia, observándose localización apical de P-gp en todos los casos. **Conclusión:** Se demuestra que P induce la expresión y actividad de P-gp intestinal, tanto en el tratamiento tóxico como en respuesta a dosis que no producen toxicidad aparente, significando un aumento en la función de barrera intestinal mediada por P-gp. Proyectado a humanos, esto conllevaría a una interacción droga-droga con otros sustratos de P-gp.

0135 (374) INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COX1/INOS MRNA CEREBRAL POR ANTICUERPOS DE PACIENTES ESQUIZOFRÉNICOS. S B Ganzinelli ¹, E Borda ¹, L Sterin-borda ¹

¹Cátedra de Farmacología. Facultad de Odontología. UBA <sbganzinelli@yahoo.com>

La actividad muscarínica cerebral esta asociada a la modulación de funciones cognitivas que están alteradas en el síndrome esquizofrénico. Previamente demostramos la existencia de IgG sérica en pacientes esquizofrénicos que interactúan con receptores muscarínicos del subtipo M₁ (M₁AChR) de la corteza frontal del cerebro de rata. En este trabajo estudiamos mediante técnicas de RT-PCR la inducción de enzimas proinflamatorias y por dosajes enzimáticos las vías de señalización intracelular disparadas por dichos anticuerpos sobre el M₁AChR. La IgG de los pacientes esquizofrénicos fue purificada en columna de afinidad unida covalentemente a un péptido sintético de secuencia aminoácida correspondiente al segundo dominio extracelular del M₁AChR humano (IgG pM₁). La interacción de IgG pM₁/M₁AChR generó un incremento dosis dependiente de PGE₂ (Emax 210 \pm 25%; n=7) y la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS) (Emax 208 \pm 26%; n=6), existiendo correlación positiva entre ambos efectos (\hat{a} =0.05). La inhibición de fosfolipasa C, calcio/calmodulina, proteína quinasa C e iNOS, con U73122 (5x10⁻⁶M), TFP (5x10⁻⁶M), staurosporina (10⁻⁶M) y aminoguanidina (10⁻⁶M) bloquearon la PGE₂ y NOS, respectivamente. La inhibición de la FLA₂ (OBAA, 2x10⁻⁶M) y COX₁ (FR 122047, 5x10⁻⁶M) pero no la COX₂ (Dup 697, 5x10⁻⁶M) previno el incremento de PGE₂ generado por la IgG pM₁. Por RT-PCR se observó que la IgG pM₁ (10⁻¹⁰M) potenció los efectos de pilocarpina (10⁻⁶M) en cuanto a la expresión de cox₁/inos mRNA. Como control, la fracción excluida de la columna, la IgG normal o IgG anti pM₃ resultaron inactivas en el sistema. Se sugiere que los anticuerpos séricos de pacientes esquizofrénicos potencian la inducción de cox₁/inos mRNA por pilocarpina con incremento de PGE₂ y ON, los cuales pueden, en parte, ser responsables de la inflamación cerebral descrita en esta patología.

0136 (384) INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE RODAMINA 6G POR EL FLAVONOIDE 6PP Y FLUCONAZOL EN CANDIDA ALBICANS. M A Peralta ^{1,2}, M Calise ³, G Ortega ^{1,2}, C Fornari ³, V Berardi ³, J L Cabrera ^{1,2}, R Diez ³, C Perez ⁴

¹Farmacognosia, Fac. Ciencias Químicas, U.N.C.; ²IMBIV (CONICET); ³Farmacología, Facultad de Medicina, U.B.A.; ⁴Farmacología, Fac. de Odontología, U.B.A. <marianaperalta@yahoo.com>

Previamente demostramos la actividad antimicótica de 2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (6PP) sobre

microorganismos resistentes de origen nosocomial. Este flavonoide aislado de la leguminosa cordobesa *Dalea elegans* también inhibe enzimas mitocondriales generadoras de energía. Un mecanismo importante de resistencia es la expulsión de antimicrobianos mediada por transportadores, cuya inhibición incrementa la concentración intracelular de estos fármacos y consecuentemente revierte la resistencia. Dado que algunos flavonoides antimicrobianos son también inhibidores de transportadores, se evaluó el efecto del 6PP sobre el transporte de antimicóticos imidazólicos. Para ello, se midió la extrusión de rodamina 6G (Molecular Probes) en *Candida albicans* resistente a azoles. Esta cepa, aislada de la cavidad bucal, fue donada por el Dr. T. White (Universidad de Washington, EE.UU.) y expresa transportadores de tipo CDR1, CDR2 y MDR1. Se midió la intensidad de emisión en FL1 en levaduras incubadas en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de 6PP y fluconazol a través de un citómetro de flujo Facscan (Becton-Dickinson). Los datos fueron analizados con Graphpad Prism (Graphpad Software, La Jolla, CA, EEUU). La fluorescencia espontánea de las levaduras equivale al 3 % de la generada por la rodamina retenida tras la primera incubación y el 11 % de la segunda. Entre 1 y 1.000 μM , tanto el 6PP como el fluconazol inhiben el eflujo de rodamina en forma dependiente de la concentración. Los datos experimentales pueden ajustarse a una función michaeliana cuyos parámetros para el flavonoide y el antimicótico imidazólico, respectivamente, son: inhibición máxima: 45,46% y 41,42%; K_i aparente 42,95 μM y 107,81 μM . Los Resultados son compatibles con la inhibición de uno o más transportadores de rodamina por 6PP y fluconazol y sugieren la necesidad de evaluar un eventual sinergismo del flavonoide prenilado con los antimicóticos imidazólicos.

0137 (389) CICLO REDOX MICROSOMAL DE TRES NAFTOFURANQUINONAS CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA. M I Taboas ¹, I Elingold ¹, M Casanova ¹, M Galleano ², R Silva ³, A Ventura Pinto ³, M Dubin ¹

¹CEFYO, Facultad de Medicina, UBA-CONICET; ²Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET; ³Universidade Federal Fluminense, Nucleo de Pesquisas em Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil <melmac84@hotmail.com>

El mal de Chagas es una enfermedad endémica que se distribuye por toda América. Teniendo en cuenta que no se dispone de un tratamiento eficaz para esta enfermedad, la búsqueda de alternativas terapéuticas es de urgente necesidad. En el presente trabajo estudiamos el ciclo redox de tres naftofuranquinonas, lipofílicas, con actividad tripanocida, 2-iodometil-2,3-dihidro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona (compuesto #3); 2-iodometil-2,3-dihidro-nafto[1,2-b]furan-4,9-diona (#4) and 2-metil-2,3-dihidro-nafto[1,2-b]furan-4,9-diona (#5), en microsomas de hígado de rata. Todos los compuestos estudiados: a) inhibieron la lipoperoxidación enzimática, NADPH-dependiente, catalizada por hierro, en función de la concentración, 0.001-1 μM ; b) no inhibieron la lipoperoxidación iniciada por hidroperóxido de *ter*-butilo, en ausencia de NADPH, observándose inhibición en presencia de NADPH; c) en la lipoperoxidación iniciada por ascorbato sólo el compuesto 5 inhibió la lipoperoxidación, 0.01-1 μM ; d) las tres naftofuranquinonas estudiadas estimularon significativamente la oxidación de NADPH, el consumo de oxígeno microsomal y la producción de anión superóxido, en función de la concentración de droga; e) en presencia de ascorbato, las drogas incrementaron la captación de oxígeno; f) por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica, en presencia de NADPH, se detectó una señal correspondiente a un quintuplete con constantes de splitting que pueden ser atribuidas a 4 protones aromáticos y serían consistentes con los protones C7-C10 del anillo naftaleno, común a las tres drogas, indicando la formación del radical semiquinona. Estos Resultados sugieren, que en nuestras condiciones experimentales, las naftofuranquinonas estudiadas inhiben la lipoperoxidación microsomal hepática por desvío de equivalen-

tes de reducción del NADPH al oxígeno. Financiado por: 1) CONICET-PIP 6100- 2) UBACyT B802

0138 (399) PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS TIROSINAS FOSFATASAS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE BISFOSFONATOS EN CÉLULAS ÓSEAS. V A Lezcano ¹, A Colicheo ¹, L Plotkin ², T Bellido ², R Boland ¹, S Morelli ¹

¹Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur; ²Dept. Anatomy and Cell Biology, Indiana University. Indianapolis, Indiana <vlezcano@criba.edu.ar>

Los bisfosfonatos (BPs), análogos sintéticos de los pirofosfatos inorgánicos naturales, son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de osteoporosis y otras osteopatías donde la resorción ósea es mayor que la osteogénesis. La inhibición de la actividad de los osteoclastos por los BPs se ha caracterizado extensivamente, pero estudios recientes han revelado que estos compuestos ejercen efectos en otras células óseas vía mecanismos aún no totalmente elucidados. Se ha reportado que los BPs inhiben la apoptosis de osteocitos y osteoblastos a través de la apertura de hemicanales de conexina (Cx) 43 y la activación de quinasas reguladas por señales extracelulares ERKs. En este trabajo se investigó si la unión a Cx43 está involucrada en la acción de los BPs. Ensayos de ligado competitivo usando [3H]-alendronato demostraron sin embargo la presencia de un sitio de ligado específico y saturable de alta afinidad en células de osteosarcoma de rata ROS 17/2.8 y osteoblastos derivados de calvaria que expresan Cx43 así como en células HeLa que no expresan Cx43. De relevancia, sustratos de proteínas fosfatasa desplazaron el ligado de [3H]-alendronato e inhibieron el efecto antiapoptótico del BP en células HeLa transfectadas con Cx43. Ensayos de co-inmunoprecipitación evidenciaron la asociación de Cx43 con la proteína tirosina fosfatasa (PTP) mu en células ROS 17/2.8. Análogamente al BP, el inhibidor de PTPs Na₂VO₄ incrementó la proliferación de células que expresan o no Cx43. Por otro lado, el BP inhibió la actividad de PTPs en osteoblastos ROS 17/2.8 igual que el Na₂VO₄. Estos Resultados sugieren que los bisfosfonatos se unen a PTPs, las cuales se asocian con Cx43, activando a su vez vías de señalización intracelular en osteoblastos y osteocitos.

0139 (449) DETECCIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CARBOXIPEPTIDASA A EN UN EXTRACTO ACUOSO DE BROMELIA HIERONYMI MEZ (BROMELIACEAE), CON POSIBLE APLICACIÓN TERAPÉUTICA EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. M A Bruno ¹, S A Trejo ², M E Errasti ¹, N O Caffini ¹, L M I López ¹

¹Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; ²Instituto de Biotecnología y Biomedicina (IBB), Universidad Autónoma de Barcelona <brunomariela@biol.unlp.edu.ar

La Enfermedad de Chagas, causada por el protozoario parásito *Trypanosoma cruzi*, es una patología endémica prevalente en toda Iberoamérica que afecta al menos a 16 millones de personas, estando en riesgo de contraerla más de 100 millones. No existe una vacuna y las fármacos con que se cuenta para combatirla presentan diversas reacciones indeseables. Entre las proteínas consideradas como posibles blancos para el desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos, las proteasas del parásito representan un grupo relevante: recientemente se han identificado dos carboxipeptidasas de las que se conocen muy pocos inhibidores. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A en extractos obtenidos a partir de *Bromelia hieronymi* Mez, una especie vegetal autóctona del norte argentino, con la finalidad de obtener una preparación capaz de inhibir carboxipeptidasas con fines terapéuticos. Se obtuvieron dos extractos a partir de *B. hieronymi*: un extracto proteico acuoso parcialmente purificado obtenido a partir de frutos

inmaduros enteros y otro obtenido triturando las semillas en presencia de nitrógeno líquido. Para la determinación de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A se utilizó una preparación comercial de esta enzima y el sustrato N-(4-metoxifenilazofornil)-Phe-OH disuelto en dimetilsulfóxido (50 mM), utilizando buffer Tris-HCl 0,05M (pH 7,5) conteniendo NaCl 0,1M como medio de reacción. Las hidrólisis del sustrato fue seguida midiendo la disminución de absorbancia a 420 nm en función del tiempo, en presencia o ausencia de las muestras vegetales a ensayar. El análisis de los Resultados permitió detectar una intensa actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A en el extracto de frutos (80% de inhibición), mientras que el extracto de semillas no presentó actividad inhibitoria. El extracto de frutos de *B. hieronymi* constituye una muestra promisoría para ser utilizada como inhibidor de carboxipeptidasas.

0140 (454) SEÑALES ENZIMÁTICAS INVOLUCRADAS EN LA PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS GINGIVALES HUMANOS POR ANESTÉSICOS LOCALES. B Orman ¹, G E Quinteros Villarruel ¹, L Sterin-borda ^{1 2}

¹Cátedra de Farmacología. Facultad de Odontología. UBA; ²conicet <betinaorman@yahoo.com.ar>

Los fibroblastos son células fundamentales para la reparación de las heridas y remodelamiento tisular. Están regulados por enzimas capaces de intervenir en la migración celular, en la remodelación de la matriz extracelular y en la proliferación celular. Por su parte los anestésicos locales son las drogas más usadas en la Odontología, siendo la lidocaína la droga patrón del grupo de las amidas. En este trabajo mediante la incorporación de timidina tritiada se estudio el efecto proliferativo de la lidocaína sobre la proliferación de cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos, la actividad de PKC por ELISA y de Na⁺/K⁺/ATPasa por actividad enzimática. Se observó que la lidocaína a concentraciones crecientes (10⁻¹¹ a 10⁻⁷M) dispara el incremento de la proliferación celular dependiendo de la dosis alcanzando un máximo de 128,6 % ± 13 (n=9) con 10⁻⁸M. Este efecto se correlacionó con un incremento de la actividad de la proteína quinasa C (PKC) de 150% ± 12 (n=7) y un incremento de la actividad de Na⁺/K⁺/ATPasa de 45% ± 5 (n=7) a 10⁻⁸M de lidocaína. Por su parte, la inhibición del flujo de calcio con verapamilo (1x 10⁻⁶M) y de la actividad de calcio-calmodulina por trifluoperazina (5x10⁻⁶ M) inhibió la actividad de la PKC, de la Na⁺/K⁺/ATPasa y de la proliferación inducida por lidocaína. Asimismo, la inhibición de la PKC por staurosporina inhibió la proliferación celular y la actividad de Na⁺/K⁺/ATPasa. Por último, la inhibición de la Na⁺/K⁺/ATPasa con ouabaína inhibió en forma concentración dependiente el efecto estimulador de la lidocaína sobre la proliferación celular. Se concluye que la lidocaína a concentraciones terapéuticas estimula la proliferación de los fibroblastos de gingiva humana por un mecanismo PKC y Na⁺/K⁺/ATPasa dependiente. En este proceso los flujos de cationes monovalentes y bivalentes estarían directamente involucrados.

0141 (518) CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ANTIDEPRESIVO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS POLIINSATURADOS OMEGA-3 Y DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON EL ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA: PARTICIPACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN N-CADHERINA Y NCAM. C Laino ^{1 2}, M F Podestá ², A Reinés ²

¹Universidad Nacional de La Rioja; ²Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, UBA-CONICET), Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <carloslaino2001@yahoo.ca>

La depresión es una patología con una elevada morbilidad. Desafortunadamente los tratamientos existentes presentan una elevada tasa de resistencia y un amplio espectro de efectos adversos. El cerebro contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, como los ácidos grasos omega-3 (ω-3),

los cuales son ácidos grasos esenciales, y deben ser incorporados con la dieta. Recientes investigaciones han indicado un importante rol de estos ácidos grasos ω -3 en el funcionamiento del SNC y en la fisiopatología y el tratamiento de varias enfermedades neuropsiquiátricas. El propósito del presente trabajo fue determinar si los ácidos grasos ω -3 o una combinación de ω -3 con el antidepresivo fluoxetina (FLX) durante 16 días, producían efectos antidepresivos en el modelo experimental de depresión "Forced Swimming Test" (FST). Se estudiaron también los niveles hipocámpales de las moléculas de adhesión N-cadherina y NCAM en las fracciones de membrana de baja densidad insolubles en Tritón X-100 (FMIT). La dieta con ω -3 aumentó significativamente el tiempo de nado durante el FST, en forma dosis-dependiente, indicando así sus efectos antidepresivos. Además, el tratamiento con FLX (1 mg/kg/día) (dosis sin acción antidepresiva) potenció el efecto antidepresivo observado con la dieta ω -3 (0.72 g/kg/día). En cambio, dosis mayores de FLX (10 mg/kg/día) tuvieron un efecto antidepresivo aditivo al de la dieta ω -3. En estas condiciones experimentales, tanto los ω -3 como la FLX (10 mg/kg/día) disminuyeron la presencia de la molécula de adhesión NCAM en las FMIT, mientras que el tratamiento combinado indujo un descenso mayor al de los efectos individuales. Nuestros Resultados sugieren que la potenciación de FLX con ω -3 podría representar una estrategia para el tratamiento antidepresivo, y que su mecanismo de acción, al igual que para la FLX, podría involucrar cambios en la compartimentalización de moléculas que participan en el remodelado sináptico.

0142 (623) PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO INHIBIDOR DE TRIPSINA. C M Lazza¹, L Pistaccio², W D Obregón¹, S Trejo³, N Ghiano¹, M J Torres¹, N Caffini¹, L López¹

¹Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIProVe); ²Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata; ³Institut de Biotecnología i Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona. España <lazzacmartin@yahoo.com.ar>

El control de la proteólisis representa una herramienta terapéutica valiosa, habiendo probado su utilidad no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos. Los inhibidores de proteasas tienen promisorios usos en el tratamiento de enfermedades como cáncer, infecciones parasitarias, fúngicas y virales, afecciones inflamatorias, inmunológicas y respiratorias, desórdenes neurovegetativos y trastornos en el sistema de coagulación-fibrinólisis. Se han descrito inhibidores de proteasas de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos. El objetivo del trabajo fue aislar un nuevo inhibidor de proteasas de origen vegetal, caracterizarlo y evaluar su actividad. A partir de semillas de la especie *Maclura pomifera* (Moraceae) se ha obtenido un homogenato en medio buffer que fue clarificado por centrifugación rindiendo un extracto crudo en el que se detectó una elevada actividad inhibitoria (97%) de la proteasa serínica tripsina, utilizando *N-benzoil*-arginina-p-nitroanilida como sustrato. El extracto fue purificado por precipitación acetónica, cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico. A través de este esquema de purificación se obtuvo un nuevo inhibidor de tripsina, cuya pureza fue evaluada por SDS-PAGE, isoelectroenfoque y espectrometría de masas (MALDI - TOF). La masa molecular es de 6,5 KDa, el pI 5,2 y la secuencia N-terminal no presenta homología con los otros inhibidores de tripsina aislados hasta el momento. Se han realizado los ensayos de coagulación sanguínea típicos para detectar actividad inhibitoria en el sistema coagulación-fibrinólisis, obteniéndose un alargamiento significativo en el tiempo de tromboplastina parcial activado lo que indica la inhibición de alguna de las proteasas implicadas en la vía intrínseca de la coagulación. Estos datos preliminares indican que el inhibidor de tripsina aislado tendría una posible aplicación en la terapia anticoagulante.

GASTROENTEROLOGIA 01

0143 (25) AVANCES EN EL DESARROLLO DE UN HÍGADO BIOARTIFICIAL EXTRACORPÓREO - DISEÑO DE UN REACTOR DE MEMBRANAS Y ESTUDIO DE TRANSFERENCIA DE MATERIA. R Hidalgo^{1,2}, P Argibay^{1,2}, E Smolko^{1,2}, N Vizioli^{1,2}, M Grasselli^{1,2}

¹Laboratorio de Materiales Biotecnológicos, Universidad Nacional de Quilmes; ²Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires <rhidalgo@unq.edu.ar>

Para el tratamiento de la falla hepática aguda se requieren terapias que contemplen la mayor cantidad de funciones del hígado. Nuestro diseño consiste en un reactor de fibras huecas modificadas, ya que hemos sintetizado un hidrogel en los poros de la membrana para regular el transporte de materia. La sangre o el plasma del paciente fluiría por el espacio luminal, mientras que en el extra capilar habría esferoides hepáticos. Los hidrogeles se caracterizaron determinando su selectividad para el transporte de materia (relación entre permeabilidades de dos solutos) para diferentes composiciones de hidrogel. Se eligieron para el ensayo hidrogeles de permeabilidad hidráulica despreciable para limitar el transporte de materia a fenómenos difusivos, descartando los convectivos. En las membranas con hidrogel de poliacrilamida 0,5 M la permeabilidad para la albúmina humana (HSA) fue de $1,2 \times 10^{-7}$ cm²/s y $3,6 \times 10^{-7}$ cm²/s para 1 y 10 % de grado de entrecruzamiento respectivamente, con una selectividad por HSA frente a la Inmunoglobulina G humana (IgG) de 2,2 en ambos casos. Para asegurar el suministro de oxígeno, se determinó el coeficiente de transferencia de materia (kLa) a partir del método de Cooper, adaptado a condiciones dinámicas. Se proponen ecuaciones y un modelo para explicar la transferencia de oxígeno. En base a lo estudiado, y a los requerimientos del tratamiento, se propone un diseño de un sistema bioartificial consistente en un cultivo tisular y un cartucho de fibra hueca

0144 (291) INDOMETACINA REVIERTE LA ENFERMEDAD GRASA HEPÁTICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL MEDIANTE SU EFECTO MIXTO COMO LIGANDO PPAR ALPHA/GAMMA. M S Rosselli¹, A L Burgueño¹, J Carabelli¹, M Schuman¹, C J Pirola¹, S Sookoian¹

¹Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari <soleross@yahoo.com.ar>

La enfermedad grasa del hígado de etiología no alcohólica (NAFLD) afecta entre el 10 y el 24 % de la población mundial. No existen recomendaciones farmacológicas para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, los ligandos/agonistas de los PPARs (peroxisome proliferators-activated receptors) podrían ser utilizados debido a su impacto sobre el metabolismo hepático de los triglicéridos y la resistencia a insulina. Los objetivos de este estudio fueron evaluar: 1-EI efecto de las drogas Clofibrato (C), ligando PPARalfa e Indometacina (I)-ligando PPAR gama/alfa, sobre la expresión hepática del PEPCK y PPAR-alfa, y 2-La eficacia de dichas drogas en la reversión del hígado graso, en un modelo experimental de NAFLD. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho las que fueron sometidas a dieta rica en grasa (DG), luego de un período de 8 semanas recibieron C (75 mg/d n=9) e I (1 mg/d n=5) durante 4 semanas. Se incluyeron 8 ratas con DG y 6 ratas con dieta estándar durante los mismos períodos de estudio (GC). La expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real. Resultados: Ambas drogas se asociaron con mejoraría en los índices de esteatosis en relación con el grupo DG (C=p<0.05 e I=p<0.03). No hubo diferencias significativas entre los grupos en los parámetros de laboratorio. El tratamiento con indometacina aumento los niveles hepáticos del mRNA del PEPCK en un 84 % (p<0.04) en comparación con el grupo GC y en un 93 % en comparación con el grupo clofibrato (p<0.04). Por

otra parte, el clofibrato aumentó en un 150 % los niveles de PPAR- α en comparación con el GC ($p < 0.01$); se observó una tendencia a aumentar los niveles de PPAR- α en el grupo indometacina respecto del GC ($p < 0.053$). En el grupo clofibrato se observó un incremento significativo del peso del hígado respecto de GC y DG ($p < 0.04$). **Conclusiones:** El uso de un antiinflamatorio no esteroide tal como la indometacina revirtió la NAFLD por su potencial acción agonista mixta de los PPARs.

0145 (418) FOSFATIDILINOSITOL 3 QUINASA (PI3K) MEDIA LA ENDOCITOSIS DE TRANSPORTADORES CANALICULARES Y LA ALTERACIÓN SECRETORA CANALICULAR OCASIONADA POR ESTRADIOL 17 β -GLUCURÓNIDO (E17G) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR). A C Boaglio¹, A E Zucchetti¹, E J Sanchez Pozzi¹, A D Mottino¹, F A Crocenzi¹, M G Roma¹

¹Instituto de Fisiología Experimental (Ifise-conicet) <mroma@fbioyf.unr.edu.ar>

PI3K es una familia de isoenzimas que regula varios procesos hepatocelulares de importancia, incluyendo el tráfico intracelular de transportadores canaliculares relevantes para la secreción biliar (Bsep y Mrp2). PI3K media efectos tanto coleréticos como coléstáticos, dependiendo del agente activador. Previamente, reportamos en DAHR, que el inhibidor de PI3K wortmanina (WM) previene la alteración del transporte de sales biliares mediada por Bsep inducida por E17G, un metabolito endógeno de estradiol posiblemente involucrado en la colestasis gravídica. Aquí evaluamos la capacidad de E17G para activar PI3K, estudiamos la participación de PI3K en las alteraciones secretoras de otro sistema de transporte relevante (Mrp2) y el mecanismo subyacente a dichas alteraciones (internalización endocítica de Bsep). E17G (100 μ M) indujo activación de PI3K, determinada por la fosforilación de PKB, un efector final de PI3K, dentro de los tiempos en los que se manifiesta la falla secretora. La función secretora canalicular de DAHR fue estudiada cuantificando la acumulación en las vacuolas canaliculares de sustratos fluorescentes de Bsep (colililifluoresceína) y Mrp2 (5-clorometil-fluoresceína), por análisis de imagen de microfotografías de fluorescencia. E17G (12,5-800 μ M) disminuyó en forma dosis-dependiente la capacidad de las DAHR para acumular apicalmente ambos sustratos fluorescentes ($p < 0,05-0,01$). Los inhibidores de PI3K WM (100 nM) y LY294002 (50 μ M) contrarrestaron significativamente ($p < 0,05$) esta disminución. El inmunomarcado fluorescente de Bsep seguido de microscopía confocal reveló que E17G indujo internalización endocítica del transportador. Esta anomalía fue significativamente contrarrestada por WM. Concluimos que PI3K media la alteración de la función secretora biliar inducida por E17G promoviendo la internalización endocítica de transportadores canaliculares. PI3K sería por lo tanto un potencial blanco terapéutico en fenómenos coléstáticos asociados a estrógenos.

0146 (131) EVALUACIÓN DEL DAÑO PANCREÁTICO EN RATAS CON PANCREATITIS EXPERIMENTAL (P) TRATADAS CON MONOFLUOROFOSFATO DE SODIO (MFP). S M Roma¹, V Di Loreto¹, D Holotte¹, M J Pretini¹, J Nipoti¹, A Rigalli¹

¹Laboratorio de Biología Ósea Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario <stellamroma@express.com.ar>

Las alfa-macroglobulinas (AM) son antiproteasas del plasma que ligan MFP modificando su actividad. Durante la P la función de la AM es requerida por la liberación de proteasas. Demostramos que el tratamiento previo con MFP aumenta la AM y la sobrevida de ratas con P inducida quirúrgicamente. Sin embargo la administración de MFP luego de la P no modifica la sobrevida. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el daño pancreático a través de un score (a mayor score mayor daño) evaluando edema, infiltrado de leucocitos polimorfonucleares y/o mononucleares, depósitos de fibrina, congestión vascular, necrosis y fibrosis en ratas con P y tratamiento oral con MFP. Se utilizaron 50 ratas

macho Sprague Dawley de 50 días divididas en 5 grupos: MFP-P: tratamiento con MFP 30 días antes de la P, C-P: tratamiento con vehículo 30 días antes de la P, P-MFP: tratamiento por 14 días con MFP luego de la P, P-C: tratamiento con vehículo por 14 días luego de la P, C: ratas con cirugía simulada. Las ratas que sobrevivieron se sacrificaron a los 14 días de la P y se midió el score en cortes histológicos del páncreas. La sobrevida se evaluó a través de curvas de sobrevida (Kaplan-Meier, logrank test). Los score se compararon con Kruskal Wallis y test de Dunns. El score (media \pm SEM) y % de sobrevida se consideraron diferentes si $p < 0.05$ (*) y los valores fueron: MFP-P: 8.6 \pm 2.3, 64%*, C-P: 11.0 \pm 2.2, 36%, P-MFP: 1.7 \pm 0.9*, 46%, P-C: 7.0 \pm 4.0, 46%, C: 5.3 \pm 1.3, 100%. Conclusión: el tratamiento con MFP previo a la inducción de la P aumentó la sobrevida de los animales no observándose cambios significativos en el daño pancreático respecto de los animales que no recibieron MFP. Por otro lado, la administración de MFP luego de la inducción de la P si bien no modificó la sobrevida, produjo menor daño tisular. Se concluye que el tratamiento con MFP antes o después de la inducción de la P sería beneficioso ya que mejoraría la morbi-mortalidad de la enfermedad.

0147 (184) LA AUTOFAGIA MEDIADA POR LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE VMP1 EN PANCREAS DE RATON PREVIENE LA SEVERIDAD DE LA PANCREATITIS. D Grasso¹, A Lo Ré¹, V Boggio¹, L Fabiano¹, A Ropolo¹, M I Vaccaro¹

¹Dpto Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires <daniel.grasso@gmail.com>

Autofagia, autodigestión y muerte celular son eventos iniciales en la fisiopatología de la pancreatitis aguda (PA). La severidad de la pancreatitis se correlaciona directamente con la extensión de la necrosis e inversamente con la apoptosis. La autofagia es considerada otra forma de muerte celular programada. Sin embargo, no se conoce si la misma causa o previene la enfermedad. En trabajos previos describimos VMP1, una proteína que induce autofagia y es necesaria para la formación de autofagosomas. Nuestro objetivo fue estudiar el rol de la autofagia mediada por VMP1 en PA. Desarrollamos un ratón transgénico tejido específico que expresa VMP1 usando el promotor de elastasa pancreática en células acinares. En ratones transgénicos (TG) y wild-type (WT) se generó PA mediante dosis supramáximas de ceruleína (50 μ g/Kg). Mientras que los WT desarrollaron PA con alta amilaseemia y lipaseemia, en los TG los niveles enzimáticos fueron significativamente menores ($p < 0.001$). En los WT, los estudios histológicos revelaron alto grado de necrosis y alto score inflamatorio, expresado como número de células inflamatorias por 100 acinos pancreáticos. En contraste, los TG presentaron escasa o nula inflamación, sin evidencia de necrosis. Con el fin de comprender el mecanismo por el cual el TG no desarrolla pancreatitis necrotizante, evaluamos los niveles de apoptosis y autofagia en tejido pancreático. En los WT con PA la expresión de VMP1 y del marcador de autofagia LC3, determinadas por western-blot e inmunohistoquímica respectivamente, no fueron detectables. Por el contrario, los niveles de autofagia en TG son evidentes y cuantificables. El ensayo de TUNEL reveló un índice apoptótico significativamente mayor en TG ($p < 0.001$) con respecto WT. Nuestros resultados indican que la inducción de autofagia favorece el desarrollo de apoptosis y la consecuente disminución de la respuesta inflamatoria local. Proponemos que la autofagia en la célula acinar previene la severidad de la pancreatitis.

0148 (147) EFECTO DE ENTEROGLUCAGON SOBRE EL METABOLISMO Y ELIMINACIÓN INTESTINAL DE XENOBIÓTICOS. S S M Villanueva¹, M L Ruiz¹, A Arias¹, M G Luquita¹, J M Pellegrino¹, V A Catania¹, A D Mottino¹

¹Instituto de Fisiología Experimental-CONICET <ssm77@yahoo.com.ar>

Enteroglucagon en su forma glucagon like-peptide 2 (GLP-2) produce hipertrofia intestinal y aumento de la actividad de transportadores de azúcares en membrana de ribete en cepillo. GLP-

2 aumenta en plasma de ratas madres durante la lactancia, pudiendo ser responsable del incremento en la secreción intestinal de xenobióticos conjugados previamente observado en estos animales. El presente estudio evaluó el efecto de GLP-2 (50 $\mu\text{g}/\text{día}/100$ g peso corporal, 5 días consecutivos, s.c.) sobre la expresión y actividad de glutatión-S-transferasa (GST) y del transportador apical de aniones orgánicos Mrp2 en yeyuno de ratas Wistar hembras. Los Resultados representan media \pm DE, n=3. GST citosólica detectada *in vitro* (nmol/min/mg prot) resultó significativamente mayor en GLP-2 (453 \pm 53) que en los controles (C, 298 \pm 38), p<0.05, por aumento (46%) en la expresión de la clase GST α detectado por westernblotting. La expresión de Mrp2 (westernblotting) también aumentó en GLP-2 (67%) respecto de C (p<0.05). La actividad de Mrp2, evaluada *in vivo* por administración i.v. de 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB, 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ peso) y posterior detección de sus derivados dinitrofenil glutatión (DNP-SG) y dinitrofenil cisteinilglicina (DNP-CG) en perfusato intestinal (1 $\mu\text{mol}/90$ min/g tejido), resultó aumentada en GLP-2 (0.036 \pm 0.001) respecto de C (0.019 \pm 0.002), p<0.05. También se estimó la capacidad de barrera epitelial de Mrp2 *in vitro* en saquitos intestinales aislados evertidos, en presencia de CDNB (100 μM) del lado mucoso. La excreción de DNP-SG en el lado mucoso (1 $\mu\text{mol}/60$ min/g tejido) fue mayor en GLP-2 (3.03 \pm 0.50) respecto de C (2.00 \pm 0.40), p<0.05. En síntesis, GLP-2 aumentó la expresión de GST y Mrp2 y por ende la capacidad de metabolizar y excretar xenobióticos como el CDNB. Conclusión: Estos efectos pueden explicar los cambios observados en ratas madres durante la lactancia, implicando una mayor protección contra la absorción de xenobióticos dietarios ante la mayor ingesta de alimento.

0149 (378) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN EL EFECTO INHIBITORIO DEL ETANOL SOBRE LA SECRECIÓN SALIVAL. J Prestifilippo ^{1, 2}, J Fernandez-Solari ^{2, 3}, V Rettori ³, J C Elverdin ²

¹Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA; ³CEFyBO-CONICET <jprestifilippo@yahoo.com.ar>

La saliva es la primera barrera de defensa del tracto digestivo. Las glándulas submandibulares (GSM) son las mayores productoras de saliva. En estudios previos hemos demostrado que uno de los principales endocannabinoides, anandamida, disminuye la secreción salival. También el consumo de Etanol disminuye la secreción salival por mecanismos aun desconocidos. El objetivo fue evaluar la participación de los encannabinoides y sus receptores (CB1/CB2) en el efecto inhibitorio del etanol sobre la secreción salival de la GSM. La secreción salival se evaluó en ratas Wistar macho adultas mediante curvas dosis respuesta a metacolina (MC 1,3y10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 1 hora post administración intragástrica de Etanol (3g/kg) solo o junto a la inyección intraglandular de AM251 (antagonista CB1, 600 μM) o AM630 (antagonista CB2, 600 μM). Los CB están acoplados a una proteína Gi, por lo que se determinó el contenido de AMPc en GSM en presencia de: Forkolina (FRSK, 76 μM); FRSK + Etanol (100mM); FRSK + AM251 (10 μM); FRSK + AM630 (10 μM); FRSK + Etanol + AM251; FRSK + Etanol + AM630. Los Resultados indican que el efecto inhibitorio del Etanol sobre la secreción salival fue prevenido parcialmente por la administración de AM251 o AM630. Además, el Etanol fue capaz de disminuir el contenido de AMPc estimulado por FRSK (FRSK 1,5 \pm 0,12vs.FRSK+Etanol 1,10 \pm 0,10pmol/mg prot,p<0.05). El AM251 fue capaz de prevenir este efecto (FRSK+Etanol 1,10 \pm 0,10vs.FRSK+Etanol+AM251 1,83 \pm 0,09 pmol/mg prot,p<0.001) pero no así el AM630. Estos Resultados nos permiten concluir que la inhibición de la secreción salival producida por Etanol podría estar mediada, al menos en parte, por el sistema endocannabinoide en la GSM.

0150 (90) ESTUDIO TEMPORAL DE LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS

STELLATE HEPÁTICAS DE RATA. A V Arnejo ¹, A M Hidalgo ¹, A A Bologna ¹, M Barbich ¹

¹Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental - Htal Italiano - Buenos Aires <valeria.arnejo@hospitalitaliano.org.ar>

Dentro de las poblaciones celulares que conforman el hígado, las células *stellate* (HSCs) tienen un importante rol en el mantenimiento de la homeostasis hepática. Sin embargo, su función en los procesos fisiopatológicos relacionados con la fibrosis y la regeneración no se han estudiado aún exhaustivamente. El objetivo de este trabajo fue aislar, cultivar y caracterizar una población de HSCs determinando los cambios fenotípicos en función el tiempo por medio de la expresión de diferentes marcadores. Las células fueron aisladas de ratas Wistar adultas utilizando el método de doble perfusión con colagenasa. La suspensión celular obtenida fue sometida a centrifugaciones diferenciales para enriquecer en la población de HSCs, las cuales se cultivaron con DMEM 10% de SFB durante un período de 6 semanas. Los cultivos fueron fijados a distintos tiempos determinándose la morfología celular, tinción Oil red O y los siguientes marcadores: Nestina y α -SMA. El 75,5% de la morfología celular observada fue de tipo fibroblastoide. Por Oil red O, se observó un 90% de células positivas al inicio que fue disminuyendo a lo largo del tiempo, siendo negativo al final del periodo estudiado. La expresión de α -SMA se observó a partir de los 4 días de cultivo, y a lo largo de las 6 semanas estudiadas. Mientras que la expresión de nestina se visualizó a partir de la 3^{er} semana de cultivo, manteniéndose hasta la 6^a semana (95.5%-83.9%, respectivamente). Los Resultados nos confirman la presencia de HSCs. Esta población de células muestra cambios en la expresión de marcadores a lo largo del tiempo, los cuales podrían indicar variaciones en el grado de activación celular; por pérdida de gotas lipídicas y por expresión de α -SMA. Asimismo y debido a que la expresión de nestina se asocia a la capacidad regenerativa, estas células podrían formar parte de una población de células progenitoras

GASTROENTEROLOGIA P1

0151 (203) INHIBICIÓN IN VITRO DE LA EXPRESIÓN DE SPARC (SECRETED PROTEIN, ACIDIC AND RICH IN CYSTEINE) EN CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS. EFECTOS BIOLÓGICOS. C Atorrasagasti ¹, A Camino ¹, M Malvicini ¹, J B Aquino ¹, L Alaniz ¹, M Rizzo ¹, P Matar ¹, O Podhajcer ², M Silva ³, G D Mazzolini ¹

¹Laboratorio de Terapia Génica Universidad Austral; ²Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires, Argentina.; ³Unidad de Hígado. Hospital Austral. Buenos Aires. Argentina <mcatalinaa@gmail.com>

Introducción: Hemos observado previamente que la transferencia génica mediada por adenovirus de una secuencia antisentido para SPARC (AdasSPARC) fue capaz de atenuar el proceso necroinflamatorio y disminuir la fibrosis hepática en un modelo de intoxicación crónica con TAA (tioacetamida) en ratas (Camino A 2008, J. of Gene Med, 10:993-1004). La células estrelladas hepáticas (CE) desempeñan un papel fundamental en el proceso fibrogénico hepático. **Objetivos:** Explorar *in vitro* en CE los mecanismos de atenuación de la fibrosis al inhibir SPARC. **Materiales y Metodologías:** Se utilizó una línea de CE, denominada CFSC-2G. La expresión de SPARC fue evaluada por qPCR e inmunofluorescencia. Se utilizó el AdasSPARC para inhibir la proteína. Para incrementar la inhibición de SPARC se emplearon ARN de interferencia específico (siRNA). Se estudió la expresión de la citoquina TGF- β 1 por ELISA. Se evaluó proliferación celular por el método de incorporación de timidina tritiada y la migración en cámaras *transwell*. Resultados: AdasSPARC redujo en un

50% la expresión de SPARC a los 5 días de la infección comparado con los controles. Esto se correlacionó con disminución en la secreción de TGF- β 1, principal citoquina fibrogenica, comparado con Adbgal (vector control). El siRNA redujo la expresión del ARNm de SPARC a las 72 hs (80% de reducción vs. control). La migración de las células CFSC-2G transfectadas con siRNA disminuyó significativamente ($p=0,003$), así como la respuesta migratoria a TGF β 1. La secreción de TGF β 1 en el sobrenadante de las células transfectadas con el siRNA para SPARC fue menor que las tratadas con el siRNA control. **Conclusiones:** La regulación negativa de la expresión de SPARC en CE resulta en una disminución de la capacidad migratoria de las células estrelladas activadas, especialmente en respuesta a TGF- β 1, así como la producción de TGF- β 1. SPARC podría ser considerada un nuevo blanco terapéutico en fibrosis hepática.

0152 (298) PROTECCIÓN DE LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRADIOL-17 β -GLUCURÓNIDO (E17G) POR MODULACIÓN HORMONAL DE LOS NIVELES INTRAHEPÁTICOS DE ADENOSÍN MONOFOSFATO CÍCLICO (AMPC). A E Zucchetti¹, F A Crocenzi², E J Sánchez Pozzi²

¹Instituto de Fisiología Experimental; ²Instituto de Fisiología Experimental - CONICET - UNR. Argentina. <a_zucchetti@yahoo.com.ar>

AMPC previene la colestasis por E17G. Como AMPc hepático es regulado por glucagon (G), se evaluó si G protege de la colestasis. In vivo se administró alanina (Ala) a ratas ayunadas para elevar los niveles plasmáticos de G y se evaluó su efecto sobre AMPc hepático y sobre la alteración por E17G de la función de los transportadores Bsep y Mrp2. Por último, in vitro (duplas aisladas de hepatocitos de rata, DAHR), se evaluó si el efecto era dependiente de la protein-kinasa A (PKA). In vivo, se inyectó Ala (0,5g/kg PC, i.p.) a ratas ayunadas (tratadas) ó solución fisiológica (SF) a alimentadas (controles). Luego de 10 min, se administró E17G (9nmol/100g PC, i.v.). Finalmente, se midió flujo biliar (FB), velocidad de excreción de bilirrubina (VEBrr) (sustrato de Mrp2), y de sales biliares (VESB) (sustrato de Bsep) por 120 min. En otro grupo se midió AMPc hepático a los 10 min de administrada Ala o SF. In vitro, DAHR se incubaron con G (0,4mg/l) y los inhibidores de PKA, H89 (0,1 μ M) o KT5720 (5 μ M), luego con E17G (50 μ M) y finalmente expuestas a colil lisil fluoresceína (sustrato de Bsep). Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CLF (acCLF). Resultados: luego de la administración de E17G, las ratas tratadas con Ala presentaron valores mayores de FB y VEBrr (significativos a partir de los 50 min) y de VESB (significativo en el intervalo de 60 a 90 min) ($n=3$, $p<0,05$). Además, el AMPc aumentó 136% en animales tratados (Tratados: $2,0\pm 0,3$ pmol/mg, Controles: $0,8\pm 0,3$ pmol/mg, $n=3$, $p<0,05$). Finalmente, en DHAR, la inhibición de PKA previno el efecto de G sobre la colestasis por E17G (acCLF (%)) Control: 100 ± 0 ; E17G: $74\pm 7^*$; E17G/G: 97 ± 7 ; E17G/G/H89: $72\pm 7^*$; E17G/G/KT5720: $68\pm 3^*$, * diferente de Control y E17G/G, $n=2$, $p<0,05$). **Conclusión:** Ala protegió la alteración de E17G sobre FB, VEBrr y VESB. Esto se debería a que G modula AMPc, dado que el tratamiento se asoció con el aumento de este último. El mecanismo de protección estaría mediado por PKA.

0153 (19) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN REPETITIVA DE ETANOL SOBRE LA SALUD ORAL DE RATAS ADULTAS. A Maia-Dantas^{1,2}, C E Mohn², M Zorrilla Zubilete³, E Rettori⁴, A De Laurentiis², M N Muscará¹, J C Elverdin⁴, V Rettori², J Fernández Solari^{2,4}

¹Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brasil; ²CEFYO- CONICET; ³Primera Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA; ⁴Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA <li_maiad@yahoo.com>

Son conocidos los efectos nocivos de la ingesta de etanol sobre la salud de los individuos. En estudios previos demostramos que la administración aguda de etanol disminuyó al 50% la secreción salival de la glándula submaxilar (GSM) inducida por metacolina (MC) en ratas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos de la administración intragástrica de etanol 2g/Kg durante 12 días, 2 veces al día, sobre la salud oral de ratas Wistar macho. La secreción salival estimulada por dosis crecientes de MC inyectada a través de la vena femoral fue menor en las ratas sometidas a alcoholización repetitiva (AR) con respecto a las ratas que recibieron un volumen equivalente de agua (ratas control) durante los 12 días de tratamiento (5 ratas/grupo). Con MC 1 μ g/kg la secreción salival en ratas alcoholizadas fue de $2,9 \pm 1,2$ mg vs. $8,8 \pm 1,2$ mg en las ratas control ($p<0,01$); con MC 3 μ g/kg, $10,5 \pm 3,5$ mg vs. $22,5 \pm 1,0$ mg ($p<0,05$); con 10 μ g/kg, $27,8 \pm 3,0$ mg vs. $52,0 \pm 3,6$ mg ($p<0,001$). A su vez, en la GSM, observamos un incremento en la actividad de la enzima oxido nítrico sintasa inducible (NOSi), medida por radioconversión de ¹⁴C-L-arginina en cantidades equimolares de ¹⁴C-L-citrulina y oxido nítrico, de las ratas alcoholizadas con respecto a las controles ($p<0,01$), sin diferencias significativas en el contenido de PGE medido por RIA. Al estudiar el efecto de la AR sobre algunos parámetros inflamatorios en la encía que rodea el primer molar inferior, observamos un incremento en la expresión del mensajero de la NOS endotelial medido por PCR y de la actividad de la NOSi ($p<0,01$ y $p<0,05$, respectivamente) sin cambios en el contenido de PGE con respecto a las ratas control. A partir de estos Resultados podemos concluir que la AR produce alteraciones fisiopatológicas en los tejidos orales. (CONICET PIP 6149, ANPCyT PICT 14264)

0154 (29) RECEPTORES CANNABINOIDES CB1 EN LA PROTECCIÓN O NO DE LA MUCOSA GÁSTRICA, EN RATAS. O Laudanno¹, J A Cesolari¹, P San Miguel¹, O A Bedini¹

¹Gastroenterología Experimental Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Rosario <olaudanno@hotmail.com>

Estudiar a Marihuana (Mari) (Delta (9) - Tetra hidro cannabinoide) agonista CB1 y al Rimonabant (Rimo) antagonista CB1; en las lesiones agudas gástricas inducidas por Etanol (Et), Indometacina (Indo) y el Estrés (E). Grupos aleatorios de ratas hembras Wistar ($n = 7$ c/grupo), 200 g, ayuno 24 hs., agua ad libitum, se realizaron: 1. Fisiológico. 1 ml orogástrico (OG) y se esperó 24 hs. 2. Mari. 1 ml sol. 20% OG. 3. Rimo. 1-5 mg/Kg IP. 4. Et. 1 ml 96° OG 20 min. 5. Indo. 30 mg/Kg SC 24 hs. 6. E. por inmovilización e inmersión en agua a 18°C 6 hs. 7. Mari. 60 min, Et. 8. Rimo 60 min, Et. 9. Mari. 60 min, Indo. 10. Rimo 60 min, Indo. 11. Mari, E. 12. Rimo, E. Las ratas fueron sacrificadas con sobredosis de éter, laparotomía, gastrectomía, su apertura y tabulación del área necrótica gástrica, por planimetría y luego histología (H.E.). Se usó t de Student y el ANOVA. El % de área necrótica macroscópica gástrica dio: 1. 0%; 2. 0%; 3. 0%; 4. 35 ± 5 ; 5. 61 ± 7 ; 6. 73 ± 8 ; 7. 11 ± 2 ($< 0,01$); 8. 81 ± 7 ($p < 0,01$); 9. 18 ± 3 ($< 0,02$); 10. 83 ± 7 ($< 0,05$); 11. 16 ± 4 ($< 0,01$) y 12. 91 ± 5 ($p < 0,01$). **Conclusiones:** Marihuana agonista CB1 de receptores cannabinoides dio marcada protección de la mucosa gástrica; en contraste, rimonabant, antagonista CB1, agravó las lesiones gástricas inducidas por etanol, indometacina y el estrés.

0155 (81) PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MICROÓRGANOS HEPÁTICOS (MOHS) EN SOLUCIÓN BGS (BES-GLUCONATO-SUCROSA). EFECTO DEL AGREGADO DE POLIETILENGLICOL (PEG). C Mandolino¹, M D Pizarro¹, G Di Venanzio¹, J V Rodríguez¹, M E Mamprin¹

¹FARMACOLOGÍA, FACULTAD DE CIENCIAS BIOQ Y FARM. UNR. <mmamprin@fbiof.unr.edu.ar>

En nuestro laboratorio hemos desarrollado una nueva solución de preservación (Solución BGS, a base de BES, Gluconato y Sacarosa) que ha mostrado tener la misma eficacia que la solu-

ción UW (Gold estándar) para mantener viables y funcionales hepatocitos aislados, con la ventaja de poseer una mejor capacidad buffer y un menor costo. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos que ocasiona el agregado de PEG de diferentes PM (8000, 20000 y 35000) a la solución BGS sobre el contenido de agua total y la viabilidad funcional de MOHs. Para ello, MOHs de ratas wistar fueron cortados manualmente, con un espesor de 432 ± 36 μm , $n=10$. Luego fueron preservados 48 hs a 0°C en anoxia en las siguientes soluciones de preservación: a) UW (Viaspan), b) BGS, c) BGS + 4% PEG 8000, d) BGS + 4% PEG 20000 y e) BGS + 4% PEG 35000. Diariamente se tomaron muestras para evaluar la viabilidad mediante la Liberación de LDH (%) y el Contenido de agua total (mL/g tej seco). A las 48 hs sólo el grupo b mostró una diferencia significativa en la Liberación de LDH ($47,6\pm 4,1^*$, vs $21,3\pm 1,9$ para a, $25,2\pm 1,2$ para c; $20,2\pm 3,0$ para d y $18,9\pm 1,2$ para e) y una incapacidad de regular el contenido de agua total (anova, $p<0,05$, $n=3$). Finalizado el período de isquemia fría todos los grupos fueron reoxigenados (120 min, 37°C , KHR) y se determinó: Liberación de LDH, Contenido de agua total, Consumo de O_2 (imol O_2 /min g tej seco) y Síntesis de Urea (imol/g tej seco). Los Resultados obtenidos fueron comparados con MOHs recién aislados (controles). A los 120 min sólo los MOHs preservados en la solución e mostraron parámetros de viabilidad similares al control: Liberación de LDH ($23,6\pm 3,2$ vs $30,4\pm 6,8$), Contenido de agua total ($4,3\pm 0,2$ vs $4,9\pm 0,4$), Consumo de O_2 ($3,6\pm 1,1$ vs $4,3\pm 0,9$) y Síntesis de Urea ($15,1\pm 3,2$ vs $18,8\pm 4,7$). Estos Resultados demuestran un efecto protector del agregado de PEG 35000 a la solución BGS, permitiendo mantener viables y funcionales MOHs de rata durante 48 hs.

0156 (128) PARTICIPACIÓN DE INTEGRINAS EN EL EFECTO PRO-ADHESIVO DE LA GALECTINA-1 SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR. P Carabias¹, M Manzi¹, M T Elola¹, G Rabinovich², C Wolfenstein de Todel¹, M F Troncoso¹

¹IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²ByME-CONICET <pablocarabias@hotmail.com>

La galectina-1 (Gal-1) está involucrada en procesos de homeostasis, adhesión, migración y diferenciación celular, así como también en la transformación maligna y regulación de respuesta inmune. Con el objetivo de investigar su rol como modulador de la adhesión de hepatocitos utilizamos como modelo la línea de carcinoma hepatocelular, HepG2 C3A. Previamente demostramos que la galectina-1 recombinante (rGal-1) promueve la adhesión de estas células. Mediante la tinción con Cristal Violeta se observa un efecto máximo ($156\pm 5\%$) comparado con las células control (100%) luego de 1 h de incubación con la rGal-1 soluble ($14 \mu\text{M}$). La pre-incubación con lactosa previene este efecto, sugiriendo la participación del dominio de reconocimiento de carbohidratos. Para investigar el posible papel de la Gal-1 como un componente de la matriz extracelular, se inmovilizó la rGal-1 ($10 \mu\text{g}/\text{pocillo}$) y se evaluó la adhesión celular, observándose un aumento significativo ($138\pm 9\%$, 1h de incubación) con respecto a los pocillos sin recubrir. Para evaluar el efecto de la sobre-expresión de la Gal-1, las células HepG2 se transfectaron con el plásmido pcDNA3.1-Lgals1. En estas células con alta expresión de Gal-1 la adhesión fue significativamente mayor ($169\pm 23\%$) que la de las células sin transfectar. Con el fin de evaluar el papel de las integrinas, las células se pre-incubaron con anticuerpos (bloqueantes) contra distintas subunidades de integrinas. Se observó una disminución del efecto producido por la rGal-1: Ac anti $\alpha 1$ ($83,17\pm 0,31\%$), anti $\alpha 3$ ($70,77\pm 2,53\%$), anti αV ($84,13\pm 2,84\%$) y anti $\beta 1$ ($83,06\pm 1,22\%$). Las células se pre-incubaron con wortmanina ($1 \mu\text{M}$), un inhibidor de la PI3K, obteniéndose una disminución significativa del efecto producido por la rGal-1 ($133\pm 5\%$ vs $156\pm 5\%$). Estos Resultados demuestran que la Gal-1 promueve la adhesión de las células HepG2, efecto en el que participan las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 3$, αV y $\beta 1$ de las integrinas, sugiriendo la activación de, por lo menos, la vía de la PI3K.

0157 (183) LA GALECTINA-1 AUMENTA LA VELOCIDAD DE POLARIZACIÓN DE MEMBRANAS EN LAS CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO HEPG2. M V Espelt¹, G A Rabinovich², C Wolfenstein de Todel³, M F Troncoso³

¹IQUIFIB Fac Farm y Bioq UBA; ²ByME-CONICET; ³IQUIFIB Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA <vicespelt@yahoo.com.ar>

Las galectinas son proteínas que unen carbohidratos tanto de la superficie celular como de la matriz extracelular. En algunos tipos celulares un aumento de la galectina-1 (Gal-1) se considera signo de progresión tumoral. La invasividad de un tumor es un fenómeno multifactorial que involucra diferentes eventos biológicos, tales como migración y adhesión celular. En este contexto, el primer evento involucra la polarización de las células tumorales. No se ha estudiado aún el efecto de la Gal-1 sobre la polarización en células hepáticas. Para ello, las células HepG2 se incubaron con la Gal-1 recombinante (rGal-1) y los canalículos biliares (CB) se visualizaron por microscopía de fluorescencia utilizando faloidina-TRITC. Los núcleos se tiñeron con Hoechst y la polarización se estimó como la media \pm error estándar de CB/100 células. A las 24h no se observaron diferencias significativas de las células tratadas con rGal-1 ($7 \mu\text{M}$) (9 ± 0) con respecto al control (5 ± 2). A las 48h, la rGal-1 aumentó la polarización significativamente (14 ± 1 , $p<0,05$) con respecto al control (8 ± 1). A las 72h, se alcanzó la máxima polarización en las células control (14 ± 2) y en las tratadas (16 ± 1). Luego las células se transfectaron con el plásmido pcDNA3.1-Lgals1 para lograr la sobreexpresión de la Gal-1. Por medio de Western blot se seleccionaron 2 clones ($5,5$ y $1,5$ veces mayor expresión de Gal-1) y se analizó la polarización a las 48h, observándose un aumento similar al informado con la rGal-1 exógena. Mediante dot blot se demostró la secreción de la Gal-1 al medio extracelular en las células control y en las transfectadas. Estos Resultados demuestran que la Gal-1 aumenta la velocidad de polarización en las células HepG2 transfectadas así como en las incubadas con la Gal-1 exógena. Además en las transfectadas, la Gal-1 tendría efecto al ser secretada al medio extracelular. Los Resultados sugieren un posible rol en la diferenciación hepática durante la embriogénesis o durante la transformación maligna.

0158 (272) REGULACION CENTRAL DE LA SECRECION DE LA GLANDULA SUBMAXILAR (GSM) POR ENDOTELINA-1 (ET-1) Y ENDOTELINA 3 (ET-3). M S Ventimiglia¹, M S Lange¹, M R Rodriguez¹, J C Elverdin², M S Vatta³, L G Bianciotti¹

¹Catedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Catedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires; ³Cátedra de Fisiología - Iquimefa - Conicet, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires <lbianc@ffy.uba.ar>

Las endotelinas (ETs), importantes reguladores de la función cardiovascular, modulan la función digestiva. En trabajos previos mostramos que ET-1 y ET-3 modulan la secreción biliar. En este estudio se evaluó el efecto de la administración intracerebroventricular (icv) de ET-1 y ET-3 sobre la secreción de la GSM de ratas SD de 250g. Se implanto una cánula icv y a la semana se canuló la vena femoral y los conductos excretorios de la GSM. Se realizaron curvas dosis respuesta a metacolina (MC) ($1, 3, 10$ y $30 \mu\text{g}/\text{kg}$) y a noradrenalina (NA) ($3, 10$ y $30 \mu\text{g}/\text{kg}$) administradas iv, recogiendo muestras de saliva cada 3 min. Luego de un período de estabilización de 15 min se repitieron las curvas en presencia de ETs ($1 \text{ng}/\mu\text{l}$) administradas icv. Los Resultados mostraron que las ETs no indujeron secreción salival *per se* pero potenciaron significativamente la secreción inducida por MC y NA en todas las dosis. La potenciación de ET-3 fue mayor que la de ET-1 tanto para la secreción inducida por estímulo adrenérgico como colinérgico (70% vs 40%). Las ETs administra-

das icv no modificaron la presión arterial en esa dosis. Para identificar los receptores centrales involucrados en la respuesta los animales pre-trataron con BQ-610 (antagonista ETA) o BQ-788 (antagonista ETB) administrados icv. Los antagonistas no indujeron secreción ni modificaron la salivación inducida pero inhibieron la respuesta de ETs. BQ-610 inhibió los efectos de ET-1 mientras que ambos antagonistas inhibieron totalmente de manera individual la respuesta de ET-3. Estos Resultados permiten concluir que en la GSM las ETs no son agonistas sialogogos *per se* pero incrementan la secreción inducida por estímulo adrenérgico y colinérgico. Los receptores ET-A median las respuestas de ET-1 mientras que receptores no convencionales (no ET-A no ET-B) mediarían los efectos de ET-3. Este estudio muestra que las ETs regulan a nivel central la secreción de la GSM en la rata independientemente de efectos hemodinámicos.

0159 (278) EL FACTOR NATRIURETICO ATRIAL (ANF) FAVORECE EL EFLUJO DE AMPc GENERADO POR SECRETINA (S) EN EL PANCREAS EXOCRINO. M S Lange

¹, M R Rodríguez ¹, M S Ventimiglia ¹, M S Vatta ², C A Davio ³, L G Bianciotti ¹

¹Catedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Cátedra de Fisiología- Iquimefa- Conicet, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ³Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires <lbianciotti@hotmail.com>

En estudios previos mostramos que ANF desensibiliza la respuesta de S en páncreas exocrino. Debido a que el egreso de nucleótidos cíclicos ocurre en varios tipos celulares estudiamos si este mecanismo contribuía al efecto observado. Evaluamos si ANF favorecía la salida de AMPc generado por estimulación con S incubando acinos pancreáticos aislados de rata y midiendo el contenido de AMPc en tejidos (T) y líquidos de incubación (L). La S incrementó el AMPc en T e indujo su salida hacia el medio extracelular, pero en presencia de ANF el egreso del nucleótido se potenció. Al estudiar la cinética de producción y egreso de AMPc durante 30 min, se observó que S estimuló el contenido de AMPc en T alcanzando el máximo a los 5 min y declinando a valor control a los 10 min mientras que en L el AMPc aumentó gradualmente hasta superar el valor de T a los 10 min. En presencia de ANF se observó un patrón similar, excepto que el pico máximo de producción fue 60% menor y se alcanzó a los 3 min llegando a valor control a los 5 min, mientras que en L el AMPc incrementó antes alcanzando un valor mayor que con S sola. Debido a que la medición de AMPc se realiza en presencia de IBMX (inhibidor de fosfodiesterasas (PDE) y a que algunos autores postulan que la salida de nucleótidos cíclicos opera cuando está limitada la actividad de PDE, se realizaron experimentos sin IBMX, obteniéndose un patrón cinético similar. Se evaluó luego si los transportadores MRP mediaban la salida de AMPc pretratando acinos con probenecid. El egreso de AMPc inducido por S o S más ANF se inhibió en presencia de probenecid. Estos Resultados permiten concluir que S induce producción y salida de AMPc en células acinares y que el egreso se potencia en presencia de ANF. Los transportadores MRP4 y/o MRP-5 que transportan AMPc mediarían el eflujo. El ANF contribuiría a regular así los niveles intracelulares de AMPc generado por S en células acinares pancreáticas, ya que el proceso ocurre aun en presencia de PDE.

0160 (348) EVALUACIÓN DEL ROL DE LA AQUAPORINA-8 EN EL TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE AGUA EN CÉLULAS HEPÁTICAS. M V Espelt¹, L R Soria ², M C Larocca ², R A Marinelli ²

¹IQUIFIB Fac Farm y Bioq UBA; ²IFISE Fac Cs Bioq Farm CONICET Univ Nac Rosario <vicespelt@yahoo.com.ar>

Los hepatocitos expresan aquaporinas (AQPs) en forma polarizada. Nuestros trabajos previos indican que la expresión de AQP8 en la membrana canalicular de los hepatocitos se

correlaciona con la permeabilidad osmótica canalicular y la secreción biliar. Por el contrario, estudios en ratones *aqp8*^{-/-} sugieren que AQP8 no tendría relevancia en el transporte de agua canalicular. Sin embargo, hasta el momento no existe un modelo que permita obtener evidencias concluyentes en uno u otro sentido. Nuestro objetivo fue desarrollar una metodología para evaluar el transporte transhepatocitario de agua en un modelo que permita analizar el rol de la AQP8. **Metodología y Resultados:** Utilizando ARN de interferencia generamos células HepG2 (derivadas de hepatoma humano) con disminución en la expresión de AQP8 (AQP8⁻), que fue corroborada por inmunoblotting (-70%, p<0,05) y microscopía confocal. Células controles y AQP8⁻ fueron pre-cargadas durante 3 min con 5-clorometilfluoresceína diacetato, fluoróforo que, luego de ser metabolizado por las células hepáticas, cambia su espectro de emisión de fluorescencia y es rápidamente transportado a las estructuras canaliculares. Estas células fueron expuestas a un gradiente hipo-osmótico de 200 mOsm. La intensidad de fluorescencia fue registrada en áreas de distintos canaliculos y la pendiente de decaimiento de fluorescencia relativa fue usada para calcular los cambios relativos en el volumen canalicular (VCR). La disminución en la expresión de AQP8 inhibió significativamente el aumento del VCR en presencia del gradiente osmótico (C: 1,28 ± 0,03; AQP8⁻: 1,09 ± 0,03, p<0,05). Estos Resultados fueron coherentes con Resultados obtenidos en condiciones similares por la técnica tradicional de planimetría, a la vez que mostraron mayor reproducibilidad. Conclusión: desarrollamos una metodología que permitió evaluar el transporte transepitelial de agua en hepatocitos y obtener evidencia definitiva sobre el rol de AQP8 a nivel canalicular.

0161 (596) EL PÉPTIDO ENDÓGENO UROGUANILYN (UGN) MODULA LA SECRECIÓN NETA DE FLUIDO VÍA LA ISOFORMA NHE2 DEL INTERCAMBIADOR NA⁺/H⁺, EN LAS CÉLULAS T84 DE INTESTINO HUMANO. R M Toriano

¹, C Pollak ¹, M A Curto ², M Parisi ³, C Capurro ¹

¹Lab. de Biomembranas, Dpto de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, UBA; ²Lab. de Biol. Mol. de la Enfermedad de Chagas, INGEBI, UBA-CONICET; ³Dpto de Fisiología y Biofísica, medicina, UBA y Unidad de Biomembranas, Univ. Favaloro. <rtoriano@fmed.uba.ar>

El UGN es un péptido endógeno, análogo de la toxina STa, que interviene en la regulación del transporte de fluido a través del epitelio intestinal y se propone como un eje de unión exocrina entre intestino y riñón para el mantenimiento de la homeostasis de sodio y agua en el compartimento corporal. Se ha reportado que la unión de UGN con el receptor apical guanilato ciclasa C (RG-C) incrementa los niveles intracelulares de GMPc, aumenta la secreción de Cl⁻ y disminuye la absorción de Na⁺. Sin embargo no han sido elucidados ni el mecanismo ni los transportadores de Na⁺ involucrados en este proceso. Utilizando células T84, nosotros demostramos previamente que la unión de STa con RG-C provocaba un aumento del flujo neto secretor de fluido y que una parte sustancial de este fluido se asociaba a un transporte de soluto no electrogénico. Recientemente pudimos demostrar, mediante técnicas de RT-PCR, western blot y espectrofluorometría, que T84 expresa en la membrana apical NHE2 y en la basolateral NHE1 y NHE4, todas isoformas del intercambiador Na⁺/H⁺. Los experimentos funcionales nos permitieron concluir que NHE1 y 4 son responsables del mantenimiento del pH_i mientras que NHE2 juega un rol en la absorción de Na⁺. La actividad de NHE2 se vio inhibida frente a la estimulación apical con UGN, retrasándose la recuperación del pH_i frente a la imposición de un pulso ácido. Además, en condiciones basales UGN fue capaz de inducir sendos aumentos del pH_i y del flujo neto secretor de fluido sin cambios en la corriente de cortocircuito, indicando un proceso eléctricamente silente. Para evaluar si el intermediario de esta respuesta era el GMPc, estudiamos el efecto de un análogo permeable del mismo, 8-Br-GMPc, sobre los parámetros de interés en condiciones basales. Los Resultados obtenidos indican que UGN aumenta el flujo neto secretor transepitelial de fluido en T84, disminuyendo la componente

absortiva del mismo por medio de la inhibición de la absorción de Na⁺ a través de NHE2.

0162 (620) MORFOMETRÍA Y CONTAJE DE NEURONAS NADPH-POSITIVAS DEL PLEXO DE AUERBACH EN RATAS JÓVENES Y MADURAS EN UNA LÍNEA DIABÉTICA OBESA COMPARADAS CON UNA LÍNEA CONTROL. J Geuna¹, L Brun², N Hisano¹

¹Cátedra de Histología y Embriología, Fac. Cs. Médicas, UNR; ²Laboratorio de Biología ósea, Fac. Cs. Méd. UNR <norihisano@yahoo.com.ar>

Las neuronas y glías del plexo de Auerbach conforman ganglios unidos por tractos nerviosos que configuran en conjunto una imagen reticular, propia de cada segmento del tubo digestivo. Se analizan las neuronas NADPH-positivas del plexo de Auerbach en el intestino delgado de la línea de ratas β, un modelo animal de obesidad y diabetes espontánea tardía, comparando con la rata Sprague Dawley (SD), controles, en animales jóvenes y maduros. Ratas macho β y SD de 4 y 18 meses de edad fueron sacrificados con sobredosis de éter, se disecó el intestino delgado, fue lavado con PBS, fijado en paraformaldehído 4 % en PBS, incubándose con nitroblue tetrazolium y NADPH-diaforasa. Las neuronas NADPH-positivas se contaron en 40 campos consecutivos mediante una cuadrícula en el ocular 10x y se midieron las áreas neuronales utilizando un software específico. Los datos se expresan como media ± SEM y se analizaron estadísticamente con el test "t" de Student. Tanto en ratas β como en SD la estructura reticular del plexo se mantiene en animales jóvenes y en maduros. Cuantificamos las neuronas con el siguiente resultado: SD: 4m: 27.18 ± 11.72/μm²; 18m: 27.06 ± 10.13/μm² (n.s.). β: 4m: 56.64 ± 0.31/μm²; 18m: 32.50 ± 2.05/μm² (P<0.01). Las áreas neuronales son: SD: 4m: 406.75 ± 24.95 μm²; 18m: 346.43 ± 29.34 μm²(P<0.05); β: 4m: 584.37 ± 135.15 μm²; 18m: 165.57 ± 63.69 μm²(P<0.05). El envejecimiento de las ratas β, se acompaña con una disminución significativa de la cantidad y el tamaño neuronal yeyunal. Esto puede deberse al síndrome metabólico de origen genético de la línea β. En cambio, en las ratas SD se observa solamente una disminución del tamaño neuronal. Las alteraciones en el plexo de Auerbach fundamentan la dismotilidad intestinal observada con la edad y/o diabetes

0163 (642) LACTOBACILLUS PLANTARUM PROTEGE CÉLULAS VERO DE LA ACCIÓN DE LA TOXINA SHIGA DE ESCHERICHIA COLI ENTEROHEMORRÁGICA. C F Tironi Farinati¹, E J Kakisu^{2,3}, A G Abraham^{2,3}, P F Pérez^{2,3,4}, C Ibarra⁵, G L De Antoni^{2,4,6}

¹Facultad de Medicina, UBA; ²CIDCA. Calle 47 y 116. La Plata (1900); ³Conicet; ⁴Cátedra de Microbiología General. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP; ⁵Laboratorio de Fisiopatología, Dep. Fisiología, Fac. de Medicina, UBA; ⁶CICPBA. <carlatf@gmail.com>

El kefir es un alimento descrito en el Código Alimentario Argentino. Se ha demostrado que la leche fermentada con kefir posee la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos intestinales. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es considerado un patógeno asociado a enfermedades transmitidas por alimentos y causante de diarrea, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico. El objetivo del presente trabajo fue investigar el efecto antagonístico de la cepa de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 aislada de gránulos de kefir frente al daño celular provocado por diferentes cepas STEC. Se incubaron células Vero confluentes con diferentes sobrenadantes de STEC (O157:H7 69:160, O157:H7 433/99, O26:H1197/23A) durante 48hs y se determinó una disminución de la viabilidad celular cuantificada por rojo neutro de aproximadamente 50%. La preincubación de cada uno de los sobrenadantes de STEC con *L. plantarum* CIDCA 83114 pero no con *L. kefir* CIDCA 83113 neutralizó la acción inhibitoria de Stx2 (p<0.01) mostrando que el efecto fue específico.

co. CIDCA 83114 también mostró efecto protector en sobrenadantes de *E. coli* recombinante que expresan únicamente Stx2 lo que indica que la acción protectora del lactobacilo se ejerce sobre Stx2 y no sobre otros factores de virulencia presentes en STEC. Por otra parte, la preincubación de los sobrenadantes de STEC y la *E. coli* recombinante con el anticuerpo anti-subunidad B de Stx2 neutralizó completamente la acción de Stx2 (p<0.01). Resultados preliminares de Western blot muestran que sobrenadantes tratados con CIDCA 83114 pero no con 83113 muestran una desaparición de la subunidad B de Stx2. Los Resultados de estos ensayos *in vitro* demuestran que la cepa CIDCA 83114 posee la capacidad de interaccionar con Stx2 proveniente de diferentes cepas de STEC disminuyendo su actividad citotóxica y sugiere que este lactobacilo podría estar secuestrando o proteolizando la toxina inhibiendo así su acción sobre las células Vero.

GENETICA 01

0164 (61) EXPRESIÓN GENÉTICA DE RECEPTORES ERBB Y SUS LIGANDOS EN MENINGIOMAS HUMANOS. I Laurendeau^{1,2,3}, M FERRER⁴, D Garrido⁵, N D'Haene^{1,2,3}, P Ciavarelli⁴, V FERREIRO⁶, F Giliberto⁷, A Basso⁴, I Bieche^{1,2,3}, I Szijan⁷

¹Université Paris-Descartes, Faculté Des Sciences Pharmaceutiques Et Biologiques; ²Genética y Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ³División Neurocirugía del Hospital De Clínicas; ⁴Facultad De Medicina: Hospital de Clínicas "José De San Martín" División Neurocirugía UBA; ⁵Cátedra de Matemáticas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ⁶Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas "José De San Martín" División Genética, UBA; ⁷Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <iszijan@ffyba.uba.ar>

La familia de receptores de tirosina kinasa ErbB cumple un papel en las principales funciones celulares como proliferación, diferenciación, motilidad y supervivencia. Los ErbBs también fueron involucrados en el desarrollo y progresión de los tumores epiteliales mas comunes. Sin embargo, el papel de estos receptores en meningiomas no fue bien estudiado hasta ahora y la terapia molecular requiere información acerca de las alteraciones que ocurren en tumores. Por lo tanto, es importante detectar los desbalances en las vías celulares y determinar cambios en las moléculas individuales. Como primera aproximación para tratar de entender el mecanismo molecular de la tumorigénesis de meningiomas estudiamos la expresión de los genes receptores-ligandos ErbB a nivel de mRNA. Por medio de la RT-PCR-Tiempo real se cuantificaron los niveles de mRNA de los 4 receptores y sus 11 ligandos en 36 meningiomas de diferentes grados: 23 especímenes grado I (MGI), 9 de grado II (MGII) y 4 de grado III (MGIII). Los receptores ERBB1 y ERBB2 estaban sobreexpresados y los ERBB3 y ERBB4 subexpresados en meningiomas en general. La expresión de los genes de ligandos EGF, TGFA, AREG, DTR y BTC disminuyó en meningiomas de los 3 grados. La expresión de los ligandos neuregulinas, específicos del sistema nervioso, varió dependiendo de la isoforma del ligando y del grado. Un resultado destacado fue la fuerte correlación entre los niveles de mRNA de ERBB1 y ERBB2. El conocimiento acerca de la marcada sobreexpresión en meningiomas de estos dos genes puede ser importante para el uso de los receptores ErbB como blanco para la terapia génica.

0165 (181) EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS TELOMÉRICAS TRF1, TRF2, TANK 1 Y HTERT EN MIELOMA MÚLTIPLE Y GAMMAPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCIERTO. J Panero¹, D Fantl², J Arbelbide², I Slavutsky¹

¹Academia Nacional de Medicina; ²Hospital Italiano <jpanero@unq.edu.ar>

Las proteínas teloméricas TRF1 y TRF2 (Telomere Repeat binding Factors 1 y 2), TANK1 (tankirasa 1) y hTERT (telomerase reverse transcriptase) son importantes en la regulación de la longitud telomérica. En este análisis evaluamos la expresión de las mismas en 32 pacientes con mieloma múltiple (MM) (21 varones; edad media: 70,5 años; rango: 52-86 años; 53% en estadio III) y 25 MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) (9 varones; edad media: 66,4 años; rango: 39-82 años). Se trabajó con RNA de médula ósea de pacientes y sangre periférica de controles (n=9), empleando PCR en tiempo real, con metodología Taq-Man. TRF1 mostró menor expresión en pacientes, con diferencias significativas entre MM y MGUS. La expresión de TRF2, TANK1 y hTERT fue mayor en los pacientes (Tabla 1). En ambas patologías se detectó correlación significativa entre TRF2 y hTERT (MM: $r=0,70$; $p=0,0001$ y MGUS: $r=0,36$; $p=0,07$). En MM se encontró una asociación significativa entre la expresión de TANK1 y la de TRF2 y hTERT ($r=0,80$; $p=0,0001$ y $r=0,45$; $p=0,009$, respectivamente). Tabla 1. Expresión de TRF1, TRF2, TANK1 y hTERT en pacientes y controles

Grupo	TRF1 (Media±ES)	TRF2 (Media±ES)	TANK1 (Media±ES)	hTERT (Media±ES)
Normal	14,3±10,9	0,0001±10 ⁸ *	0,03±10 ⁴ *	0
MGUS	0,56±0,03*	0,06±0,001**	0,28±0,001*	1,60±0,3
MM	0,18±0,003* [?]	0,06±0,001**	0,27±0,008**	1,74±0,5

Diferencias significativas respecto de: controles: * $p=0,0001$; ** $p<0,01$ y MGUS: ? $p=0,03$ Se efectuó correlación entre parámetros clínicos y la expresión de hTERT, dividiendo a los pacientes en dos grupos: <1 (A) y >1 (B). Se observó asociación significativa con los niveles de LDH ($r=0,77$; $p=0,005$) y creatinina ($r=0,73$; $p=0,01$) en los MM del grupo B y con el nivel de b_2 microglobulina ($r=0,74$; $p=0,05$) en los MGUS del grupo B. Estos Resultados indicarían que la expresión de hTERT podría ser un parámetro de valor pronóstico en estas patologías. La diferente expresión de TRF1 en MM y MGUS sugiere que este gen podría participar en la evolución de MGUS a MM.

0166 (638) PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES BMI1 Y PR3 EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC). P Gargallo¹, M Gonzalez¹, M Bianchini¹, V Mercado Guzmán¹, I Larripa¹

¹Depto de Genética. Academia Nacional de Medicina <pmgargallo@yahoo.com.ar>

La LMC se caracteriza por la expresión del gen *BCR/ABL*. A pesar de esta consistente aberración molecular, los pacientes muestran heterogeneidad en la respuesta al tratamiento y curso clínico. El gen *BMI1* regula la proliferación de células *stem* normales y leucémicas. El gen *PR3* codifica el nonapéptido PR1 contenido en los gránulos primarios, el cual induce un efecto antileucemia mediado por linfocitos T citotóxicos. Nuestro objetivo fue estudiar el patrón de expresión de estos genes en las distintas fases de la LMC con el fin de definir marcadores pronósticos de progresión leucémica. A partir de ARN obtenido de leucocitos de sangre periférica se sintetizó cDNA. La expresión se evaluó por PCR en tiempo real en un equipo LightCycler 2.0 (Roche) basado en el sistema Syber-Green. La expresión de β -actina se utilizó como control endógeno. Los grupos de pacientes se compararon con el test de Mann-Whitney. Se evaluaron 51 muestras: 9 al diagnóstico, 17 en fase crónica (FC), 15 en fases avanzadas (FA) y 10 controles normales (N). Al diagnóstico, se observó sobre-expresión de *PR3* (media \pm SEM: $912,7 \pm 251,8$) respecto a N ($0,2 \pm 1,074$) ($p<0,001$), FC ($14,7 \pm 13,5$) ($p<0,0002$) y FA (3238 ± 2936) ($p<0,0069$). El tratamiento llevó a normalizar los niveles de *PR3* en FC. La expresión de *PR3* en FA fue muy variable, identificando casos con elevada, media y baja expresión. El nivel de *BMI1* fue menor en FC ($0,54 \pm 0,15$) (similar a los N) que en FA ($4 \pm 0,82$) ($p<0,0001$). Los pacientes en FC mostraron sub-expresión de *BMI1* y *PR3*, marcando un estado benigno de la LMC. En FA se observó niveles altos de *BMI1*, indicando un estado más agresivo de la leucemia. La sobre-expresión de *BMI1* y sub-expresión de *PR3* se asoció a progresión leucémica y curso fatal. La evaluación prospectiva de

los patrones de expresión de estos genes permitiría identificar perfiles genéticos de progresión leucémica posibilitando la correcta estratificación de la enfermedad y optimización de las decisiones terapéuticas.

0167 (194) INVESTIGACIÓN DEL POLIMORFISMO 5-HTTLPR DEL GEN TRANSPORTADOR DE SEROTONINA (SLC6A4) EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES ARGENTINOS QUE PADECEN DEPRESIÓN MAYOR -RESULTADOS PRELIMINARES- A R Cajal¹, M A Redal², J L Faccioli³, C A Finkelsztejn³, P F Argibay²

¹ICBME- HOSPITAL ITALIANO DE BUENOS AIRES; ²Unidad de Medicina Molecular y Genómica. Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) - Hospital Italiano de Buenos Aires; ³Servicio de Psiquiatría - Hospital Italiano de Buenos Aires <andrea.cajal@hospitalitaliano.org.ar>

En la depresión mayor el perfil genético se ha asociado al riesgo de padecer la enfermedad. Entre los genes implicados se encuentra el del transportador de serotonina que presenta un polimorfismo (5-HTTLPR) caracterizado por una inserción/delección de 44 pb (alelos L y S). El alelo L tiene mayor actividad transcripcional con diferencias en la expresión de la proteína transportadora y en su recaptación. L estaría asociado a psicosis y agresión y S a comportamiento suicida, depresión y desórdenes bipolares. Sin embargo, los Resultados no son concluyentes. **Objetivos:** Analizar y establecer el riesgo relativo del polimorfismo 5-HTTLPR en pacientes argentinos que sufren de depresión mayor vs grupo control. Se estudiaron 43 pacientes (32 mujeres, 11 hombres; edad X:55,3) no relacionados que padecen depresión mayor (DSM-IV, HAMD y MINI) y 54 individuos sanos (35 mujeres, 19 hombres; edad X:36), negativos según las mismas escalas. A partir de sangre periférica, se extrajo ADN y se determinó el polimorfismo del gen SLC6A4 por PCR con primers de secuencias específica. Se calcularon las frecuencias alélicas y génicas para ambas poblaciones. Resultados: En los controles las frecuencias alélicas fueron L:0,56 y S:0,44 y génicas LL:29,63%;LS:51,85%;SS:18,52%, encontrándose en equilibrio H-W ($\chi^2=0,135$; $p=0,6$), y similares a las publicadas en otras poblaciones. En pacientes: L:0,44;S:0,56 y LL: 11,63%; LS: 65,12%; SS: 23,26%, con valores que se desvían del equilibrio H-W ($\chi^2=4,41$; $p<0,05$) y con diferencias significativas de las frecuencias génicas entre grupos ($\chi^2=7,56$; $df=2$; $p<0,05$) Dado que la eficiencia transcripcional de S sería menor, se agrupó a sujetos LS y SS en un modelo dominante estableciéndose un riesgo de OR:3,2 ($\chi^2=9,05$; 95% IC=1,54-7,09; $p<0,003$) **Conclusiones:** Nuestros Resultados muestran que, al igual que en series no locales de individuos caucásicos, el alelo S del gen SLC6A4 se encuentra significativamente asociado a trastornos depresivos mayores.

0168 (304) BASES CLÍNICAS, BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES DE LOS DESÓRDENES CONGÉNITOS DE LA GLICOSILACIÓN PROTEICA: AVANCES METODOLÓGICOS PARA LA INVESTIGACIÓN Y EL DIAGNÓSTICO DE ESTE NUEVO GRUPO DE PATOLOGÍAS METABÓLICAS HEREDITARIAS EN NUESTRO PAÍS. M B Bistué Millón¹, M A Delgado¹, N B Azar¹, M Di Rienzo¹, N Guelbert¹, P Briones², G Mattheijs³, J Jaeken⁴, C G Asteggiano^{5,6}, R Dodelson de Kremer¹

¹CEMECO (Centro de Estudio de la Metabolopatías Congénitas) Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.; ²Institut de Bioquímica Clínica, Barcelona, España.; ³Department for Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.; ⁴Center for Metabolic Diseases Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.; ⁵CEMECO (Centro de Estudio de Metabolopatías Congénitas) Hospital de Niños de la Santísima Trinidad, Cátedra de Clínica Pediátrica, Facultad de Cs Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; ⁶Cát. de Qca. Biol., Fac. Medicina, Univ. Católica Córdoba <osh_bea@hotmail.com>

Los Desórdenes Congénitos de Glicosilación Proteica (CDG), son enfermedades hereditarias, causadas por alteraciones en la biosíntesis (CDG Tipo I) y/o en el procesamiento posterior de los N- u O-glicoconjugados (CDG tipo II). Presentan compromiso multisistémico, (hepatopatías, coagulopatías, enteropatías, etc.), con alteraciones neurodegenerativas predominantes. **Objetivo:** Desarrollar y estandarizar aspectos clínicos, bioquímicos y moleculares, para investigación y diagnóstico de los Desórdenes Congénitos de la Glicosilación (CDG) en Argentina. **Metodología:** A) Estudios de N-glicoproteínas séricas: 1) Transferrina (Tf) y Haptoglobina(Hp) analizadas por *Western blot (Wb)* e isoelectroenfocado (IEF); 2) En las clases más frecuentes de CDG (CDG-Ia y I-b), se analizó las actividades enzimáticas de fosfomanomutasa (PMM2) y fosfomanosaisomerasa (PMI) y ambos genes, mediante PCR y secuenciación. B) Se estudiaron defectos combinados de N-y O-glicosilación por Wb e IEF Apolipoproteína CIII (ApoCIII). Se descartaron variantes polimórficas y otras patologías capaces de alterar secundariamente las N-glicoproteínas. Resultados: Se observó hipoglicosilación proteica: (A) Desplazamiento catódico de las isoformas de Tf, con perfil de IEF CDG Tipo I (incremento de di- y asialo-Tf) (n:3), en estos pacientes se analizaron ambas enzimas (PMM2 y PMI) y genes responsables, descartando las clases más frecuentes; (B) desplazamiento catódico con patrón de IEF-Tf CDG Tipo II (incremento de trisialotransferrina y/o bandas catódicas (n:8) y (C) se observó incremento de las isoformas patológicas, ApoCIII₁ y ApoCIII₂, y disminución de la mayoritaria, ApoCIII₃, en pacientes con perfiles de IEF-Tf alterados. **Discusión:** La implementación progresiva de protocolos clínicos, bioquímicos y moleculares para el estudio de las CDG, han permitido abordar de manera interdisciplinaria este capítulo inédito para el hallazgo de los primeros pacientes en nuestro país. PIP6338/Min.Salud Nación/ PICT2350/UCC2008.

0169 (313) HETEROGENEIDAD DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA FERROQUELATASA EN PACIENTES CON PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA EN ARGENTINA. E P Colombo^{1,2}, M V Rossetti^{1,2}, A Batlle², V E Parera^{1,2}

¹Dto. de Química Biológica. FCEyN-UBA; ²Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias-CONICET <fpcolombo@hotmail.com>

La protoporfiria eritropoyética (PPE) se produce por una deficiencia parcial de la enzima Ferroquelatasa codificada por el gen FECH. Presenta herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta y casos de herencia autosómica recesiva. Mundialmente se estudiaron unas 290 familias con 14 casos de herencia autosómica recesiva y 2 con dos mutaciones en el mismo alelo. De los 22 casos con falla hepática, 5 fueron de herencia autosómica recesiva. El objetivo fue determinar el grado de heterogeneidad de mutaciones, herencia predominante, tipo de mutación y presencia de falla hepática en pacientes con PPE. Se analizaron 17 familias de 35 diagnosticadas bioquímicamente como PPE. Se amplificaron los 11 exones del gen FECH, se purificaron los productos de PCR obtenidos y se secuenciaron automáticamente. Se estudió la presencia de ambos alelos del gen FECH analizando 4 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) intragénicos por digestión enzimática de productos de PCR específicos. En 13 familias se detectaron 14 mutaciones responsables de PPE encontrándose solo la mutación R115X en 2 familias. Se descartó la delección completa del gen FECH en las familias a las que no se les detectó aun la mutación, al resultar heterocigotas para varios SNPs intragénicos. Predominaron las mutaciones de sustitución de nucleótido simple en la región codificante (50%) con mayor prevalencia de mutaciones nonsense (28,57%). La prevalencia entre formas de PPE autosómica dominante o recesiva fue de 92,3% y 7,7% respectivamente. Se observaron dos casos con falla hepática fatales, uno de los cuales presentó herencia autosómica recesiva. Se determinó la heterogeneidad de mutaciones en Argentina para el gen FECH así como la mayor incidencia de mutaciones nonsense determinada para una población. Las diferencias clínicas observadas en pa-

cientes con el mismo genotipo sugieren la existencia de otros factores, capaces de influir en la severidad de la enfermedad y que serán objeto de próximos estudios.

0170 (516) ESTUDIO DE LA REGIÓN REGULATIVA LEJANA DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN CYP21A2 LOCALIZADA EN EL INTRÓN 35 DEL GEN C4 EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA. C S Fernández^{1,2}, C Minutolo³, N Buzzalino², A Oneto⁴, M Stivel⁴, S Belli⁴, T Pasqualini⁵, E Charreau¹, L Alba², L Dain^{1,2}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²Centro Nacional de Genética Médica; ³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.; ⁴División Endocrinología Htal. Durand; ⁵Servicio Pediatría Htal. Italiano <cecifer@dna.uba.ar>

Alrededor del 95% de los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita se deben a la deficiencia de la enzima 21-hidroxilasa, siendo esta la enfermedad autosómica recesiva de mayor frecuencia. La enzima es codificada por el gen CYP21A2 que se encuentra generalmente duplicado en tándem junto a los genes del factor 4 del complemento, en el siguiente orden de telómero a centrómero: C4A, CYP21A1P (pseudogen), C4B, CYP21A2 (gen activo). La homología entre los C4 y CYP21 es 99 y 98%, respectivamente. Wijesuriya y col. (1999) demostraron que una región entre -4.6Kb y -5.6Kb del CYP21A2 en el intrón 35 (I35) del C4, que incluye al promotor Z (PZ), actúa como un "enhancer" de la transcripción del gen CYP21A2. Sin embargo, esta región está escasamente analizada como posible causa de la deficiencia. El objetivo del trabajo fue evaluar posibles variaciones en la región del PZ en pacientes con deficiencia de 21-hidroxilasa. La región de interés se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de 93 pacientes y los fragmentos se analizaron por SSCP en 3 condiciones y posterior secuenciación. Se halló un cambio A>G en 3 pacientes. Mediante secuenciación del PZ amplificado a partir de un fragmento de 6 KB obtenido con un "primer" específico del CYP21A2, se comprobó que el cambio se ubica específicamente en el I35 del C4 adyacente al gen. La presencia de la sustitución A>G fue analizada en 196 alelos de individuos controles mediante PCR "mismatch" y digestión con BstXI, hallando sólo un alelo con la variante G. Nuestros Resultados están indicando, por primera vez, la presencia de una variación en la región del PZ. Mediante la utilización de herramientas de bioinformática y posterior realización de ensayos de expresión *in vitro* estudiaremos si esta variante modula la expresión del gen CYP21A2.

GENETICA P1

0171 (7) ALGORITMO MOLECULAR DEL RECEPTOR HER2-NEU EN PACIENTES CON CANCER DE MAMA. V C Denninghoff¹, M Canepa¹, F Perazzo¹, F Paesani¹, S Nieto¹, A Garcia¹, A Avagnina¹, B Elsner¹

¹CEMIC <vdenninghoff@cemic.edu.ar>

El cáncer de mama en Argentina ocupa el primer lugar entre las causas de mortalidad en mujeres. El Trastuzumab reduce el 50% de recurrencia en estadio temprano, y el 20% de muerte en cáncer metastásico. El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra la proteína transmembrana HER2, que mapea en 17q12-21.32 y es sobre-expresada en células neoplásicas (25-30%). Para detectar esta amplificación se emplea inmunohistoquímica (IHQ). Los Resultados 2+ son indefinidos para tomar conducta terapéutica, por lo tanto se necesitan técnicas adicionales como el FISH (Hibridación in Situ Fluorescente) que no permite la correlación de la morfología con la señal. Esta desventaja se soluciona mediante técnicas híbridas como el CISH (Hibridación in Situ Cromogénica). El objetivo del trabajo es comparar los Resultados obtenidos con FISH y CISH, en biopsias con diagnóstico de cáncer de mama invasor con IHQ 2+. Entre 1999 y 2004, se recibieron 210 cuadrantectomías y mastectomías con cáncer de mama. Se es-

tudiaron retrospectivamente mediante IHQ y se seleccionaron 30 pacientes con carcinoma primario de mama, IHQ 2+, y con previo resultado de FISH. Se realizó CISH y análisis estadístico. Por FISH fueron 17/30 (56,7%) positivos, y 13/30 (43,3%) negativos. Por CISH fueron 18/30 (60%) positivos, 8/30 (26,7%) negativos, y 4/30 (13,3%) no reactivos (1/4 FISH positivo y 3/4 negativo). El CISH con respecto al FISH presentó una Sensibilidad: 100%; Valor Predictivo Negativo: 100%; Especificidad: 80%; Valor Predictivo Positivo: 89%; Concordancia: 24/26; y Exactitud global: 92%. Si bien el número de casos estudiados fue limitado, estos Resultados nos permitieron construir un algoritmo diagnóstico en el que solo los pacientes positivos y no reactivos para CISH deberían ser confirmados mediante FISH para determinar la conducta terapéutica a seguir.

0172 (156) DETERMINACIÓN GENÉTICA DEL SEXO FETAL A TRAVÉS DEL ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN FETAL LIBRE EN PLASMA MATERNO. C V Sesarini¹, M L Giménez², M A Redal¹, G Izbizky², H Aiello², P F Argibay¹, L Otaño²

¹UNIDAD DE MEDICINA MOLECULAR Y GENÓMICA, INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y MEDICINA EXPERIMENTAL, HOSPITAL ITALIANO DE BUENOS AIRES; ²Servicio de Obstetricia, Hospital Italiano de Buenos Aires <krlesesarini@yahoo.com>

Introducción: El diagnóstico genético de sexo fetal se ha valido tradicionalmente de Metodologías invasivas; sin embargo la presencia de ADN fetal libre (ADNfl) en plasma materno permite identificar alelos de origen paterno como, por ejemplo, aquellos propios del cromosoma Y. **Objetivo:** Evaluar la factibilidad y la eficacia diagnóstica y predictiva de la evaluación de sexo fetal a través del análisis de ADNfl en plasma materno. **Materiales y Metodologías:** Se analizaron 47 muestras de sangre de embarazadas (edad gestacional media 30 semanas, rango 7 a 41), se separó el plasma y se extrajo ADN. Se amplificó una secuencia del marcador DYS14 (cromosoma Y) en un termociclador en tiempo real y se utilizó b-Actina como control interno. Los Resultados se expresaron en asignación de sexo masculino (DYS14 positivo) y femenino (DYS14 negativo) y se compararon con el fenotipo sexual del recién nacido (RN). Se calculó la sensibilidad, especificidad y valor predictivo. Resultados: Se detectó b-Actina en todas las muestras analizadas. La asignación de sexo fue correcta en 44 casos (93,6%) correspondiendo 26 RN masculinos (sensibilidad 96,3%) y 18 RN femeninos (especificidad 90%). El valor predictivo para sexo masculino fue 92,8% y para sexo femenino 94,7%. **Conclusión:** La asignación de sexo fetal a través del análisis de ADNfl en plasma materno fue factible con un nivel alto de certeza. Esta técnica permitiría mejorar el asesoramiento y manejo prenatal de embarazos en riesgo de patologías como: enfermedades ligadas al X o hiperplasia suprarrenal congénita. Incluso existiría la posibilidad de detectar en plasma materno polimorfismos asociados con alelos paternos como estrategia diagnóstica de enfermedades autosómicas recesivas. **Discusión:** La determinación del sexo fetal a través de secuencias del cromosoma Y es certera y eficaz. La incorporación a la prueba de otros marcadores del cromosoma Y y un mayor control de posible contaminación permitirá aumentar aún más la eficacia diagnóstica.

0173 (307) ALTERACIONES ESTRUCTURALES DEL CROMOSOMA 14 EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA. A C Travella¹, C Chena¹, G Arrossagaray¹, I Slavutsky¹

¹Academia Nacional de Medicina <anatr@rcc.com.ar>

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en adultos en occidente. El análisis citogenético permite detectar alteraciones estructurales específicas que podrían definir subgrupos con diferente evolución clínica. En este trabajo se

evaluaron las alteraciones que involucran al cromosoma 14 (C14) a fin de determinar su frecuencia e impacto clínico en nuestros casos con LLC. Se realizó cultivo de sangre periférica con estimulación mitogénica y análisis cromosómico con técnica de bandeado G complementado con FISH con sondas específicas (LSI p53/ATM/13q14/13q34/CEP12) en 210 pacientes. Se detectaron 48 casos (23%) con alteraciones estructurales. Dentro de este grupo, 10 pacientes (20%) presentaron anomalías que involucraban al C14 (6 varones; edad mediana: 69 años; rango: 51-79; estadios clínicos Rai: 0: 1, I-II: 5, III-IV: 4). Las mismas correspondieron a 6 deleciones: del(14)(q22) [2] y del(14)(q24) [4], dos de las cuales se encontraban acompañadas por una traslocación involucrando al otro C14 en el cariotipo: der(14)t(10;14)(q11;p11) y t(14;18)(q32;q21), 3 translocaciones: t(10;14)(q11;p11), t(2;14)(p11;q32) y t(14;18)(q32;q21), las dos últimas formando parte de un cariotipo complejo, y 1 inversión: inv(14)(q22q32). Si bien el grupo es pequeño, se detectó una corta sobrevida libre de tratamiento (9 meses). Los puntos de ruptura 14q22 y 14q32 fueron los observados con mayor frecuencia. Nuestros datos fueron comparados con los reportados en la bibliografía, detectándose un total de 1974 pacientes con LLC con alteraciones de los cuales 449 (23%) presentaron anomalías estructurales en el C14. Este análisis permitió observar que los marcadores der(14)t(10;14)(q11;p11) e inv(14)(q22q32) no fueron previamente descritos, así como la presencia de un solo caso reportado con la t(2;14)(p11;q32), la que se transformaría en recurrente a partir de nuestros datos. Estos hallazgos sustentan la importancia de la continuidad de los estudios citogenéticos en LLC.

0174 (316) LA VARIANTE DEL GEN DEL SUPRESOR DE LA SEÑALIZACIÓN DE CITOQUINAS (SOCS-3) SE ASOCIA CON LA PRESIÓN ARTERIAL DIASTÓLICA EN ADULTOS. I Fernández Gianotti¹, S Sookoian¹, C Gemma¹, A Burgueño¹, C J Pirola¹

¹Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas, Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, Universidad de Buenos Aires - IDIM - CONICET, Argentina <tfgianotti@hotmail.com>

SOCS-3 es un regulador negativo de la cascada de señalización de citoquinas y de la leptina. También participa en la inhibición de la acción de la insulina, por lo que podría influir en la resistencia a la leptina y a la insulina. El objetivo de este trabajo fue estudiar la asociación de un polimorfismo de nucleótido único (SNP) del gen SOCS3 con los componentes del síndrome metabólico. **Sujetos y Metodologías:** Se realizó un estudio de sección transversal en 1106 individuos (edad: 34.4 ± 8.6 años) de sexo masculino, seleccionados de población general: 501 sujetos (45.3%) presentaron sobrepeso/obesidad (Índice de Masa Corporal, IMC>27.0), y componentes del Síndrome Metabólico. Un SNP del gen SOCS3 (tagSNP) fue seleccionado de la base HapMap con una frecuencia del alelo menor >10% (rs4969168 A/G) comprendiendo 3.3 kb del cromosoma 17 y representando a 2 sitios polimórficos con un $r^2 > 0.8$. La genotipificación del SNP se realizó por PCR alelo específica utilizando la metodología de PCR en tiempo real. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ética de la institución. **Resultados:** Las frecuencias alélicas del SNP fueron: A = 16.5% y G = 83.5%, en equilibrio de Hardy Weinberg. Se observó que el rs4969168 se asoció a la presión arterial diastólica (PAD), los individuos GG (N=734) presentaron menores valores de PAD (media ± DS: 75.9 ± 10.4 mm Hg) que los AA+AG (N=307; 77.2 ± 9.6 mm Hg) (Mann Whitney, p<0.05), explicando un 0.3-0.4 % de la varianza de la PAD aun ajustando por IMC o HOMA. No se observó ninguna asociación significativa entre el SNP estudiado y el IMC o la insulino resistencia, u otro componente del Síndrome Metabólico. **Conclusión:** nuestros Resultados, que deben ser replicados, muestran por primera vez que en población masculina adulta la variante del gen SOCS3 se asociaría a la presión arterial diastólica.

0175 (333) SONDAS MONOCATENARIAS DE ADN DIRECCIONAL PARA DETECTAR INVERSIONES CON CITOGENÉTICA MOLECULAR. V L Farini¹, P Sipowicz¹, A Laudicina¹, M Radrizzani¹

¹Laboratorio de Neurociencias y Citogenética Molecular, UNSAM <vfarini@unsam.edu.ar>

Las inversiones cromosómicas cambian la orientación a los genes y pueden ocasionar una falla en la regulación de los mismos, transformación o mutación trayendo a consecuencia la muerte de la célula o una forma tumoral. Ninguna técnica citogenética hasta hoy disponible como FISH, CGH, SKY FISH o PRINS podría detectarlas. Tampoco Metodologías como PCR o micro-arreglos de ADN. El desarrollo de sondas "cromátide-específicas" permitiría observar las inversiones como un salto de una cromátide a la inversa y complementaria dentro de la región de manera tal que podrán ser fácilmente detectadas, desarrollando así una herramienta nueva para el análisis citogenético. Nuestra hipótesis de trabajo es que es posible fabricar una sonda unifilar direccionada para estudios citogenéticos. La metodología utilizada en este trabajo consiste en microdisecciones de cromosomas, su amplificación por PCR, la orientación de las cadenas en metafases unifilares y la microdisección de las cadenas positivas y negativas por separado. El modelo utilizado es el Cromosoma 9 humano por creerse que micro-inversiones son productoras de infertilidad masculina. Nuestros Resultados muestran el desarrollo de una sonda centromérica para identificar el cromosoma 9, la microdisección de los brazos cromosómicos, su amplificación por PCR y el clonado en una biblioteca. Finalmente se lograron metafases unifilares de células sanguíneas humanas para orientar la biblioteca. Se discuten los **Metodologías** de obtención de sondas unifilares a partir de bibliotecas clonadas del cromosoma 9 comparando los Resultados con solo microdisección y PCR.

0176 (435) ANÁLISIS DEL EFECTO DEL POLIMORFISMO 1527 DEL GEN CD24 EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE. S J González¹, J I Rojas², M A Redal¹, L Patrucco², J Correale³, E Cristiano², P F Argibay¹

¹Unidad De Medicina Molecular y Genómica del Hospital Italiano de Buenos Aires.; ²Servicio de Neurología del Hospital Italiano de Buenos Aires.; ³Area Neuroinmunología FLENI <sergioj.gonzalez@hospitalitaliano.org.ar>

La Esclerosis Múltiple (EM) constituye la enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central más frecuente. Datos disponibles respecto a su causa sugieren una etiología multifactorial, incluyendo factores genéticos y ambientales, con un modo de herencia poligénica. Estudios previos han demostrado que el polimorfismo caracterizado por deleciones en 2 nucleótidos (TG/del) de la posición 1527 del gen CD24 podrían conferir protección contra la EM. El estudio de dicho polimorfismo permitiría cuantificar su contribución sobre el riesgo relativo de desarrollar EM. **Objetivos:** investigar la asociación entre el polimorfismo 1527 del gen CD24 y EM, comparando las frecuencias de los alelos (TG/del) en un grupo de pacientes versus un grupo control. **Materiales y Metodologías:** se analizaron 38 pacientes mayores de 18 años, de ambos sexos, con diagnóstico de EM definida de acuerdo a los criterios de McDonald y 40 individuos sanos no relacionados mayores de 18 años, de ambos sexos, como grupo control. Se extrajo el ADN a partir de sangre periférica, se amplificó la región polimórfica por PCR anidada con cebadores específicos. La genotipificación se realizó mediante el análisis de los fragmentos de restricción obtenidos mediante utilización de la enzima Bsr I. Resultados: en el grupo control las frecuencias fueron: Alélicas: TG:0.94 y del:0.06; Genotípicas: TG/TG:0.90; TG/del:0.10; del/del:0. En los pacientes, las frecuencias fueron Alélicas: TG:0.93 y del:0.07; Genotípicas: TG/TG:0.868; TG/del:0.131; del/del:0. No se encontraron diferencias entre las frecuencias de homocigotas y heterocigotas entre casos y controles ($p=0.734$, $OR=0.73$; IC 95% 0.13-3.74; no significativo para test de Fisher). **Conclusiones:** los Resultados de este trabajo difieren de los publicados para pobla-

ciones caucásicas de EEUU, ya que no se encontraron diferencias significativas al comparar casos versus controles. Estos Resultados podrían deberse a la diferencia en la composición genética de nuestra población.

0177 (504) FACTORES GENÉTICOS PREDISONENTES AL DESARROLLO DE ANTICUERPO INHIBIDOR DEL FACTOR VIII (FVIII) TERAPÉUTICO EN HEMOFILIA A (HA) SEVERA. L Rossetti¹, I Szurkalo¹, C P Radic¹, M Candela¹, I B Larripa¹, C D De Brasi¹

¹Academia Nacional de Medicina <rossetti@hematologia.anm.edu.ar>

La HA es una coagulopatía hereditaria ligada al X que afecta 1:5000 varones causada por mutaciones deletéreas en el gen del FVIII (*F8*). La sustitución del factor ausente permite tratar al hemofílico con eficacia. Sin embargo, el desarrollo de inhibidor del FVIII terapéutico torna inefectiva la terapia afectando al 20-30% de los pacientes con HA severa. El desarrollo de inhibidor en hemofilia es considerado un rasgo multifactorial, involucrando factores genéticos y ambientales. **Objetivo:** caracterizar los factores genéticos que predisponen a desarrollar inhibidor. Se caracterizó la mutación causal en 102 pacientes con HA severa por aplicación de un algoritmo de análisis del *F8* establecido en la Argentina. También fueron estudiados tres polimorfismos potencialmente modificadores del riesgo a desarrollar inhibidor: IL10 (*interleukin 10*) (CA-repeat, CA₁₉, 134 pb: alto riesgo), TNFA (*tumor necrosis factor- α*) (-308 G/A, A: alto riesgo) y CTLA4 (-318 C/T, T: alto riesgo). Desarrollaron inhibidor 32 pacientes con HA severa (31%). Observamos en el grupo de alto riesgo de inhibidor (64%, 9/14): deleciones de más de 1 exón (83%, 5/6) y defectos *nonsense* en la cadena liviana del FVIII (50%, 4/8); en el grupo de riesgo intermedio (30%, 22/74): defectos *nonsense* en la cadena pesada del FVIII (2/4), *frameshift-ins/del* (33%, 6/18), la Inv22 (28%, 13/47), defectos de *splicing* (1/3) y deleciones de 1 exón (0/2), y en el grupo de bajo riesgo (0/14): *in-frame-ins/del* (0/1), la Inv1 (0/2) y defectos *missense* (0%, 0/11). En contraste con un estudio europeo, no se observaron asociaciones estadísticas entre los alelos de riesgo de los polimorfismos de IL10, CTLA4 y TNFA ni por separado ni cuando fueron considerados en conjunto; con el riesgo a desarrollar inhibidor. En conclusión, nuestros Resultados permiten determinar en nuestra población que el tipo y ubicación de la mutación causal de hemofilia en el *F8* es el factor genético más influyente para desarrollar inhibidor.

0178 (569) INVESTIGACIÓN CLÍNICA-BIOQUÍMICA DE LOS DEFECTOS GENÉTICOS DE DEFICIENCIA DE CREATINA CEREBRAL. L D Martínez¹, A Fochesato¹, M Bezar¹, S Antonozzi¹, N Guelbert¹, R Dodelson de Kremer¹

¹Centro de Estudio de las Metabolopatías Congénitas (CEMECO) <dormar50@hotmail.com>

Introducción: Los defectos genéticos de deficiencia en creatina (DGDC) constituyen alteraciones en la biosíntesis y transporte de la creatina (Cr): deficiencias en a) arginino:glicino amidinotransferasa (dAGAT), b) guanidinoacetato metiltransferasa (dGAMT) y c) del transportador de la Cr (dCRTR). La d-AGAT y d-GAMT de transmisión autosómica recesiva y ligada al X la d-CRTR. Las manifestaciones clínicas más frecuentes incluyen retardo mental, convulsiones, signos piramidales y extrapiramidales, alteraciones del lenguaje, autismo e hipotonía. El protocolo de investigación consiste en: I- Selección de pacientes compatibles, II- Análisis bioquímicos, III- Espectroscopía de resonancia magnética protónica, IV- Medición de actividad enzimática en AGAT, GAMT y de la funcionalidad del transportador en dCRTR, V- Análisis molecular. Es propósito presentar parte del protocolo que muestra el estado de avance bioquímico. **Metodología:** Serie de 200 muestras urinarias compatibles. Medición de guanidinoacetato (GAA), Cr por cromatografía gaseosa y creatinina (Crn) por el método de Jaffé. Resultados y discusión: Se observaron tres perfiles bioquímicos de GAA y Cr: I- no detectado en 5 pacientes (P), II- marcado incre-

mento en 4 P, ambos grupos con valores de Cr y Crn normales y III- 8 P con concentración normal de GAA y un aumento de Cr. Los Resultados indican datos bioquímicos de aproximación a posibles dGDC. Conclusión: La prosecución metodológica se dirige a completar los pasos consecutivos del protocolo. La importancia de su ejecución estriba en la posibilidad de manejo terapéutico en las dGAMT y dAGAT, el circunscribir familias involucradas y brindar el correcto asesoramiento genético.

0179 (573) ANALISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA FERROQUELATASA. F P Colombo^{1,2}, J E Martinez^{1,2}, M V Rossetti^{1,2}, A Batlle², V E Parera^{1,2}

¹Dto. de Química Biológica. FCEyN-UBA; ²Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias-CONICET <fpcolombo@hotmail.com>

Las variaciones en el genoma son responsables de características fenotípicas en los individuos incluyendo la predisposición a desórdenes complejos. Un ejemplo son los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), capaces de inducir diferentes plegamientos en el mRNA, con potencialidad de ocasionar cambios en elementos reguladores de splicing causando efectos deletéreos sobre el pre-mRNA. La protoporfiria eritropoyética (PPE) es un desorden hereditario de la biosíntesis del Hemo, causado por deficiencia parcial de la enzima Ferroquelatasa cuyo gen FECH presenta herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. Al menos 285 SNPs contribuyen a modular en trans la penetrancia de la enfermedad más allá de la mutación portada. Nuestro objetivo fue determinar la prevalencia de SNPs en el gen FECH en pacientes PPE en busca de un perfil genético que los caracterice. Analizar la prevalencia poblacional de estos SNPs y determinar el perfil genético de familiares. Se analizaron 24 pacientes, 20 familiares y 60 controles. Se estudiaron 5 SNPs intragénicos: -251 A/G; IVS1-23C/T; IVS3-48T/C; 798 G/C y 921 G/A, amplificando la región que los contenía por PCR. Los fragmentos obtenidos se secuenciaron automáticamente ó digirieron con endonucleasas. Al comparar los Resultados obtenidos para los distintos SNPs mediante Chi², se observaron diferencias significativas entre pacientes y controles en 3 de 4 SNPs, excepto el 798 G/C. El 100% de los pacientes portaron al menos 3 de los 5 SNPs. En el 100% de los pacientes actuarían mecanismos de degradación de mRNA y de éstos, en el 85% se observarían, además, fallas en elementos estructurales exónicos. La compleja relación entre fenotipo y genotipo en PPE tal vez se deba a la acumulación en cis de SNPs de funcionalidad diversa modulando en trans la expresión clínica de la enfermedad. La presencia de variaciones de secuencia genómica nos permiten predecir el desarrollo de la enfermedad en familiares y a futuro la severidad de la misma.

0180 (624) CARACTERIZACIÓN DE DIFERENTES DELECCIONES EN NIÑOS CON SÍNDROME DE PRADER WILLI (SPW) MEDIANTE MLPA. M E Foncuberta¹, M Torrado¹, H V Aráoz¹, K Abraldes¹, E Baialardo¹, R Cánepa¹, L Chertkoff¹

¹Hospital de Pediatría Prof. Juan P. Garrahan <eugefoncu@gmail.com>

El SPW es una enfermedad multisistémica, causada por deficiente expresión de genes paternos de la región 15q11-13. El 70% de los casos presentan delección de esta región, 25% disomía uniparental materna y 5% defectos de impronta. La delección se subdivide en dos grupos según su tamaño: tipo I y tipo II. La primera incluye la pérdida de cuatro genes no improntados (NIPA1, NIPA2, CYFIP1 y TUBGCP5) cuyas funciones aun no son bien conocidas. **Objetivo:** - Identificar la frecuencia de las delecciones I y II en niños con SPW. - Evaluar las diferencias fenotípicas entre ambos grupos. **Metodologías:** 53 pacientes con SPW por delección fueron estudiados por MLPA, que consiste en la hibridización con sondas en la región de interés y sondas controles, ligación y posterior amplificación de las mismas por PCR. Los productos son separados por electroforesis capilar. En la evaluación clínica se aplicaron los criterios diagnósticos de Holm. En 21 pacientes se analizó el cociente intelectual (CI) con test de WISCIII y en 16 la

conducta adaptativa (CA) con test de Vineland. Resultados: La media de edad fue de 3,76 años, 25 mujeres y 28 varones. De los 53 pacientes, 28 (52.8%) presentaron delección tipo I, 23 (43.4%) tipo II, un paciente presentó sólo delección del gen SNRPN y el restante presentó una variante atípica. La correlación con los signos clínicos, CI y CA no mostró diferencias significativas entre ambos grupos. **Conclusiones:** Las frecuencias de ambos tipos de delección fueron similares a las descriptas en la literatura internacional. Sería necesario contar con un mayor número de pacientes con evaluación clínica, intelectual y conductual para confirmar los Resultados obtenidos en este estudio.

0181(287) ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS EN PACIENTES ARGENTINOS CON PORFIRIA VARIEGATA. B X Granata¹, P Marques Serra^{1,2}, V E Parera^{1,2}, A Batlle¹, M V Rossetti^{1,2}

¹CIPYP-CONICET-Hospital de Clínicas-UBA; ²Dpto de Química Biológica-FCEN-UBA <xoyoana@yahoo.com.ar>

La protoporfirinógeno oxidasa cataliza el octavo paso del camino del hemo y su deficiencia produce Porfiria Variegata (PV). El estudio genético de 27 familias PV Argentinas indicó que 10 portan la misma mutación (c.1043insT). Dado el alto grado de heterogeneidad molecular que caracteriza a las porfirias, se propuso realizar el estudio de haplotipos con el fin de determinar si esta elevada prevalencia se debe a un efecto fundador o a eventos mutacionales independientes. Se analizaron 7 SNPs intragénicos por secuenciación directa, dividiendo a los pacientes en 3 grupos: con la mutación más común (n=10), con otras mutaciones (n=21) e individuos normales (n=15). En la Tabla se muestran las frecuencias alélicas (calculadas por conteo de alelos) que en el grupo control se ajustan al equilibrio de Hardy-Weinberg, indicando que estos SNPs constituyen polimorfismos estables en nuestra población. Los SNPs -247 A>C e IVS2-47 G>C son los más variables existiendo diferencias significativas entre los grupos sólo para el primer caso (p=0.0357 y p=0.2269, respectivamente). El 100% de los pacientes con la mutación más común comparten el alelo C⁻²⁴⁷ - G⁻²⁴⁶ - G⁻²⁴⁰ - G⁻¹⁵¹ - C⁻¹²⁸ - C^{IVS2-47} - C^{IVS5-86}, mientras que los pacientes con otras mutaciones y los controles presentan este alelo en un 76% y 66% de los casos, respectivamente. Estos Resultados no nos permitirían inferir con seguridad la ocurrencia de un efecto fundador. Sin embargo esta hipótesis no se puede descartar completamente dado que, debido a la escasa disponibilidad de familiares, no se pudo analizar aún la segregación de alelos. Se están estudiando además microsatélites extragénicos con el fin de obtener información adicional acerca del origen de esta mutación tan recurrente en Argentina.

SNP	Frecuencias Alélicas		
	INS	OTRA	NORMAL
-247 A>C	0.2/0.8	0.45/0.55	0.56/0.44
-246 G>T	1/0	1/0	1/0
-240 G>C	1/0	1/0	1/0
-151 G>T	1/0	0.97/0.03	0.96/0.04
-128 C>G	1/0	0.8/0.2	1/0
IVS2-47 G>C	0.2/0.8	0.43/0.57	0.26/0.74
IVS5-86 C>T	1/0	0.9/0.1	1/0

HEMATOLOGIA O1

0182 (38) BASES MOLECULARES DEL EXCEPCIONAL FENOTIPO P. A PROPOSITO DE UN CASO. C D De La Vega Elena^{1,2,3}, Å Hellberg⁴, M Pivetta¹, M A Raillon^{1,3}, S Chialina^{1,3}, M Olsson⁴, E Solis^{1,3}

¹Servicio de Hematología y Medicina Transfusional. Hospital Italiano "Garibaldi"; ²Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe; ³Instituto Universitario Italiano de Rosario; ⁴Centro de Sangre, Hospital Universitario. Lund, Suecia <daniel.delavega@yahoo.com>

Los antígenos glucídicos de Grupo Sanguíneo P^k, P y P1 están estructuralmente relacionados y su expresión, al igual que los antígenos del sistema de grupo sanguíneo ABO, se explica por la presencia o ausencia del sustrato precursor y de las enzimas (glicosiltransferasas) que catalizan las correspondientes vías sintéticas. Todas las células de los individuos con fenotipo «p» carecen de dichos antígenos en su superficie. Estos individuos forman anticuerpos «naturales» y «regulares» contra las estructuras faltantes (anti-PP1P^k otrora anti-Tja), que aglutinan y/o hemolizan los Glóbulos rojos de todos los individuos excepto aquellos con el mismo fenotipo. Dado lo excepcional de este cuadro (1 individuo por millón) y su asociación con reacciones transfusionales hemolíticas graves y aborto espontáneo a repetición, estos individuos deben ser identificados y caracterizados. El objetivo de este trabajo fue examinar el gen A4GALT que codifica para la glicosiltransferasa (P^k sintetasa) recientemente asociada al fenotipo p, en un individuo portador de dicho rasgo nacido en la República Argentina. Para ello, se amplificaron dos segmentos superpuestos del gen y se utilizó un kit (Big Dye Terminator, Applied Biosystems) y un analizador genético (ABI Prism 310) para secuenciación directa del DNA. Se reporta la mutación 752C>T del gen A4GALT en doble dosis como causal del fenotipo p en el caso índice. Se trata de una transversión que lleva a un cambio de una Prolina por una Leucina en el residuo 251 de la 1,4-alfagalactosiltransferasa. Esta mutación ya fue descrita en individuos con fenotipo p y oportunamente caracterizada mediante ensayos funcionales, demostrándose una pérdida completa de su actividad enzimática. La caracterización de las mutaciones causales del fenotipo de grupo sanguíneo p pueden ser útiles para la determinación del grupo sanguíneo cuando los ensayos serológicos fallan o no pueden ser realizados, por ejemplo, si se requiere la determinación del grupo sanguíneo fetal.

0183 (54) CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE RNAM DE ADAMTS 13 EN PLAQUETAS POR REAL TIME. M A Carrivale ¹, A C Kempfer ², Y Powazniak ², A Sanchez Luceiros ², V A Zapata ¹, M A Lazzari ²

¹FONCYT; ²CONICET <carrivale_marcela@yahoo.es>

Introducción: La ADAMTS13 es una proteasa que cliva al factor von Willebrand (VWF) plasmático. En púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) hereditaria la actividad de ADAMTS13 está ausente o disminuida, mientras que en pacientes con PTT adquirida se ha encontrado un autoanticuerpo. El transcripto de ADAMTS13 en hígado es de 4.7Kb, mientras que en placenta se ha encontrado uno de 2.3 Kb. Susuki en 2004 reveló la presencia de mRNA en plaquetas. La cuantificación absoluta del mRNA en plaquetas informa la cantidad de ADAMTS13 que podría traducirse en condiciones normales y patológicas. **Objetivo:** Desarrollar un método de cuantificación absoluta del mRNA de ADAMTS 13 en plaquetas y evaluar rango en normales. **Metodologías:** Extracción de RNA de plaquetas, células endoteliales y tejido se realizó con TRIzol. PCR Real Time utilizando SYBR Green. La curva estándar se obtuvo por diluciones seriadas del plásmido pCMV6-XL5 ADAMTS-13, software LightCycler. **Muestras:** 11 normales, 1 paciente con microangiopatía trombótica (TMA) (37% de ADAMTS13 plasmática, VN 46-184%, sin mutaciones en el exón 3, 6, 20, 27, 28); 1 HUVEC, 1 HMVEC-L. **Resultados:** Se evaluaron los CV% en experimentos interensayos e intraensayos, fueron menores del 4% para los Cp demostrando la fiabilidad en todas las diluciones estudiadas (ANOVA, p<0.05). La sensibilidad del método fue de 3 10³ copias. El rango de normales obtenido en la cuantificación del mRNA de ADAMTS13 fue 2840-58400 N^o copias, y 3-61.10⁵ ng. El paciente TMA: 5310 copias y 510⁵ ng. Para HUVEC y HMVEC-L: 30500 y 411000 copias, 318.10⁵ y 428.10⁵ ng, respectivamente. **Conclusión:** La actividad de ADAMTS13 en plasma del paciente estudiado se encuentra disminuida, lo que no se puede asociar a bajo nivel de transcriptos ya que este se encuentra dentro del rango normal. Por un método rápido y preciso logramos la cuantificación absoluta del mRNA de ADAMTS13 en

plaquetas lo que permitirá el estudio de la relación entre la cantidad de transcriptos y proteína.

0184 (370) MECANISMOS SUBYACENTES A LA DISFUNCIÓN PLAQUETARIA Y NIVELES DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (FT) MEGACARIOCÍTICOS (MK) GATA-1 Y NFE2 EN EL DESORDEN PLAQUETARIO FAMILIAR CON PREDISPOSICIÓN A LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (DPF/LMA) POR MUTACIÓN DEL RUNX1. A C Glembotsky ¹, L Korin ¹, R F Marta ¹, P R Lev ¹, J P Salim ¹, R Laguens ², P Cabeza-Meckert ³, P G Heller ¹, F C Molinas ¹

¹Hematología Investigación. UE IDIM CONICET. Instituto A. Lanari. Facultad de Medicina. UBA; ²Anatomía Patológica. Universidad Favaloro; ³SIC. Pcia. Buenos Aires. anaglem@gmail.com

El DPF causado por mutación del *RUNX1* constituye un modelo de estudio del efecto de este FT en el linaje MK. La fisiopatogenia de la disfunción plaquetaria presente en este desorden es poco clara, se describió alteración del pool de depósito y de la activación de la GPIIb/IIIa. Dado que el NFE2 cumple un rol en la activación de la GPIIb/IIIa, postulamos que *RUNX1* modularía la IIb/IIIa mediante la regulación de NFE2. El objetivo fue investigar los mecanismos subyacentes a la disfunción plaquetaria y evaluar los niveles de NFE2 y GATA-1 en 4 pacientes de una familia con DPF. Se halló alteración en la agregación plaquetaria, ausencia de liberación de ATP, disminución de gránulos densos (mepacrine), de la expresión de P-selectina en 2 de 3 pacientes y de la activación de GPIIb/IIIa (PAC1) en 2 de 4 pacientes por citometría de flujo, alteración en la polimerización de actina por microscopía de fluorescencia y disminución de gránulos á y densos por microscopía electrónica. Los niveles plaquetarios de ARNm resultaron aumentados para GATA1 en 4 pacientes, para NFE2 isoformas a y f en 3 de 4 y para *RUNX1* en 3 de 3 por PCR en tiempo real.

	PAC1*	Psel*	Mepacrine*GATA-1 [§]	NFE2a [§]	NFE2f [§]	RUNX1 [§]
P I	48	69	78	↑12,4	↑3,8	↑3,1
P II	82	24	67	↑8,8	↑3,7	↑3,9
P III	57	-	66	↑11,5	↑5,0	↑3,1
P IV	95	83	53	↑2,2	1,1	↓1,7

*%IFM del paciente relativo al normal(N), fijado en 100% \uparrow o \downarrow respecto al N=1(1,8^{ACT}). Tanto el pool de depósito como la alteración en la activación de la IIb/IIIa contribuyen a la disfunción plaquetaria en el DPF, aunque la participación relativa de ambos es variable en los distintos pacientes. La alteración en la IIb/IIIa no es atribuible a defecto en NFE2. Se halló alteración en la polimerización de actina no descrita en DPF, que indicaría un defecto en el mecanismo de *outside-in*. El aumento en los niveles de expresión de FT asociados a la mutación de *RUNX1* sugeriría que *RUNX1* modula la expresión de otros FT MK, así como la propia, en forma autoregulatoria.

0185 (375) EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CXCR4 EN PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS Y MEGACARIOCITOS DE PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL. J P Salim ¹, C Alvarez ², F C Molinas ¹, R F Marta ¹

¹IDIM A. Lanari-Hematología Investigación; ²IDIM A. Lanari- Patología <jpsaltuc@yahoo.com.ar>

En un estudio previo demostramos que las plaquetas de los pacientes con trombocitemia esencial (TE) presentan una disminución de la expresión proteica y de ARNm del receptor de SDF-1, CXCR4. Este receptor está implicado en la movilización y *homing* de los progenitores hematopoyéticos. Su disminución en los precursores CD34+ de pacientes con mielofibrosis primaria ha sido señalado como la causa del aumento de estas células en sangre periférica en esta patología. En el presente trabajo nos propusimos estudiar la expresión del CXCR4 en los

megacariocitos (MK) y en los progenitores CD34+ de un grupo de pacientes con TE. Para el estudio de los MK realizamos una técnica inmunohistoquímica en cortes de médula ósea de 8 pacientes con diagnóstico de TE, utilizando un anticuerpo dirigido contra el receptor CXCR4 (Abcam) y posterior contracoloración con hematoxilina. Una vez realizada la tinción se tomaron fotografías de la mayor cantidad posible de MK en cada muestra (entre 20 y 60 MK) y se analizó la intensidad de la coloración del citoplasma utilizando un software para análisis citológico. La evaluación del CXCR4 en progenitores CD34+ circulantes se realizó por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CXCR4 (BD). Mediante un análisis apareado (Wilcoxon signed rank sum test) con su correspondiente control normal, se observó que los MK de los pacientes (n=7) tenían una disminución de la expresión del CXCR4, OD 0,42 (0,33-0,51), controles OD 0,52 (0,39-0,57), p=0,015. En cambio, los progenitores CD34+ de los pacientes mostraron una expresión de CXCR4 similar a la de los controles estudiados, RFI 20,7 (13,6-43,2) y 20,4 (9,7-47,1), respectivamente (n=10, p=0,92). Estos Resultados indicarían que la alteración encontrada previamente en las plaquetas de TE podría originarse en los MK, y que, a su vez, sería adquirida durante la diferenciación de este linaje, ya que los precursores hematopoyéticos CD34+ no la presentan.

0186 (388) ESTUDIO MOLECULAR DE MUTACIONES EN EL RECEPTOR DE TROMBOPOYETINA C-MPL EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS (SMP). L Korin¹, P R Lev¹, A C Glembofsky¹, P G Heller¹, F C Molinas¹

¹Hematología Invest. UE IDIM CONICET. Inst Lanari. Fac de Medicina UBA <laurakorin6@yahoo.com.ar>

El descubrimiento de la mutación JAK2V617F significó un importante avance en el conocimiento de la patogenia de los SMP. A diferencia de la Policitemia Vera, en la cual >95% de pacientes son positivos, solo 50% de Trombocitemia Esencial (TE) y Mielofibrosis Primaria (MP) la presenta. Recientemente, la identificación de mutaciones en el receptor c-MPL ha comenzado a esclarecer la patogenia molecular de los pacientes JAK2V617F-negativos. Estas mutaciones comprenden la sustitución de un aminoácido en el codón 515, existiendo 2 variantes, W515L y W515K. Se localizan en el dominio yuxtamembrana, induciendo la activación constitutiva del receptor y de la vía JAK-STAT. Su frecuencia oscila entre 1-4% en TE y 5-10% en MP, aunque existen pocos estudios al respecto. Nos propusimos evaluar la frecuencia de mutaciones en el c-MPL en pacientes con SMP, en quienes simultáneamente se estudió JAK2V617F, 80 con TE y 10 con MP, edad 43 (9-81) años. Se efectuó extracción de ADN de leucocitos de sangre periférica por técnica estándar. La detección de las mutaciones MPLW515K, MPLW515L y JAK2V617F se realizó mediante PCR alelo específica, utilizando primers específicos para cada mutación. No se detectó la mutación MPLW515K en ninguno de los 90 pacientes evaluados, habiéndose amplificado, como control positivo, ADN de un paciente portador de esta mutación, provisto por otro centro. Asimismo, se constató en esta muestra la ausencia de amplificación del MPLW515K con el primer complementario a MPLW515L, comprobando la especificidad de la técnica. Por otra parte, no se halló la mutación MPLW515L en 29 pacientes estudiados hasta el momento. Respecto al JAK2V617F, 36 de 80 (45%) pacientes con TE y 2 de 10 con MP fueron positivos. La ausencia de detección de mutaciones en el c-MPL en esta población refleja la baja frecuencia de las mismas y evidencia la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevas alteraciones moleculares, fundamental para el desarrollo de agentes terapéuticos.

0187 (484) PAPEL DE LA GALECTINA-8 COMO MODULADOR DE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA. M A Romaniuk¹, M V Tribulatti², V Cattaneo², J Etulain¹, O Campetella², M Schattner¹

¹Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos aires, Argentina.; ²Instituto de

Investigaciones Biotecnológicas, IIB-INTECH, CONICET-UNSAM, San Martín, Buenos Aires, Argentina <albertinar@gmail.com>

La galectina-8 (Gal-8), miembro del grupo tandem-repeat de la familia de galectinas, es una proteína de 35 kDa formada por dos dominios homólogos de reconocimiento a carbohidratos unidos por un péptido. Se expresa en una amplia variedad de tejidos y tumores y parecería estar involucrada en interacciones celulares que involucran a las integrinas como moléculas de adhesión. Mediante MALDI-MS determinamos que Gal-8 se une a la integrina alfa IIb. Considerando que ésta forma parte del complejo glicoproteico IIbIIIa, la molécula más relevante en la función plaquetaria, y que previamente demostramos la capacidad de Gal-1 de promover la activación de plaquetas, se evaluó el efecto de Gal-8 en la fisiología plaquetaria. Los Resultados obtenidos demuestran que la Gal-8 recombinante es capaz de inducir agregación plaquetaria *per se* tanto en plaquetas lavadas como en plasma (EC 50= 575± 52 nM, 3450±220 nM, n=3) y de potenciar la respuesta inducida por otros agonistas plaquetarios. Lectinas vegetales como Jacalina o PNA (peanut agglutinin lectin) en concentraciones 100 veces mayores que Gal-8 no fueron capaces de gatillar agregación plaquetaria. La respuesta de agregación por Gal-8 fue inhibida por la preincubación de las plaquetas con lactosa (30mM) y Tiodigalactósido (30mM), pero no por sacarosa (30mM) indicando la especificidad de unión de la Gal-8 a glicanos de superficie. La ausencia de activación por Gal-8 en plaquetas preincubadas con EDTA (2mM) o aspirina (0.5 mM) revelan que la respuesta observada no es un fenómeno de aglutinación y que no involucra la generación de TXA₂. Estudios de citometría de flujo demostraron que Gal-8 aumenta los niveles de calcio intracelular, induce la expresión de neoepítopes en el complejo glicoproteico IIbIIIa, promueve la unión de fibrinógeno y gatilla la expresión de P-selectina. Estos datos revelan a las galectinas como importantes reguladores de la funcionalidad plaquetaria

0188 (614) EXPRESIÓN DE FERROPORTINA EN INFLAMACIÓN AGUDA. M C D'Anna¹, M E Roque¹

¹Laboratorio de Fisiología Humana Universidad Nacional del Sur <cdanna@uns.edu.ar>

La inflamación induce secuestro de Fe por macrófagos del Sistema reticuloendotelial (SRE), cambio que estaría relacionado con Ferroportina (MTP1), proteína que exporta Fe desde enterocitos y macrófagos. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto agudo de la inflamación sobre la expresión de MTP1 y su relación con los niveles plasmáticos de Fe. Ratonas hembra CF1 (30 ± 5g) se agruparon en: Grupo Sano (n=4): única dosis subcutánea (s.c.) de Solución Fisiológica (SF); Grupo con Inflamación Aguda (n=16): única dosis s.c. de Aceite de Turpentina (150 µl). Se extrajo sangre retroorbital para ferremia a las 3, 16, 24 y 48 hs. Bazo, hígado e intestino fueron removidos y fijados en Formol Buffer 10%. Secciones de 5 µm fueron procesadas para inmunohistoquímica utilizando un Anticuerpo policlonal anti-MTP1 de ratón y el kit EnVision+System-HRP (DAB). Entre las 16 y 24 horas de inducción de la inflamación se observó hipoferrremia significativa (116 ± 10 mg /dl) respecto a lo observado en ratones sanos (285 ± 35 mg/dl), retornando a valores basales a las 48 hs. La distribución subcelular de MTP1 en enterocitos duodenales no varió significativamente durante la inflamación. A las 16 horas, MTP1 se localizó principalmente en la membrana basolateral de enterocitos duodenales, respecto de lo observado en condiciones basales. En tejido esplénico se observó una disminución de MTP1 respecto a lo observado en ratones sanos, donde la localización fue en macrófagos de la pulpa roja, colocalizándose con hemosiderina. En células de Kupffer de ratones sanos se observó expresión citosólica de MTP1, mientras que en inflamación su expresión disminuyó. Los cambios en el Fe funcional durante la inflamación aguda estarían relacionados con la disminución en la expresión de MTP1 en tejidos involucrados en la exportación de Fe. Concluimos que MTP1 sería regulada negativamente por Hcpidina, proteína que aumenta en la inflamación, causando la retención local de Fe por macrófagos del SRE.

HEMATOLOGIA P1

0189 (238) EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS HORMONAS ACTH Y CORTICOSTERONA SOBRE EL FACTOR VON WILLEBRAND (VWF) EN MODELO MURINO. V A Zapata ¹,A C Kempfer ², J Paiva-Palomino ¹, O G Astudillo ¹, H Costa ², M A Lazzari ^{1,2}, A Sánchez-Luceros ^{1,2}¹Academia Nacional de Medicina; ²CONICET <viazad@yahoo.es>

Introducción: Durante el embarazo humano ocurre un aumento progresivo del VWF plasmático. Aunque se ha sugerido un control hormonal del VWF, tratamiento con estrógenos en ratones BALB/c no mostraron cambios del VWF. ACTH estimula la secreción de cortisol en la corteza suprarrenal, siendo hormonas importantes en el embarazo y respuestas de stress. Estas relaciones nos llevaron a evaluar el efecto sobre el VWF del tratamiento con ACTH, Corticosterona (CTC) y Mifepristona (RU) (inhibidor de ACTH y CTC) en modelo murino. Metodologías: Se estudiaron hembras BALB/c, vírgenes, 8 semanas, sometidas a: a- ACTH 2.8 µg/d ip; b- CTC 2mg/k ip; c-a+RU 2mg/k ip; d- b+RU 2mg/k ip; e- LPS 30ug ip; f- vehículo. A las 8hs se recolectó el plasma. Se determinaron VWF:Ag (ELISA), y mRNA (real time PCR) en pulmón y aorta. Resultados: VWF:Ag (U/dL): a- 96±7.1; b- CTC 103±12.8; c- 105±7.0; d- 97±12.4; e- 184±16.9; f- 96±16.6. VWF:mRNA (crossing point, CP): a- 20,11±0.6; b- 19,54±1.53; c- 20,38±0.25; d- 18,58±1.7; e- 19,02±0.6; f- 19±0.5. Existen diferencias significativas (p<0.05) en VWF:Ag entre los tratamientos y el vehículo vs. LPS, aunque las determinaciones de VWF:mRNA no mostraron diferencias entre los grupos. Conclusión: Aunque se ha publicado que podría existir una relación directa entre cortisol y factores hemostáticos como el VWF, no podemos confirmar esos hallazgos en BALB/c. El VWF plasmático y el VWF:mRNA no fueron afectados por los tratamientos. El resultado con LPS sugiere liberación del VWF mediada por reacción inflamatoria, no existiendo modificación a nivel molecular.

0190 (545) CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS PLAQUETARIAS PRODUCIDAS POR LA LÍNEA CELULAR MEGACARIOBLÁSTICA DAMI. P R Lev ¹, A C Glembotsky ¹,N P Goette ¹, P G Heller ¹, R G Pozner ², P Cabeza Mekert ³, R Laguens ⁴, R F Marta ¹, F C Molinas ¹¹Hematología Investigación, Inst de Invest. Med. A. Lanari UE-IDIM CONICET, UBA; ²Trombosis I, Instituto de Hematología, Academia Nacional de Medicina.; ³Sic Provincia de Buenos Aires; ⁴Universidad Favaloro <paolal2002@yahoo.com.ar>

El estudio de los mecanismos que regulan la producción plaquetaria es un área de investigación creciente. Una dificultad al abordar este tipo de estudios es la elección del modelo para la producción de plaquetas *in vitro*. En el presente trabajo se estudió la capacidad de la línea celular megacarioblástica DAMI de producir plaquetas por estímulo con PMA entre 5 y 50 nM. La tinción con Hoesch el día 10 de cultivo mostró núcleos poliploides. Por citometría de flujo se observó poliploidización máxima inducida por PMA 25 nM entre el día 7 y 10, que consistió en 43% de células 2N, 38% 4N, 16% 8N, 4% 16N y 1% 32N. Se evaluó la producción de partículas con características de plaquetas a lo largo del tiempo por citometría de flujo, mediante parámetros de tamaño y granulación y positividad para CD61. Se observó un número creciente de partículas plaquetarias a lo largo del tiempo con producción máxima el día 10 (PMA 25-50 nM). La tinción con faloidina-FITC, que identifica actina polimerizada, reveló que una población de partículas posee una estructura semejante a las plaquetas activadas de sangre periférica. Utilizando anticuerpos dirigidos contra glicoproteínas (GP) específicas de plaquetas se observó presencia de GP1b (CD41a) y b3 (CD61) y ausencia de GP Ib (CD42b) e IX (CD42a). Los estudios de activación mediante marcación con CD62P por citometría de flujo, mostraron expresi-

ón de P-selectina en la membrana de las partículas plaquetarias, (RFI CD62P/isotipo=2.51) (n=3). No se observó la presencia de gránulos intraplaquetarios por marcación con mepacrine (citometría de flujo) ni por microscopía electrónica. Las partículas producidas por la línea celular DAMI presentan características similares a las de sangre periférica (expresión de GP1b-b3 y polimerización de actina). La falta de expresión de GP Ib-IX podría deberse al clivaje *in vitro* por metaloproteasas. La externalización de P-selectina y la ausencia de gránulos podría sugerir una activación basal.

0191 (559) ROL DEL EJE DE QUIMOQUINA SDF-1/CXCR4 EN LA PATOGENIA DE LAS TROMBOCITOPENIAS HEREDITARIAS (TH). J P Salim ¹, R F Marta ¹, P R Lev ¹, A Glembotsky ¹, C Alvarez ², P G Heller ¹, F C Molinas ¹¹IDIM A.Lanari-Hematología Investigación; ²IDIM A.Lanari-Patología <jpsaltuc@yahoo.com.ar>

Las TH son un grupo de entidades de variada etiología y características clínicas. Alteraciones en la migración del megacariocito (MK) contribuirían a la alteración en la producción plaquetaria en estas entidades. La participación del SDF-1/CXCR4 en la migración del MK y la producción de plaquetas es un tópico de creciente interés y alteraciones de este eje en desórdenes del linaje MK resulta una herramienta valiosa para su estudio. Nos propusimos evaluar la expresión del receptor CXCR4 en pacientes con TH: flia1, desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia (DPF); flia2, Wiskott-Aldrich (WA); flia3, trombocitopenia de origen desconocido (F3) y 3 flias con desorden MYH9. En la tabla se muestran los niveles de CXCR4 en membrana plaquetaria (por citometría de flujo) expresados como cociente entre la intensidad de fluorescencia para CXCR4 del paciente sobre el control.

	DPF	DPF	DPF	DPF	WA	WA	F3	F3	MYH9	MYH9	MYH9	MYH9
RFI	0,81	0,84	1	0,6	1,18	1,08	0,54	0,72	2,42	2,15	2,18	0,9

Se observó disminución del CXCR4 en 1 individuo con DPF y en los dos de F3, mientras que fue normal en WAS y aumentado en 3 de 4 pac con MYH9, esto último en relación al aumento del tamaño plaquetario. La evaluación del ARNm para CXCR4 (real-time PCR) mostró que tanto en DPF como F3, es normal o aumentado, revelando una discrepancia entre la expresión proteica y la del mensajero, ΔCt DPF: 2.7-4.4; F3: 5.1-7.8, vs controles 7.3-8.4. La causa subyacente a la disminución del CXCR4 no es clara, postulándose un defecto post-transcripcional. Dos pacientes con DPF que tuvieron expresión del CXCR4 en membrana plaquetaria normal y disminuida, respectivamente, no mostraron esta disminución en MK de médula ósea (por inmunohistoquímica), lo que sugiere que, en este caso, la disminución del receptor en las plaquetas sería una alteración periférica. En conclusión, el nivel de expresión del CXCR4 podría ser una característica diferencial dentro de las TH relacionado al defecto causal en cada una de estas entidades.

0192 (600) MODULACIÓN DE PROHEPCIDINA Y DMT1 RENAL EN SOBRECARGA DE HIERRO. T V Veuthey ¹, M E Roque ¹¹Laboratorio de Fisiología Humana Universidad Nacional del Sur <tveuthey@uns.edu.ar>

En estudios previos demostramos interrelaciones funcionales y regulatorias entre Prohepcidina renal y el transportador de Fe DMT1 en Anemia hemolítica. El objetivo fue estudiar la expresión renal de DMT1 y Prohepcidina en sobrecarga de Fe y la relación con el Fe tisular. Ratones hembras CF1 (30 ± 5) se agruparon en: a) Grupo Sano (n=6): dosis de Solución Fisiológica intraperitoneal (i.p.) (días:0,10); b) Grupo con Sobrecarga de Fe (n=6): 1 g Fe-Dextrán/Kg peso i.p (días:0,10). Perfusión hepática y determinación de Fe tisular por colorimetría previa digestión ácida. Remoción del riñón y fijación en Formol 10%. Secciones

de 5 μ m fueron procesadas para inmunohistoquímica con un Anticuerpo policlonal de conejo anti-DMT1 de ratón, Anticuerpo de conejo anti-Prohepcidina de ratón (Alpha Diagnostic) y el kit EnVision+System-HRP (DAB). El Fe de depósito se valoró por Tinción de Perls. El máximo nivel de sobrecarga fue el día 20 con elevados niveles hepáticos de Fe. En riñón de ratones sanos se observó localización intracelular marcada de DMT1 en túbulos proximales y en médula interna, mientras que en sobrecarga disminuyó. La expresión de Prohepcidina, distribuida en la membrana basolateral celular del segmento proximal S2, fue marcada en ratones sanos mientras que en sobrecarga de Fe se observó una disminución. En médula interna no hubo diferencias entre ratones sanos y con sobrecarga. Los cambios descriptos en sobrecarga, se asociaron con abundantes depósitos de Fe en tejido conectivo renal. Nuestros Resultados muestran que en sobrecarga disminuye la Prohepcidina renal, a diferencia de lo que ocurre con prohepcidina hepática. Se puede concluir que la disminución de DMT1 en sobrecarga, sería regulada en forma dual por hepcidina hepática y por el exceso de Fe, explicando de esta forma, su baja captación tubular.

0193 (157) ESTUDIO DE LA VISCOSIDAD PLASMÁTICA Y SÉRICA Y DE LA AGREGACIÓN ERITROCITARIA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. M I Spengler¹, M J Svetaz², B Leroux³, F Van Isseldyk¹, D Petrelli¹, P Carrara¹, A C Caminer¹, M B Corte².

¹ Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, ²Sección Inmunidad Celular, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, ³Médica Dermatóloga. Universidad Nacional de Rosario.

El objetivo del presente trabajo fue comparar las viscosidades plasmática (h_p) y sérica (h_s) y la agregación eritrocitaria de un grupo de 26 pacientes mujeres (39 \pm 9 años) con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) con los de 20 dadoras sanas de similar edad. Todas las mujeres firmaron el consentimiento por escrito. Además se analizaron los cambios en las concentraciones de fibrinógeno plasmático (F) e inmunoglobulinas séricas (Igs). La agregación eritrocitaria se estimó midiendo la variación en el tiempo de la luz transmitida a través de una muestra de sangre entera, determinándose dos parámetros: s_0/n_0 que estima el tamaño promedio de los agregados, y $2k_2n_0$ que estima la velocidad inicial del proceso. Las mediciones de viscosidad se realizaron con viscosímetro rotacional Wells-Brookfield LVT-CP a velocidad de corte de 230 s^{-1} . El F se midió por método gravimétrico y las Igs por inmunodifusión radial. Para el análisis estadístico se utilizó la t de Student y el coeficiente de correlación de Pearson. Los Resultados mostraron que las mujeres con LES presentaban valores significativamente mayores con respecto a las mujeres controles de: s_0/n_0 (1,89 \pm 0.06 vs 1.80 \pm 0.07, $p < 0.002$), $2k_2n_0$ (1.14 \pm 0.75 vs 0.75 \pm 0.61, $p < 0.05$), F en mg/dl (340 \pm 87 vs 280 \pm 47, $p < 0.002$), Igs en mg/dl (1763,94 \pm 51 vs 1411,77 \pm 219,46, $p < 0.05$), viscosidad plasmática (1.74 \pm 0.20 vs 1.48 \pm 0.04, $p < 0.001$) y viscosidad sérica (1.59 \pm 0.16 vs 1.33 \pm 0.09, $p < 0.001$). Se encontraron correlaciones positivas entre h_p y F ($r = 0.42$, $p < 0.05$), entre h_s y Igs ($r = 0.60$, $p < 0.05$), entre h_s y h_p ($r = 0.92$, $p < 0.0001$), entre F y $2k_2n_0$ ($r = 0.60$; $p < 0,01$) y entre F y s_0/n_0 ($r = 0,52$; $p < 0,02$). En base a estos Resultados concluimos que el incremento en la viscosidad plasmática se podría deber a los aumentos en la concentración de F y en la concentración de Igs. Además el fibrinógeno plasmático podría ser uno de los posibles responsables del aumento en el tamaño de los agregados y en la velocidad de la agregación eritrocitaria en estos pacientes.

0194 (225) MEDICIÓN DE LA RELACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES APOPTÓTICOS BAX/BCL-XL EN PACIENTES CON LMC. M Gonzalez¹, P Gargallo¹, M Bianchini¹, R Bengio¹, C De Brasi¹, I Larripa¹

¹Academia Nacional de Medicina <marianag6@yahoo.com.ar>

La Leucemia Mielóide Crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo crónico caracterizado por la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph⁺) el cual se asocia a la formación de un oncogén *BCR-ABL*. La expansión mielóide observada en la LMC podría deberse a una inhibición de la apoptosis celular más que a un exceso de proliferación. En este trabajo se estudio el nivel de expresión de genes proapoptóticos (*BAX*) y antiapoptóticos (*BCL-XL*) implicados en la vía mitocondrial del programa apoptótico, y la relación entre ellos (*BAX/BCL-XL*), a fin de determinar el nivel de apoptosis en las diferentes etapas de la LMC. Se estudiaron 60 pacientes: 12 al diagnóstico, 32 tratados con inhibidores de tirosina quinasa en fase crónica (FC), 9 en fase acelerada (FA), 7 en crisis blástica (CB) y 10 individuos control (dadores normales). El análisis de la expresión de los genes *BAX* y *BCL-XL* se realizó mediante PCR en tiempo real (QRT-PCR), utilizando oligonucleótidos *primers* diseñados para este fin. Se observó que pacientes al diagnóstico presentaron una relación *BAX/BCL-XL* significativamente más baja (1.26 \pm 0.1742) que la del grupo control (4.824 \pm 0.4935) ($p < 0.0003$) a expensas del aumento en la expresión del gen *BCL-XL*. En el grupo de pacientes en FC, se observaron valores significativamente mayores (13.81 \pm 1.85) ($p < 0.0044$) respecto de los dadores normales, lo cual podría explicarse teniendo en cuenta que los inhibidores de tirosina quinasa son potentes inductores de apoptosis. Pacientes en fase acelerada (0.9722 \pm 0.2751) y blástica (1.387 \pm 0.3487) muestran relaciones *BAX/BCL-XL* disminuidas respecto del grupo control, ($p < 0.0001$ y $p < 0.0006$, respectivamente) sugiriendo un desbalance entre estos genes con el consecuente bloqueo de la apoptosis. Nuestros datos muestran una disminución significativa en la relación *BAX/BCL-XL* al debut de la enfermedad y a medida que la patología progresa hacia un estado más avanzado, indicando que este estudio posee utilidad como factor pronóstico en LMC.

0195 (269) DATOS PRELIMINARES SOBRE EL ESPECTRO DE LAS MUTACIONES Y/O POLIMORFISMOS EN PACIENTES CON ACTIVIDAD DE ADAMTS13 DISMINUIDA. J C Calderazzo¹, A C Kempfer¹, L Keller¹, A Sánchez Luceros¹, A I Woods¹, Y Powazniak¹, M A Lazzari¹

¹Academia Nacional de Medicina <kempfer@hematologia.anm.edu.ar>

La púrpura trombocitopénica trombótica es una enfermedad caracterizada por trombosis microvascular, asociada con la deficiencia de ADAMTS13. Esta deficiencia puede ser constitutiva por la presencia de una mutación homocigota o una doble mutación heterocigota. Las mutaciones han sido detectadas a lo largo de todo el gen, en regiones que codifican para diferentes dominios. En 16 pacientes (P) sin anti-ADAMTS13 y con niveles disminuidos de ADAMTS13 (31 \pm 8%, normales (N): 46-184%), investigamos la existencia de mutaciones, a lo largo de todo el gen. La actividad de ADAMTS13 se detectó por el método de Kempfer et al (Blood Coagul Fibrinolysis. 2003). Se analizaron los exones por secuenciación automática: 3 (P:14), 5 (P:6), 6 (P:6), 9 (P:4), 12 (P:4), 15 (P:7), 17-18 (P:8), 20 (P:9), 21 (P:6), 24 (P:7), 25 (P:5), 26 (P:3), 27 (P:9), 28 (P:10), y 29 (P:6). Se detectaron: en el intrón 2, un P homocigota para los polimorfismos G173-18T, G173-48A, G173-67C (padre homocigota y madre heterocigota, ADAMTS13:N); exón 6, un P homocigota para la mutación C577T; exón 24, un P homocigota para la mutación T3178T (padre heterocigota, ADAMTS13:N); exón 29, un P homocigota para la mutación A4085T. La existencia de actividad de ADAMTS13 en presencia de una mutación heterocigota concuerda con los Resultados obtenidos por diferentes autores, donde señalan que se requieren mutaciones doble- heterocigotas para la disminución de la actividad de la enzima. Estudios experimentales sugieren que varios dominios estructurales de ADAMTS13 están involucrados tanto en su biogénesis como en el proceso de reconocimiento del sustrato. Algunos autores han encontrado que existen defectos en la secreción de ADAMTS13 sin el primer dominio CUB y otros han detectado actividad proteolítica en ADAMTS13 sin los dominios TSP-1 y los dos dominios CUB. Nuestros Resultados prelimina-

res agrupan mutaciones en exones cercanos al N (3-6) y C-terminal (24-29), no encontrando diferencias en los niveles de ADAMTS13 de los mismos.

0196 (538) ESTUDIO DE ISOFORMAS DE ADAMTS13 EN PLAQUETAS Y HUVEC. M A Carrivale¹, V A Zapata¹, L Keller², A Sanchez Luceros³, A C Kempfer³, M A Lazzari³

¹FONCyT; ²Academia Nacional de Medicina; ³CONICET <carrivale_marcela@yahoo.es>

Se han descrito tres isoformas (ISO) de ADAMTS 13 en biblioteca de cDNA de pulmón ó hígado. La ISO 1 corresponde al gen completo y las ISO 2 y 3 presentan dos deleciones: 1) 3847-4014pb, que corresponde a 55 aa entre el octavo dominio trombospondina-1 y el primer dominio CUB, que comparten la ISO 2 y 3 2) 1272-1365pb que implica 14aa del extremo C-terminal del dominio metaloproteasa y 16aa en el extremo N-terminal del dominio desintegrina en la ISO 3. Se ha descrito que el mRNA de ADAMTS13 se encuentra en plaquetas y HUVEC. **Objetivo:** Identificar las ISO 2 y 3 de ADAMTS13 descritas en plaquetas y relacionarlas con patologías microangiopáticas. Metodologías: Extracción de RNA de plaquetas (1.5×10^9) y HUVEC (6×10^6) se realizó con Trizol. PCR Real Time utilizando SYBR Green. La caracterización de los productos se realizó por una electroforesis de agarosa 1,5%. Hemos diseñado dos estrategias para la preparación de los primers: 1- el primer sentido se apareó con secuencias comunes a las tres ISO y el primer antisentido en las secuencias originadas por las deleciones. 2- Los primers flanquean a las deleciones, con productos de distinta longitud para cada ISO. En ambas se probaron distintas condiciones de reacción, y se utilizó como templado, RNA plaquetario y de HUVEC. Resultados: Se obtuvieron en el orden de 10 µg de RNA total de plaquetas y 80 µg de HUVEC. No se han detectado productos utilizando la estrategia 1. Con la 2, se detectó un patrón de productos para la ISO 1 en HUVEC. **Conclusión:** La estrategia 1 no dio resultado posiblemente por que las deleciones involucran la región rica en GC. Que la estrategia 2 solo resultara para HUVEC con la ISO 1 indicaría que las ISO 2 y 3 no existen en plaquetas ni HUVEC ó que el límite de detección de los Metodologías utilizados no sea suficientemente bajo, aunque de los Metodologías alternativos, electroforesis radiactiva y Real Time con sondas, solo el último sería una opción a tener en cuenta.

0197 (615) FUNCIÓN DE LA ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN CÉLULAS ERITROIDES Y NEURONALES. M E Chamorro¹, S Wenker¹, M Callero¹, A Nesse¹

¹Departamento de Química Biológica Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA-CONICET <mauge_chamorro@hotmail.com>

La eritropoyetina recombinante humana (rhuEpo) tiene reconocida eficacia para el tratamiento de anemia. La aplicación de su acción antiapoptótica en otros tejidos se ve dificultada por un innecesario efecto eritropoyético. Han sido reportados ensayos experimentales con un derivado carbamylado (cEpo), el cual tendría actividad antiapoptótica en tejido nervioso pero incapacidad para inducir el desarrollo de colonias hematopoyéticas. Para avanzar en la investigación de este efecto diferencial se estudió la acción de cEpo sobre dos líneas celulares, una con capacidad de diferenciación eritroide (UT-7) y la otra de origen neuronal (SH-SY5Y). Para la obtención de cEpo se desarrolló una metodología estandarizada empleando albúmina (dependencia de dosis, tiempo de incubación y control de la carbamylación). El reemplazo de Epo por cEpo en cultivos de células UT-7 produjo una significativa disminución de la viabilidad celular (ensayos de exclusión de azul Tripán y MTT) debido a apoptosis, analizada por microscopía de fluorescencia después de tinción con Hoechst (Cél. apoptóticas: Epo $7 \pm 3\%$; cEpo $34 \pm 6\%$; Sin Epo $39 \pm 6\%$, cEpo vs. Epo $P < 0,05$). Los ensayos con cEpo fueron comparables con los cultivos en ausencia del factor de crecimiento. La cEpo no afectó la actividad de Epo en cultivos desarrollados en presencia de Epo+cEpo. La adición de cEpo en cultivos de células SH-SY5Y

tuvo un comportamiento semejante al de Epo sobre la morfología (microscopía electrónica de barrido), crecimiento (MTT) y diferenciación celular (medición de neuritas). El pretratamiento con cEpo previno el daño celular inducido por staurosporina demostrando actividad antiapoptótica similar a la de Epo (Cél. apoptóticas: C $9 \pm 2\%$, STP $38 \pm 10\%$; Epo/STP $13 \pm 3\%$; cEpo/STP $17 \pm 6\%$, NS). Se puede concluir que el producto resultante de la carbamylación de Epo perdió su capacidad para sostener el crecimiento y supervivencia de las células eritroides UT-7 mientras mantuvo su acción neuroprotectora en la línea neuronal SH-SY5Y.

HEMATOLOGIA P2

0198 (259) REGULACIÓN DEL SISTEMA VWF/ADAMTS13 POR ESTRADIOL E HISTAMINA EN HUVEC. Y Powazniak¹, A C Kempfer¹, J C Calderazzo¹, J H Paiva¹, L Keller¹, M A Lazzari¹

¹CONICET, Academia Nacional de Medicina <yaninapowazniak@gmail.com>

El VWF y la ADAMTS13, se sintetizan y almacenan en las HUVEC. Se ha descrito que la modulación de los estrógenos sobre el sistema vascular se encuentra relacionada con la liberación de factores como la prostaciclina, el óxido nítrico, la endotelina, y la trombomodulina. Se han realizado estudios en poblaciones de mujeres normales, no embarazadas, embarazadas y post parto, donde los niveles de ADAMTS13 descienden y los de VWF y estradiol (E2) aumentan hacia fines del tercer trimestre de embarazo. Además, durante el embarazo existe una alta expresión de receptores para histamina (H), y un factor embrionario liberador de histamina que sugieren un rol fisiológico de H durante la gestación humana. **Objetivo:** analizar modificaciones producidas por E2 e H en la síntesis y producción de VWF y ADAMTS13. Metodología: Cultivo de HUVEC. Tratamientos: HUVEC incubadas con 1nM E2 (niveles fisiológicos del tercer trimestre de embarazo), 100µM H, y su combinación. Análisis de los niveles de mRNA por Real Time PCR utilizando el sistema de detección SYBR Green. Identificación y semicuantificación de ADAMTS13 intracelular y liberada por SDS-PAGE e inmunotransferencia. Cuantificación de VWF intracelular y liberado por ELISA. Análisis estadístico: ANOVA: $p=0.05$ significativo. Resultados: E2 produce un aumento significativo de 9 veces del mRNA de VWF y ADAMTS13, así como también un aumento de 8 veces de la ADAMTS13 intracelular, sin embargo no afecta el contenido intracelular de VWF ($p=0.061$). Cuando E2 es combinado con H no producen cambios en los niveles de los mensajeros (VWF: $p=0.97$, ADAMTS13: $p=0.53$), pero aumenta significativamente 3 veces la liberación de ADAMTS13 con respecto a la incubación con H. Discusión: En la incubación con E2, el VWF no aumenta en relación a la transcripción de su mRNA, lo que sugiere que la ADAMTS13 podría degradar al VWF en el retículo endoplasmático. Además, los niveles de E2 y H regularían la expresión de ambos genes.

0199 (317) RESULTADOS PRELIMINARES DEL ANÁLISIS DEL EXÓN 28 PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND (VWD). A I Woods¹, A C Kempfer¹, L Keller¹, J C Calderazzo¹, A Sanchez-Luceros¹, J Paiva-Palomino¹, C E Farias¹, M A Lazzari¹

¹Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires <aiwoods@hematologia.anm.edu.ar>

Introducción En el exón 28 se hallan 48% de todas las mutaciones asociadas a la VWD (78,8% de las mutaciones del tipo 2A, 100% del 2B, 96% del 2M, 32,5% del tipo 1, 16% del tipo 3). **Objetivos** Nuestro propósito es detectar mutaciones en el exón 28 de pacientes con VWD con VWFRCo <10% y VWF:RCo/VWF:Ag <0.6. Metodología Se reclutaron 16 pacientes. Se hizo PCR ani-

dada para amplificar un fragmento de 1145 pb evitando la amplificación del pseudogen. A partir de este producto de PCR (A-B), se amplifican 4 fragmentos consecutivos (1-2, 3-4, 5-6, 7-8) El resto del exón (cerca de 700 pb) se estudió amplificando 2 fragmentos (C-D, E-F). Diseñamos los primers para la PCR anidada y para los fragmentos. Los fragmentos se secuenciaron en ABI PRISM 310. Resultados Preliminares Hasta el momento, hemos encontrado las siguientes mutaciones y su equivalencia en la base de datos ISTH: Paciente 1: Patrón multimérico: ausencia de multímeros grandes.- Mutación: heterocigota 3916C>T (R1306W).- Diagnóstico fenotípico: VWD 2B.- ISTH SSC VWF database: VWD 2B.- Paciente 2: Patrón multimérico: normal.- Mutación: heterocigota 3943C>T (R1315C).- Diagnóstico fenotípico: VWD 2M.- ISTH SSC VWF database: VWD tipo 1, 3, 2A, 2M y no clasificable.- Paciente 3: Patrón multimérico: normal.- Mutación: heterocigota 3943C>T (R1315C).- Diagnóstico fenotípico: VWD 2M.- ISTH SSC VWF database: VWD tipo 1, 3, 2A, 2M y no clasificable.- Paciente 4 (hijo): Patrón multimérico: normal.- Mutación: doble heterocigota 4883T>C (I1628T) y en exón 17: heterocigota 2220G>A (M740I).- Diagnóstico fenotípico: VWD 2M.+ Vicenza.- ISTH SSC VWF database: VWD 2A.- Paciente 5 (padre): Patrón multimérico: normal.- Mutación: heterocigota 4883T>C (I1628T).- Diagnóstico fenotípico: VWD 2M.- ISTH SSC VWF database: VWD 2A.- Conclusión El conocimiento del patrón multimérico del VWF es indispensable aún contando con el estudio molecular como se observa en la discordancia con la ISTH database.

0200 (409) GALECTINA-1, UNA PROTEÍNA MENOR DE PLAQUETAS HUMANAS, SE AISLA COMO UN COMPLEJO ACTINA-LECTINA. M M González¹, L Yoshizaki², N E Fink¹

¹Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata; ²Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires <mmgs5@yahoo.com.ar>

En experiencias previas, se detectó galectina-1 humana (Gal-1h) en plaquetas humanas (PltH). En el presente trabajo, se purificó y caracterizó Gal-1h en Plt. Las PltH se procesaron a partir de bolsas de plasma rico en plaquetas (PRP) de Banco de Sangre. Previa leucorreducción, se obtuvo el pellet de Plt, se trató con NH₄Cl 1% para eliminar eritrocitos y luego se lavaron con buffer Tris-HCl, obteniéndose así Plt lavadas (PltL). Se obtuvo el extracto citosólico plaquetario (ECP), adicionado con inhibidores de proteasas, mediante dos **Metodologías:** lisis por congelamiento-descongelamiento y con un agente lisante. La purificación de Gal-1h, a partir del ECP (n=8), se realizó por cromatografía de intercambio iónico y de afinidad. Se caracterizó por análisis de HPLC-espectrometría de masa y se obtuvo una masa de 14,8 kDa, correspondiente a la Gal-1. Por SDS-PAGE y western blot se revelaron dos bandas de 14 y 68 kDa aproximadamente. Ambas bandas fueron identificadas como positivas con anti-Gal-1h y la banda de 68 kDa aprox., positiva también con anti-actina. Además, se procedió a realizar una digestión enzimática con tripsina y el análisis de los péptidos obtenidos por HPLC seguido de espectrometría de masa permitió detectar la presencia de Gal-1 y actina, en coincidencia con los Resultados de western blot. Así se ampliaron datos previos obtenidos en nuestro laboratorio y se demuestra que la Gal-1 es una proteína que está en menor proporción en PltH, en coincidencia con estudios de proteómica, hechos por otros autores, que no la incluyen dentro de las 50 proteínas más abundantes de PltH. Se demostró que la Gal-1 se purifica como un complejo con actina, similar a hallazgos descriptos para otras células (LT, células de músculo) y tejidos como cerebro humano, donde Gal-1 se une a la actina, probablemente formando parte de sistemas complejos que regulan la actividad de actina.

0201 (478) MODULACIÓN DE LA FOSFATASA PTP1B EN CÉLULAS CON EXPRESIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA. M A Callero¹, D Vota¹, A Nesse¹, D Vittori¹

¹Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA - CONICET <mcallero@qb.fcen.uba.ar>

En trabajos anteriores demostramos que, en la línea celular UT-7 dependiente de eritropoyetina (Epo), esta hormona modula positivamente la expresión de la proteína tirosina fosfatasa 1B, una de las fosfatasas implicadas en la finalización de la señalización activada por Epo. Para ampliar el conocimiento del mecanismo involucrado en tal regulación se estudió la modulación de esta fosfatasa en células TF-1, que responden a IL-3, GM-CSF y sólo sobreviven en presencia de Epo por cortos períodos debido a la expresión preponderante de un receptor (EpoR) truncado. Se encontró, a nivel de ARNm (técnica de PCR en tiempo real) una regulación de PTP1B similar a la observada en las células UT-7. Sin embargo, a nivel proteico (*Western blotting*) la Epo revierte el clivaje proteolítico que sufre la PTP1B luego de la privación celular *overnight* de factores de crecimiento y suero. Para investigar la regulación diferencial de la PTP1B observada en ambas líneas celulares, se determinó la presencia de las 6 isoformas del EpoR descriptas (RT-PCR). Se halló una expresión similar de 5 isoformas con excepción de una forma soluble. Esta isoforma del receptor, expresada sólo en las células TF-1 tendría la función de aumentar la sensibilidad al ligando de las células que no expresan el receptor completo. La distinta respuesta a la activación por Epo en células con diferente expresión de isoformas de EpoR podría explicar la modulación diferencial de la expresión de PTP1B, involucrada en el apagado de la vía de señalización del EpoR, lo que generaría una alteración en la sensibilidad celular al ligando. Dado que los progenitores eritroides de médula ósea expresan formas truncada y completa de EpoR, predominando la primera en progenitores tempranos y la segunda en los tardíos, se sugiere que las líneas celulares empleadas constituyen modelos apropiados para el estudio de mecanismos de eritrocitosis y de eritropoyesis inefectiva.

0202 (531) ALTERACION MOLECULAR DE LA ALBUMINA MEDIADA POR HOMOCISTEINA-TIOLACTONA. V Genoud¹, M M Castañón¹, B Jung¹, I L Quintana¹

¹Laboratorio de Hemostasia y Trombosis - Depto. Qca. Biológica - Fac. Cs. Exactas y Naturales - UBA <valgen@qb.fcen.uba.ar>

Los niveles elevados de homocisteína (Hcy) plasmática se asocian con episodios aterotrombóticos. Las especies químicas Hcy libre y homocisteína-tiolactona (HTL) son moléculas altamente reactivas, involucradas en procesos de homocisteinilación de proteínas: a) acilación de los grupos e-amino libres de la proteína por Hcy-HTL (N-homocisteinilación) y b) formación de enlaces disulfuro entre los residuos cisteína y la Hcy libre (S-homocisteinilación). Con el objetivo de evaluar probables efectos tóxicos de la Hcy-HTL se incubó albúmina humana con distintas concentraciones de Hcy-HTL (Relación Molar, RM= 1:0, 1:25, 1:50, 1:100), a 37°C a diferentes tiempos (0hs, 6hs, 12hs, 18hs, 24hs). Se caracterizaron las muestras por diversas técnicas electroforéticas: electroforesis en poliacrilamida (PAGE nativa), isoelectroenfoque (IEF), inmunoelectroforesis cruzada (IEC) y electroforesis capilar (EC). Las electroforesis se realizaron por triplicado y se muestran los Resultados (ÅRf=Rf muestra - Rf control) de 24hs de incubación, expresados como mediana (rango). En cada caso se indica la mínima relación molar que mostró efecto estadísticamente significativo. PAGE. Se observó aumento de la movilidad electroforética: ÅRf=0,081(0,074-0,087) para RM

1:25. *IEF*. Se observaron dos bandas con diferente *pI*, una correspondiente a albúmina (*pI*= 4,8) y otra con *pI* 4,7; para RM 1:100. *IEC*. Se observó corrimiento anódico: $\Delta Rf=0,115(0,09-0,142)$ para RM 1:25. *EC*. Se observó aumento del tiempo de migración: $\Delta \text{Tiempo}=0,15 \text{ min}(0,04-0,29)$ y ensanchamiento del pico: $\Delta \text{Ancho}=0,23 \text{ min}(0,22-0,25)$ para RM 1:100. Los cambios observados por las diferentes Metodologías reflejan un aumento de la carga neta negativa de la molécula de albúmina. Este efecto puede explicarse como resultado de reacciones de N-homocisteinilación. Considerando que este proceso afectaría a las proteínas del sistema hemostático, estos Resultados permiten continuar con nuestra investigación en el tema.

0203 (548) LA HOMOCISTEINA-TIOLACTONA AFECTA LA SECRECIÓN DE REGULADORES DE LA FIBRINOLISIS EN LA CELULA ENDOTELIAL. A I Rovetta¹, A M Lauricella¹, M J Ugarriza¹, I L Quintana¹

¹Laboratorio de Hemostasia y Trombosis - Depto. Qca. Biológica - Fac. Cs. Exactas y Naturales - UBA <ana_rovetta@hotmail.com>

Introducción: La hiperhomocisteinemia (HHcy) está asociada a los episodios trombóticos, sin embargo los mecanismos involucrados en esta relación aún no están completamente esclarecidos. Se postula que niveles elevados de homocisteína y su éster cíclico homocisteína-tiolactona (HTL) afectan la calidad del endotelio normal, alterando el balance coagulación-fibrinólisis. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la HTL sobre los niveles del activador tisular de plasminógeno (t-PA) y del inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1), asociados a la célula endotelial. **Materiales y Métodos:** Se cultivaron células endoteliales humanas obtenidas a partir de cordón umbilical (HUVEC) que fueron identificadas morfológicamente y por la expresión del factor von Willebrand (por microscopía de fluorescencia). Las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de HTL (100, 250 y 500 μM). Se evaluó la citotoxicidad de la HTL (método MTT). Se determinaron los niveles antigénicos de t-PA y PAI-1 en los sobrenadantes (PAI-1), asociados a la célula endotelial. Los ensayos se realizaron por triplicado. Todos los Resultados mostrados fueron estadísticamente significativos y se expresan como mediana y rango. **Resultados:** Se observó una disminución del 53 % (38-72 %) en los niveles de t-PA de los sobrenadantes respecto del control, independientemente de la concentración de HTL utilizada. Mientras que en los lisados celulares el descenso observado fue 62 % (61-65 %) para 100 y 250 μM HTL y 79 % (77-81 %) para 500 μM HTL. Por otro lado, no se observaron cambios significativos de la concentración de PAI-1 ni en los sobrenadantes del cultivo ni en los lisados celulares. La HTL no produjo efecto citotóxico en las concentraciones utilizadas. **Conclusiones:** La HTL inhibió la secreción del t-PA sin afectar los niveles de PAI-1, en cultivos de célula endotelial. Estos Resultados apoyan otro aspecto de la hipofibrinólisis descrita en HHcy, reforzando su asociación con la trombosis.

0204 (565) EFECTO DE LA MANGIFERINA SOBRE EL SISTEMA HEMOSTÁTICO. D N De Panis¹, A Arín¹, B Sasseti¹, A M Lauricella¹

¹Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires <amlauri@qb.fcen.uba.ar>

La Mangiferina (Mng) es una glucosil-xantonina utilizada en Centroamérica por su acción antioxidante y anti-inflamatoria. Nuestro objetivo fue determinar si la Mng tiene efecto sobre las pruebas globales de coagulación y la fibrina resultante. Se incubaron alícuotas de un pool de plasmas normales (PN) con concentraciones crecientes de Mng (concentraciones finales: 0, 10, 30, 50 y 100 μM) y se determinaron APTT, TP, TT y fibrinógeno por el método de Clauss. Se evaluó además la cinética de

fibrinoformación (midiendo la densidad óptica a 405 nm en función del tiempo) y la permeabilidad de geles de fibrina (por ensayos de perfusión) a partir de plasma recalcificado y con trombina-calcio (0,05 U/ml; 20 mM).

Ensayo	APTT (seg)	TP (seg)	TT (seg)	Fibrinógeno (seg)
Control	40 ± 5	13 ± 2	20 ± 2	13 ± 2
Mng 10 μM	46 ± 4	15 ± 2	25 ± 3	16 ± 2
Mng 30 μM	50 ± 5	-	-	18 ± 3
Mng 50 μM	57 ± 5	-	-	20 ± 3
Mng 100 μM	67 ± 5	17 ± 3	60 ± 4	60 ± 4

Los parámetros de la fibrinoformación (tiempo de inicio de la coagulación, velocidad de formación de la fibrina y densidad óptica máxima) no mostraron diferencias a ninguna de las concentraciones ensayadas. En estudios de permeabilidad con trombina-calcio la Mng produjo geles de fibrina menos permeables en forma dosis dependiente (Ks Mng 100 μM : (2,15E-08 ± 1,03E-09) cm^2 vs Ks Control: (3,03E-08 ± 8,79E-10) cm^2 , $p=0,00001$). Podemos concluir que altas concentraciones de Mng (100 μM) son capaces de producir efecto anticoagulante. Además modifica las características de los geles de fibrina resultantes.

INFECTOLOGIA P1

0205(44) EFECTO DE CURCUMINA SOBRE EL ESTRÉS EN DOS LÍNEAS CELULARES PERSISTENTEMENTE INFECTADAS CON EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1. D A RIVA¹, P N Fernández Larrosa², V Melito¹, C ESPADA², G Dolcini², L Martínez Peralta², S Mersich¹

¹Departamento de Química Biológica. FCEYN. UBA.; ²CNRS. Departamento de Microbiología. F. Medicina UBA. <diegoarielriva@hotmail.com>

Las células T de memoria, infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), realimentan la infección sistémica y son insensibles a los antivirales en uso. Por esto, la combinación de los mismos con nuevas drogas dirigidas a blancos celulares, es una futura estrategia. Curcumina (Cur), de múltiples efectos moleculares, afecta la liberación de virus, según el linaje de células analizadas. El objetivo del trabajo fue caracterizar el efecto de Cur, sobre el estrés oxidativo, en dos modelos de reservorio viral. Para ello, células de origen linfocítico (H9+) y monocítico (U1), ambas persistentemente infectadas con VIH-1, y sus controles no infectados (H9 y U937), fueron tratadas con Cur durante 24h o 48h, o bien con Cur + el antiviral Zidovudina (ZDV, de carácter oxidativo). Luego se evaluaron la viabilidad celular, por tinción con azul tripán; las especies reactivas del oxígeno, con la sonda DCFA; la despolarización de la membrana mitocondrial (DMM) con una sonda fluorescente y la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), por espectrofotometría. En condiciones de 80±5% de viabilidad, Cur 10 μM aumentó DCFA hasta 1,5±0,1 en todas las líneas celulares sólo a las 48h de tratamiento. En U1, ZDV aumentó DCFA en 1,4±0,1 veces con respecto a las células sin tratar, mientras que ZDV+Cur 1 μM disminuyó DCFA a 0,5 veces respecto del tratamiento con ZDV. El agregado de Cur 1 μM , en células H9+ y U1, disminuyó SOD hasta 0,3 veces a las 24h y aumentó hasta 1,4±0,1 veces a las 48h, con respecto a las células sin tratar, indicando una respuesta antioxidante. En las mitocondrias, a las 48h, Cur 10 μM produjo un aumento en DMM, en todas las líneas celulares, de hasta 1,7±0,1 veces. Estos datos sugieren que el efecto oxidativo de Cur depende de la concentración utilizada, ya que sólo en la menor concentración ensayada se observa una clara señalización antioxidante, mientras que a mayor concentración el efecto pro-oxidante excede la protección celular y genera estrés.

0206 (105) ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL: ANÁLISIS DEL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO EN MÚSCULO ESQUELÉTICO MEDIANTE QUIMIOLUMINISCENCIA EN TIEMPO REAL. V Vanasco¹, P Evelson¹, S Alvarez¹

¹Programa de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires <vvanasco@ffyb.uba.ar>

Aunque muchos estudios han reportado la ocurrencia de estrés oxidativo en diferentes modelos de endotoxemia, no se han realizado mediciones en tiempo real y en forma no invasiva para el órgano. El objetivo de este trabajo fue analizar la quimioluminiscencia *in situ* (QL) para evaluar la concentración en estado estacionario de especies activas del oxígeno. La QL es una emisión de luz de baja intensidad en el rango visible, debida principalmente al decaimiento de estados excitados del oxígeno molecular (oxígeno singulete y carbonilos excitados). Ratas hembras Sprague-Dowley (180g), fueron inyectadas ip con LPS (lipopolisacárido O26:B6, 10 mg/kg); luego de 6 hs se realizaron los diferentes análisis en músculo abductor e hígado (con fines comparativos). El análisis de la QL se relacionó con otros parámetros de estrés oxidativo (nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico-TBARS y contenido de carbonilos) y producción de NO. Se observó un aumento de la QL de 1.4 veces (con respecto al control: 38 ± 3 cps/cm²) en músculo esquelético mientras que la QL de hígado muestra valores controles (control: 14 ± 3 cps/cm²). El análisis espectral de la emisión demuestra que el oxígeno singulete es la principal especie emisora. Estos datos fueron corroborados utilizando aumentadores específicos de señal: DABCO (carbonilos excitados) y biacetilo (oxígeno singulete). El aumento observado en QL de músculo esquelético, en animales tratados, se relacionó con un aumento en los TBARS y producción de NO; el contenido de carbonilos no mostró diferencias significativas. Estas observaciones muestran que la QL de tejido, asociado a otros marcadores de daño oxidativo, permite un análisis mecánico válido del estrés oxidativo generado en la endotoxemia experimental.

0207 (315) VALIDACIÓN DE TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA DETECCIÓN DE VHC Y VIH EN DONANTES DE SANGRE. C C Fornes¹, M V Nicolovich¹, M Pivetta¹, C Landi¹, M A Raillon¹, S Chialina¹, E Solis¹, M S Vitali², A Hurvitz², G Rodríguez²

¹Servicio de Hematología y Medicina Transfusional. Hospital Italiano Garibaldi; ²Area de Desarrollo de Productos y Procesos. Laboratorio de Hemoderivados <fornesclaudia@hotmail.com>

Los laboratorios de los Servicios de Medicina Transfusional que utilicen técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) aplicadas en el screening de donantes de sangre deben validarlas antes de ser aplicadas a la rutina del laboratorio. El objetivo de este trabajo fue validar técnicas PCR/nested cualitativas "in house" para la detección de los genomas de VHC y VIH en donantes de sangre frente a estándares internacionales, Standard International 96/790 del National Institute for Biological Standards and Control reconocido por la OMS para VHC y el 97/656 para VIH como patrones internacionales para NAT. La extracción de ARN se realizó con Trizol LS (Invitrogen) a partir de 3 series de diluciones de 8 réplicas de cada uno de los estándares (n=72). En la retrotranscripción se utilizaron primers específicos para VHC y random primers para VIH y en la PCR/nested primers de las regiones 5'NC para VHC y *pol* para VIH. Los productos se revelaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los Resultados fueron analizados con el software Probit analysis programs. Para un 95% de positividad, el límite de detección fue de 98.5 UI/ml para VHC y 294.8 UI/ml para VIH. Las especificidades, evaluadas con 100 muestras negativas, fueron del 100% y los procedimientos presentaron robustez en presencia de diferentes lotes y de pequeñas modificaciones en las concentra-

ciones de los reactivos. Las sensibilidades obtenidas permiten la utilización de estas técnicas en pool de muestras tomando como referencia los requerimientos del Paul Ehrlich Institut de Alemania (5000UI/ml para VHC y 10000UI/ml para VIH por donación individual). La validación de nuevas tecnologías específicas y sensibles, teniendo en cuenta requerimientos regulatorios, nos permite demostrar que estas técnicas de PCR/nested "in house" son una herramienta útil, específica, sensible y aplicable a pools de plasma para complementar la seguridad de los productos obtenidos en Bancos de Sangre.

0208 (227) ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN LA INFECCIÓN POR VIH ASINTOMÁTICA. E C Pieri¹, C Caula¹, N Carle², M Orsilles¹

¹Cátedra de Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba; ²LAPRINC <ecpieri@yahoo.es>

Numerosos fenómenos autoinmunes pueden ser detectados en la infección VIH/SIDA, incluyendo la presencia de anticuerpos antinucleares (ANA). Nuestro objetivo fue identificar la especificidad de anticuerpos contra antígenos nucleares en individuos con infección por VIH asintomática (IA) que resultaran ANA (+) en el screening por inmunofluorescencia indirecta (IFI). El suero de 83 pacientes fue analizado por IFI (células HEP-2) y las muestras ANA (+) fueron evaluadas por inmunoensayo lineal (LIA). Las cifras de linfocitos T-CD4+ fueron obtenidos por citometría. ANA fueron detectados en 19/83 (23 %) pacientes. En 10/19 (53 %) fueron títulos bajos y en 5/19 (26 %) hubo título = a 1/320. El patrón principal fue el moteado irregular en el núcleo de las células en interfase. No hubo asociación entre presencia de ANA, edad, sexo, factor de riesgo para la infección o tiempo de la detección de anticuerpos anti-VIH. ANA fueron mas prevalentes en pacientes con <500 CD4+/l respecto a pacientes con >500 CD4+/l. Además, hubo mayor prevalencia en pacientes con tratamiento antiretroviral en relación a pacientes sin tratamiento. En muestras ANA (+), solo 1/19 (5 %) fue positiva para anti-proteína B centromérica y 14/19 (74 %) fueron equívocas para anti-histonas, anti-topo, anti-RNP, anti-Sm y/o anti-Ro(SSA), hallazgos que se evidenciaron con el incremento del título de ANA. 4/19 (21 %) fueron negativas en el LIA. Estos hallazgos indican que los ANA en la IA por VIH no evidencian un perfil asociado a enfermedades autoinmunes. La activación policlonal de células B o la reconstitución inmune luego de la terapia antiretroviral pueden condicionar la aparición de autoanticuerpos dirigidos contra una variada gama de antígenos nucleares. En algunos casos, la caracterización de la especificidad podría verse afectada por la presencia de autoanticuerpos cuya especificidad no es detectada con el sistema utilizado o por fenómenos de mimetismo molecular o alteración de epitopes conformacionales

0209 (342) EFECTOS DE LA TOXINA SHIGA DE TIPO 2 EN UN MODELO DE CELULAS ENDOTELIALES TRATADAS CON LPS. E Gerhardt¹, C Tironi Farinati¹, C Ibarra¹

¹Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina <agua1710@gmail.com>

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) afecta principalmente a niños menores de 5 años de edad y se caracteriza por la presencia de trombocitopenia, anemia hemolítica microangio-pática e insuficiencia renal aguda. Este síndrome se asocia con infecciones intestinales provocadas por la bacteria *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) que no invade el epitelio colónico sino que libera en el lumen intestinal toxina Shiga (Stx), el factor de virulencia que causa el SUH. La mayoría de las lesiones observadas son consecuencia de la interacción de Stx con el endotelio y epitelio intestinal y renal. El daño endotelial se produce luego de la unión de Stx al receptor específico globotriaosil ceramida (Gb3) expresado en la superficie celular. Trabajos anteriores del laboratorio demostraron que cultivos primarios de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) son un buen modelo para es-

tuar los mecanismos de acción de Stx de tipo 2 (Stx2). El objetivo de este trabajo es caracterizar los efectos de Stx2 sobre cultivos HUVEC en presencia de LPS. Las células se crecieron como monocapas confluentes o subconfluentes en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino. Luego, se preincubaron 24 hs con distintas concentraciones de lipopolisacárido (LPS) (0.1-10 µg/ml) y se incubaron las siguientes 24 hs con 10^3 DC₅₀ Stx2 purificada en el laboratorio. La actividad citotóxica se midió por incorporación de rojo neutro. Stx2 disminuyó en un 19% la viabilidad celular en cultivos subconfluentes de HUVEC. Este valor fue potenciado de manera dosis dependiente por la preincubación con LPS obteniéndose una inhibición de la viabilidad del 42% a la concentración de 10 µg/ml ($p < 0.01$). En cambio monocapas confluentes de HUVEC no fueron sensibles a Stx2 en presencia o ausencia de LPS. Los Resultados indican que monocapas de HUVEC subconfluente son sensibles a Stx2 y que el LPS potencia su efecto.

0210 (355) INHIBICIÓN DE LA ENZIMA BETAÍNA HOMOCISTEÍNA METILTRANSFERASA HEPÁTICA EN RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI. M R Arnaiz¹, R Aspera³, A Morales⁴, X Villalonga^{1,4}, N Villalba³, O Fridman^{3,4,5}

¹Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén; ²Centro de Altos Estudios en Ciencias de la Salud, Universidad Abierta Interamericana.; ³Instituto de Oncología Dr. Angel H. Roffo; ⁴Centro de Altos Estudios en Ciencias de la Salud, Universidad Abierta Interamericana; ⁵CONICET <zarnaiz66@yahoo.com.ar>

La infección por *Trypanosoma cruzi* afecta varios órganos de la economía ocasionando inflamación, necrosis celular y alteraciones vasculares. Los efectos sobre el hígado no han sido aún exhaustivamente estudiados. La homocisteína (Hcy), factor de riesgo de aterosclerosis y trombosis, ocupa una posición nodal en las rutas de folato y betaína que proveen unidades de un carbono para la síntesis y metilaciones de nucleótidos, procesos clave en enfermedades vasculares. Investigamos los efectos de la infección por *T. cruzi* sobre la histopatología hepática, la expresión y actividad de Betaína Homocisteína Metiltransferasa (BHMT) hepática, una de las enzimas del metabolismo de los grupos metilo y la homocisteinemia (tHcy) en ratones. **Materiales y Metodologías:** Se inocularon ratones C3H/Hen con 500 tripomastigotes de la cepa Tulahuén *T. cruzi* y se sacrificaron a los 120 días. Se tomó sangre para tHcy por quimioluminiscencia e hígado para histopatología (H&E-tricrómico de Masson), actividad de BHMT por método radioenzimático y proteína BHMT por Western Blot. Resultados: Los hígados de los ratones infectados (*T*) mostraron microabcesos, hematopoyesis extramedular y aumento de la trama de colágeno. La tHcy en µmoles/L fue en controles (C): $5,2 \pm 0,26$ (n=3) y en *T*: $5,32 \pm 0,27$ (n=5) (NS). La actividad de BHMT en pmoles/mg prot/min: C: $329,2 \pm 21,3$ (n=2) y *T*: $265,6 \pm 13,8$ (n=5) ($p < 0.05$) en un experimento y C: $378,3 \pm 45,4$ (n=3) y *T*: $226,6 \pm 23,1$ (n=5) ($p < 0.05$) en otro. La expresión de la forma monomérica 45 kDa de la proteína BHMT disminuyó en los hígados de *T* respecto de los C ($p < 0,001$). Conclusiones: Los ratones crónicamente infectados con *T. cruzi* muestran un hígado con signos histopatológicos de lesión sin nidos parasitarios y disminución de la actividad enzimática y de la expresión de la proteína BHMT hepática que no se tradujo en cambios en la tHcy. Es el primer estudio que informa un efecto de la infección por *T. cruzi* sobre una enzima del metabolismo de los grupos metilo. PIP CONICET 5716

0211 (360) DIFERENCIACION CELULAR DE BRUCELLA ABORTUS EN MICROAERBIOSIS. M A Almirón^{1,2}, R Ugalde¹, N Sanjuan²

¹IIB (UNSAM-CONICET); ²Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA <mnsanjuan@gmail.com>

Bruceella abortus es el agente causal de la brucelosis, una enfermedad zoonótica que por su falta de diagnóstico generalmente

conlleva a la cronicidad. El principal problema de esta patología reside en la escasa información que se tiene sobre los mecanismos de virulencia de esta bacteria. Su principal poder patógeno radica en la capacidad de multiplicarse y sobrevivir intracelularmente, es decir en microaerobiosis. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue estudiar la fisiología de *B. abortus* cepa 2308 (wt), 2308irr (deficiente en el regulador transcripcional dependiente del hierro) y 2308flgE (deficiente en el flagelo) en distintas condiciones ambientales (aerobiosis, microaerobiosis y anaerobiosis) y nutritivas (BB, LB, TG y MG suplementados con Cl₃Fe, hemina o glucosa, o tratados con DIP). Se tomaron muestras que fueron fijadas y procesadas para su visualización por microscopía electrónica y de fluorescencia, utilizando los colorantes Rojo Congo, Calcofluor, Naranja de Acridina y Cristal Violeta. Los Resultados obtenidos indicaron que tanto las células viables wt como las flgE comienzan a agregarse durante la fase estacionaria en microaerobiosis en presencia de hemina. Se hallan envueltas en una matriz amorfa que se tiñe con Calcofluor y con Rojo Congo y esta envoltura les permite flotar y adherirse al vidrio formando un anillo, como también crecer en colgajos y en biofilms sobre policarbonato. Por el contrario, las células irr crecen mejor en aerobiosis, no muestran agregación y su tinción es muy débil. Se concluye que células en fase estacionaria de *B. abortus* durante su desarrollo en microaerobiosis son capaces de producir una matriz extracelular que estaría compuesta por glucanos de unión beta 1-3 ó 1-4. Esta cobertura celular hidrofóbica les permitiría desplazarse por flotación en medios líquidos y crecer en biofilms, hechos en el que no está involucrado el flagelo y sí el regulador Irr.

0212 (363) EL FACTOR TRANSCRIPCIONAL ABRB REGULA LAS PROPIEDADES DE ADHERENCIA Y EXCLUSIÓN COMPETITIVA DE PATÓGENOS DE BACILLUS SUBTILIS PROBIÓTICO. A Rovetto¹, E Sabal², M Salvarrey², A Goñi¹, B Bongiovanni¹, R Grau¹

¹UNR-FCByF-IBR-CONICET; ²FCByF - UNR <rovetto@ibr.gov.ar>

La bacteria Gram (+) *Bacillus subtilis* es extensamente utilizada como probiótica en Europa y Asia. En mamíferos, el área del epitelio mucoso representa una extensa interfase en contacto con el medio externo y por la cual comúnmente las bacterias patógenas inician sus procesos infecciosos. En particular, la unión a fibronectina (Fn) es una característica importante asociada con la virulencia. En este trabajo se estudiaron las propiedades adherentes y de exclusión competitiva de patógenos de distintas cepas de *B. subtilis* a Fn. Esta adherencia fue reprimida por la presencia de una copia salvaje del regulador transcripcional AbrB y magnificada en cepas mutantes en *abrB*. La afinidad de la unión a Fn, mediante el cálculo de la Kd y ensayos de ELISA, arrojaron valores de 0.3 nM para *B. subtilis*, 3.0 nM y 33 nM para los patógenos *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* respectivamente. Concordantemente con la habilidad de *B. subtilis* de unir Fn, identificamos en esta bacteria un ORF de 572 AA, similar a proteínas de unión a Fn de la familia FbpA, el cual renombramos como Bsfbp (*B. subtilis* fibronectin binding protein). Cepas mutantes en *bsfbp* perdieron la capacidad de adherir Fn. Mediante la utilización del gen reportero *lacZ* se estudió la regulación transcripcional del gen *bsfbp*. La actividad del promotor *bsfbp* aumentó significativamente en la mutante *abrB*, respecto de la cepa silvestre, lo que permitió asignar un rol negativo a AbrB en la expresión de la adhesina. Ensayos de footprinting con AbrB pura y DNAsa I sobre la región promotora de *bsfbp* confirmaron a AbrB como represor transcripcional. Finalmente, cepas silvestres de *B. subtilis* (pero no la mutante *bsfbp*) mostraron la capacidad de excluir competitivamente la adherencia *in vitro* a Fn de cepas virulentas de *S. aureus* y *L. monocytogenes* marcados con FITC. Estos Resultados en conjunto refuerzan el uso de *B. subtilis* como agente probiótico de exclusión competitiva de patógenos del tracto gastrointestinal.

0213 (654) INDUCCION DE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS POR UN FACTOR DE VIRULENCIA DE TRYPANOSOMA CRUZI. A D Musikant¹, R D Higa², C Rodríguez¹, A S Jawerbaum², S Leguizamón¹

¹Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología - Facultad de Medicina - UBA; ²Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos - CONICET - UBA <musi90@gmail.com>

T. cruzi no sintetiza ácido siálico de novo, lo obtiene a partir de glicoconjugados del huésped mediante la trans-sialidasa (TS). La movilización de estos residuos induce plaquetopenia y apoptosis de células del sistema inmune (central y periférico). TS es liberada a circulación ejerciendo su acción localmente y a distancia durante la etapa aguda de la infección. Las metaloproteasas (MMPs) son endopeptidasas zinc dependientes involucradas, entre otros procesos, en la inducción de inflamación en diversas patologías. Durante la infección murina la actividad de MMP2 se ve incrementada en sueros de fase aguda y la de MMP9 en sueros de fase crónica. El objetivo fue analizar la participación de la actividad de TS en la inducción de MMPs circulantes murinas. Se administró a ratones C57BL/6 y BALB/c 1 µg durante 5 hs (grupo 1) o 10 µg durante 8/16 hs (grupo 2) de TS recombinante. Se usó PBS-glicerol o PBS-BSA como control. En todas las condiciones ensayadas se observó un aumento en la actividad proMMP2 sérica (grupo 1 p<0,001; grupo 2 p<0,05), la MMP2 sérica se incrementó en el grupo 1 (p<0,05), en ningún caso se modificó la actividad MMP9. Para estudiar este fenómeno en la infección, inhibimos la actividad TS empleando anticuerpos monoclonales neutralizantes (AcNt). Ratones BALB/c infectados se transfirieron con AcNt o líquido ascítico en los controles. A los 13 dpi se observó disminución de la actividad proMMP2 sérica (p<0,05). La actividad MMPs se midió por zimografía, se cuantificó por ImageJ y se analizó estadísticamente mediante GraphPad. Se midió la actividad TS circulante y neutralización de TS utilizando: ¹⁴C-Lactosa (aceptor ácido siálico) y sialyllactosa (dador ácido siálico). Se evaluaron parasitemias. Estos Resultados preliminares muestran, mediante dos aproximaciones diferentes y en dos cepas murinas, que el factor de virulencia TS estaría relacionado con la inducción de la actividad de MMPs circulantes observada en la fase aguda de la infección por T.cruzi.

INMUNOLOGIA 01

0214 (28) LA REGIÓN POLIMÓRFICA DE LA PROTEÍNA A DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS INDUCE UNA RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIADA POR IFN-β EN CÉLULAS EPITELIALES RESPIRATORIAS. M Gómez¹, A Prince²

¹DPTO. DE MICROBIOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UBA; ²COLUMBIA UNIVERSITY, NEW YORK, USA <marisaigomez@gmail.com>

Staphylococcus aureus es un importante patógeno humano que puede causar infecciones con alta morbilidad y mortalidad. Entre sus múltiples factores de virulencia, la proteína A (SpA) es una proteína de superficie presente en todas las cepas de S. aureus. Recientemente se ha demostrado que SpA, a través de sus dominios de unión a IgG, reconoce e induce señalización a través del receptor de tipo 1 del factor de necrosis tumoral (TNFR1) lo cual inicia la producción de IL-8 por células epiteliales de las vías aéreas y el reclutamiento de neutrófilos al pulmón. La interacción de SpA con TNFR1 resultó crítica para el desarrollo de neumonía por S. aureus como se demostró utilizando ratones knock out para TNFR1 y mutantes de S. aureus que no poseen proteína A. Adyacente a los dominios de unión a IgG se encuentra una región polimórfica, llamada Xr, que consta de un número variable de secuencias cortas repetidas (SSR, short sequence repeats) de 24 pb que forman la base del sistema de tipificación de S. aureus por proteína A. El rol biológico de estas secuencias repetidas se desconoce, a pesar del alto grado de

conservación de las mismas. En el presente trabajo, hemos demostrado que la región Xr de la proteína A de S. aureus induce la producción de IFN-α en células epiteliales de las vías aéreas. Esta cascada de señalización, que es iniciada por la internalización de la proteína A, induce la activación de Jak-STATs lo cual conduce a la producción de IL-6. Estudios in vivo permitieron demostrar que el aumento en el número de SSR está asociado con un incremento en la producción de IL-6 y el reclutamiento de neutrófilos al pulmón. Esta cascada de señalización iniciada por S. aureus tendría un efecto protector durante las etapas iniciales de la infección como se demuestra mediante el uso de inhibidores de Jak-STATs y ratones knock out para el receptor de IFN-α.

0215 (228) VARIACIONES DEL ÁCIDO SIÁLICO EN LA SUPERFICIE DE ISLOTES PANCREÁTICOS CON POTENCIALES EFECTOS INMUNOLÓGICOS POSTRASPLANTE. S H Hyon¹, M.L Gimeno¹, C Bernard¹, P Argibay¹

¹Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires <sung.hyon@hospitalitaliano.org.ar>

Introducción: El trasplante de islotes pancreáticos es una alternativa terapéutica para la diabetes insulino dependiente. El proceso de digestión pancreática utilizado para obtener islotes puede modificar la estructura molecular de su superficie. El ácido siálico (AS), un monosacárido hallado sobre la superficie de células y algunos microorganismos, estaría involucrado en fenómenos inmunológicos cruciales. **Objetivo:** Evaluar la distribución de AS sobre la superficie de islotes y acinos antes y después del procedimiento de aislamiento. **Materiales y Metodologías:** Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 6-8 semanas de edad con control genético y sanitario como donantes de páncreas y de islotes. Los islotes se obtuvieron por digestión estática con colagenasa, a 37 °C, CO₂ al 5%. Tanto el tejido pancreático pre-digestión como los islotes y acinos pos-digestión se fijaron en Bouin, se incluyeron en parafina y se cortaron a 4 micrones de grosor. La presencia de AS terminal se evaluó usando los siguientes ligandos específicos (lectinas) para azúcares: Aleuria-aurantia, Erithrina, Maackia-amurensis, Sambucus-nigra, Peanut-agglutinin, sWGA, WGA, VVL, GNL, GSL-II, y lotus. **Resultados:** No hubo cambios para WGA, VVL, GNL, GSL-II, o lotus en islotes ni acinos antes vs. después del aislamiento. Sin embargo, se observó: AS con unión alfa-2-6 y alfa-2-3 perdida de islotes y acinos; AS en unión alfa-2-6-galactosa perdida en acinos pero preservada en islotes; galactosil-(beta-1-3)-N-acetilglucosamina perdida en islotes pero preservada en acinos; y N-acetilglucosamina sin AS perdido tanto en islotes como en acinos. **Conclusiones:** La digestión enzimático-mecánica utilizada para obtener islotes para trasplante produce cambios en la estructura molecular tanto de las células endocrinas como exocrinas del páncreas. Este fenómeno podría afectar críticamente la inmunogenicidad de estas células luego del trasplante.

0216 (404) ¿CON AZÚCAR O SIN AZÚCAR? MECANISMOS INTRACELULARES QUE REGULAN LA GLICOSILACIÓN DIFERENCIAL DE INMUNOGLOBULINAS. M B Prados¹, J La Blunda¹, J Caramelo², S Miranda¹

¹Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral; ²Fundación Instituto Leloir <pradosmb@gmail.com>

Modificaciones en el patrón de glicosilación de proteínas pueden afectar su actividad biológica. Los anticuerpos asimétricos (AcA) son un ejemplo pues presentan un resto hidróxido en un Fab que los transforma en bloqueantes y no citotóxicos. La ruta biosintética no explica la producción controlada de esta glicosilación diferencial. Oligosacariltransferasa (OST) es responsable de la transferencia del oligosacárido al péptido naciente y UDP-glucosaglicosiltransferasa (GT) interviene en el control de calidad. Existen dos isoformas con actividades diferentes tanto para OST (STT3-A y STT3-B) como para GT en humanos. Pos-

tuamos que la heterogeneidad de glicanos podría deberse a diferencias en la expresión de dichas isoformas. En este trabajo investigamos los efectos y mediadores de progesterona (P4) sobre la síntesis de AcA y expresión/actividad de las enzimas en un cultivo de hibridoma, productor de AcA y simétricos. Las células se cultivaron en presencia de P4 sola o con anticuerpo anti-PIBF ("progesterone induced blocking factor") o anti IL-6. La expresión de las enzimas se investigó por western blot, la actividad por Metodologías de referencia y los AcA por ELISA. P4 a bajas dosis (10^{-9} y 10^{-10} M) modula la expresión de STT3-A y STT3-B mediante un mecanismo dependiente de PIBF. La actividad y expresión de GT son moduladas por P4 a altas dosis (10^{-5} y 10^{-6} M), siendo IL-6 la intermediaria. Las variaciones en la proporción de AcA observadas a las mismas dosis de P4 sugieren que STT3-A, STT3-B y GT participarían en este proceso. Además, nuestros Resultados indicarían la existencia de al menos dos isoformas de GT funcionales en ratón.

0217 (575) PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LAS ALTERACIONES DE LA INMUNIDAD Y EN LA EVOLUCIÓN TUMORAL INDUCIDAS POR LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO RESTRINGIDO. L.R Frick¹, M Rapanelli², U Bussmann², A M Genaro¹, G Cremaschi¹

¹CEFYBO-UBA-CONICET; ²IBYME-CONICET
<lfrick@fmed.uba.ar>

Hemos demostrado que el estrés crónico restrictivo (CRS) deteriora selectivamente la inmunidad mediada por células T, favoreciendo la progresión tumoral en un modelo de linfoma singeneico. Las hormonas clásicas del estrés son los glucocorticoides (GC) y las catecolaminas (CA), mientras que las hormonas tiroideas (TH) no han sido tan estudiadas. Aquí analizamos la participación de estas hormonas en nuestro modelo. El estrés agudo (ARS) resultó en un aumento de corticosterona y noradrenalina, sin alterar la reactividad de las células T. En cambio, los niveles de ambas hormonas se normalizaron en animales CRS, disminuyendo los niveles de T_3 y T_4 , acompañado de una reducción de la respuesta proliferativa de células T y un impedimento de la activación de las isoformas de la proteína quinasa PKC α y ϵ , un mediador molecular clave en la activación de linfocitos T. En animales CRS portadores de tumor también se observó una reducción de TH, un aumento de la velocidad de crecimiento tumoral y una disminución de la citotoxicidad contra las células de linfoma. El tratamiento de reemplazo hormonal con TH normalizó los valores de T_3 y T_4 , revirtiendo el deterioro de la respuesta proliferativa de linfocitos T y de la activación de PKC α y ϵ inducido por el CRS en animales naïve. En animales portadores de tumor, la administración terapéutica de T_4 disminuyó la velocidad de crecimiento de los linfomas y aumentó la citotoxicidad específica contra las células tumorales ex vivo. Finalmente, se estudiaron los efectos directos de estas hormonas en las células tumorales. La dexametasona y la epinefrina inhibieron la proliferación del linfoma in vitro, mientras que la tiroxina no indujo cambio alguno. Estos Resultados, habituales en leucemias/linfomas, descartan la participación de GC y CA en este modelo. Este trabajo demuestra por primera vez que las TH participan en los efectos del estrés en las alteraciones de las patologías neoplásicas y el componente T de la inmunidad antitumoral.

0218 (641) INMUNOMODULACIÓN EN ARTRITIS EXPERIMENTAL MEDIADA POR COLECALCIFEROL. P Mortarino¹, D Goy¹, A Palena Alfonso¹, D Abramson¹, J Toledo¹, L Sarrío¹, N M Fracalossi¹, M Zapata¹, A Jamín¹, G Báez¹, G Cointry¹, S Feldman¹

¹Cat Quim Biolog Lab Biol Osteo-artic. y Terapias Emergentes, Fac Cs Médicas Universidad Nacional de Rosario
<pablo2086@hotmail.com>

Las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea (AR) involucran desbalances de diferentes vías. Existen modelos que progresan hacia un subtipo de artritis mediada por eosinófilos

con incrementos de IL5, lo que no se detectaría en AR debido a la aplicación de drogas anti-inflamatorias. Dado que existen evidencias epidemiológicas de la asociación entre déficit de Vit D y AR, se investigó si el tratamiento con colecalciferol (proD) podría inmunomodular evolución de un modelo de artritis inducida por OVA (A). 40 conejos *New Zeland* se dividieron en grupo control (C) y grupo A; éstos se subdividieron según recibiesen 90 días vía oral proD, 2000 UI/día/conejo, lisados enzimáticos de colágeno 200 ml/conejo/día. (T), ambos tratamientos (proDT) o placebo (pl), post-declaración del fenómeno inflamatorio. Se realizaron estudios del incremento diámetro femorotibiorotuliano (F), resonancia magnética (RM), e estudios histológicos cuantitativos de cortes criostáticos de intestino (E). Resultados: No hubo diferencias entre los subgrupos C para ninguno de los estudios. Para F, Apl > que AproD, AproDT y AT ($p < 0.01$), RM para Apl mostró de escaso a moderado a severo derrame, y moderada tumefacción de tejidos blandos, no detectados en los otros grupos. El recuento de E fue significativamente mayor para Apl que para AproDT ($p < 0.01$), pero no hubo diferencias entre Apl y AIAT ni AproD. El tratamiento conjunto T-proD, sinergizaría el fenómeno inmunomodulador de tolerización, disminuyendo del fenómeno autoinmune que involucra reclutamiento de numerosos tipos celulares, evidenciándose una disminución del grado de infiltrado de eosinófilos en mucosa intestinal. Estos Resultados y otros que mostraron que células del sistema inmune tendrían receptores para Vit D, corroborarían propuestas de que vitD debe ser considerada como una hormona pleiotrópica que participaría en numerosos mecanismos, algunos de los cuales podrían estar mediados por IL-5.

0219 (649) TRATAMIENTO ORAL CON HIDROLIZADOS ENZIMÁTICOS DE COLÁGENO (HEC) EJERCE EFECTOS BENEFICIOSOS SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA ARTRITIS A NIVEL EXPERIMENTAL Y CLÍNICO, DISMINUYENDO EL FENÓMENO ARTICULAR. CORRELATO CON DISMINUCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNA CITRU. P Mortarino¹, D Goy¹, A Palena Alfonso¹, D Abramson¹, J Toledo¹, M Zapata¹, L Sarrío¹, N M Fracalossi¹, A Jamín¹, G Cointry¹, S Feldman¹

¹Cat Quim Biolog Lab Biol Osteo-artic. y Terapias Emergentes, Fac Cs Médicas Universidad Nacional de Rosario
<pablo2086@hotmail.com>

Se estudió los efectos de tratamiento HEC a nivel experimental (A) y clínico (B) en la evolución de la patología artrítica. A) Conejos hembras *New Zeland* se dividieron en dos grupos según recibieran inducción de artritis con OVA (AIA), o no C, (n=10) Cada grupo se subdividió *a posteriori* de declarado proceso inflamatorio en T y pl, (n=5), según recibieran HEC diariamente (90días) o placebo. Se estudió: incremento del diámetro femorotibiorotuliano (F), niveles de óxido nítrico ON, inflamación: anatomopatológicamente (An) y por resonancia magnética (RM): No hubo diferencias para ningún estudio entre subgrupos controles C-T y C-pl., Los Resultados de ON: AIAPl > AIA-T > C; F: AIAPl > AIA-T > C ($p < 0.01$), de An: AIAPl > AIA-T ($p < 0.01$). Resultados de RM evidenció mayor tumefacción, derrame, alteración de la señal para AIAPl que AIA-T ($p < 0.05$). B) Pacientes con diagnóstico de AR (criterios ARA), 8 mujeres y 2 hombres, se les indicó tratamiento HEC, 5 ml diarios de una solución 10% p/v. Se evaluaron articulaciones afectadas a los 30, 60, 90 y 120 días de tratamiento, así como hemograma, VES, PCR, FAN, látex, Ac anti-peptido citrulinado (AcC) y unión a cortes esófago de rata por técnica de inmunofluorescencia (Esr) La VES promedio a los 30 días fue de 52 ± 15 , reduciéndose significativamente a los 60 días a 21 ± 7 ($p < 0.05$), a los 90 días a 15.00 ± 4 ($p = 0.01$) y a los 120 a 11 ± 3 ($p < 0.01$). El patrón de FAN homogéneo se redujo significativamente de 1/40 promedio (30 días) a 1/16 promedio (90 y 120 días, $p < 0.05$). PCR y látex no variaron. AcC disminuyó del día 30 al día 120, ($p < 0.05$) correlativamente con Resultados para Esr ($p < 0.05$) Los hallazgos observados sugieren que el tratamiento con hidrolizados enzimáticos peptídicos al no provocar efectos secundarios inde-

seables, deba ser considerado como alternativa a los tratamientos convencionales

INMUNOLOGIA P1

0220 (14) CURCUMINA, POTENTE AGENTE INMUNOMODULADOR, INHIBE LA APARICION DE DIABETES TIPO 1 EN UN MODELO EXPERIMENTAL. C N Castro ¹, J Winnewisser ¹, L D Joannas ², D A Paz ³, A C Liberman ¹, R A Dewey ⁴, E Arzt ¹, M J Perone ¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular IFIBYNECONICET; ²Bioterio Central FCEYN UBA; ³IfibyNECONICET; ⁴Instituto Tecnológico de Chascomus (IIB-INTECH) CONICET-Universidad Nacional de Gral. San Martín <carlonacastro@gmail.com>

La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune que destruye las células β del páncreas. Es posible prevenir/curar la T1D mediante el empleo de agentes inmunomoduladores. Curcumina (Cur; diferuloylmethane), pigmento del rizoma de *Curcuma longa* es un reconocido anti-oxidante, anti-tumoral y anti-inflamatorio. El potencial terapéutico de Cur sobre la T1D se desconoce, hasta el momento. Ratones NOD hembras recibieron ciclofosfamida (CYP) para acelerar/sincronizar la autoinmunidad. Un grupo recibió al día 0 (d0) 0.1 y otro 1mg Cur hasta el d60; y el grupo control, solo recibió vehículo. Se consideraron diabéticos cuando la glucemia fue ≥ 300 mg/dl. Cur previno el desarrollo de T1D en el 42 y 65% de los ratones desafiados con CYP y tratados con 0.1 y 1mg Cur ($p=0.029$ y 0.0005 vs. control, respectivamente). Cur no causó efectos secundarios indeseables. Al d90, se ensayó el test de tolerancia a la glucosa (i.p., glucosa 2g/kg). Al grupo Cur se lo comparó con ratones no diabéticos (controles, misma edad/peso) y no se observaron diferencias entre grupos. El análisis histológico (H&E, inmunohistoquímica) del páncreas indicó que los ratones tratados con Cur poseen un número de islotes y contenido de insulina normal, similar al de ratones intactos (NOD, 4-6 semanas) y perinsulinitis. Los animales desafiados con CYP presentaron infiltración inflamatoria de los islotes (grado 3, $>50\%$ infiltrado), escaso número de células β y reducción del contenido de insulina. La proliferación de células T policlonales in vitro fue inhibida un 70% por Cur20iM ($p<0.05$ vs. control). Cur (0.08-2.5iM) no afectó la viabilidad de células NIT-1, productoras de insulina. Conclusión: la administración de Cur protege a las células β del ataque autoinmune, y previene/retarda la aparición de T1D en este modelo agresivo de autoinmunidad, sugiriendo que Cur podría ser eficaz para el tratamiento de la enfermedad natural. Los mecanismos de acción terapéutica de la Cur se encuentran actualmente en estudio.

0221 (72) ROL DE LA IL-7 SOBRE LOS MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES EN UN MODELO DE INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA. G C Calabrese ¹, E Luczak ², M E Roux ²

¹CÁTEDRA DE BIOLOGÍA CELULAR-FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA - UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES; ²CÁTEDRA DE FISIOPATOLOGÍA-LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE MUCOSAS- FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA-UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES <gcalabe@ffybu.uba.ar>

Hemos comprobado en un modelo de inmunodeficiencia secundaria por malnutrición proteica (R21) la presencia de un proceso inflamatorio desencadenado por el antígeno dietario y regulado por el TNF α en el que aumenta la subpoblación T $\alpha\alpha$ en la lámina propia y en el intraepitelio intestinal. Dada la importancia de la IL-7 sobre la proliferación de esta subpoblación y habiendo demostrado la expresión de la misma en las células epiteliales intestinales (IEC) de R21; nos propusimos estudiar sobre IECs de R21:1) la transcripción génica del mRNA de IL-7, 2) las vías de señalización intracelular del factor de transcripción NF- κ B y Stat3 y 3) la distri-

bución subcelular de la proteína antiapoptótica Bcl-2. Se analizó sobre las IECs, fraccionadas por ultracentrifugación diferencial, la distribución subcelular de los factores de transcripción y Bcl-2 por Western Blot en las fracciones citosólicas, mitocondriales y nucleares previamente purificadas. Además, se estudió la expresión del mRNA de la IL-7 por RT-PCR semicuantitativa. Los Resultados obtenidos fueron: 1) al realizar la cuantificación relativa de mRNA de la IL-7/beta-actina, se observó un incremento de 1.5 veces en el nivel de expresión en R21 con respecto al control (C60) ($P<0.05$, R21 vs C60, $n=3$); 2) se observó un incremento en la densidad óptica relativa de la expresión del NF κ B y del STA3 fosforilado en la fracción nuclear, con respecto a la citosólica de los R21 (DO Stat3 74.45 vs 50.85; R21 vs C60, $n=3$) y 3) se observó la concentración de Bcl2 en la fracción mitocondrial de los R21 (DO 123.95 vs 91.24; R21 vs C60). El antígeno dietario desencadena un proceso inflamatorio, en el que: 1) el TNF α induciría la translocación del factor NF- κ B al núcleo donde modula la transcripción de genes proinflamatorios, 2) las IECs de R21 incrementan la transcripción y secreción de la IL-7 y 3) esta citoquina favorecería la sobrevida celular por inhibición de la apoptosis mediado por Bcl-2.

0222 (144) AUTO-ANTICUERPOS CONTRA RECEPTORES MUSCARÍNICOS EN CÁNCER DE MAMA: MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE CICLOOXIGENASA EN CÉLULAS MCF-7. M P Negroni ¹, A Español ¹, T Pelegrina ¹, M Farina ¹, E Azar ², C Cresta Morgado ², G Fiszman ², M E Sales ¹

¹CEFYO-CONICET-FACULTAD DE MEDICINA-UBA; ²INSTITUTO ANGEL H ROFFO-FACULTAD DE MEDICINA-UBA <pianegroni@gmail.com>

Demostramos la presencia de auto-Anticuerpos (auto-Acs) contra receptores muscarínicos (RM) en pacientes con cáncer de mama en estadio I. La activación de los RM en células MCF-7, derivadas de un adenocarcinoma mamario humano, con el agonista muscarínico carbacol (CARB) o con los auto-Acs estimula la proliferación celular en forma concentración dependiente. Puesto que los RM pueden acoplarse a la ciclooxigenasa (COX) enzima efectora de la señalización intracelular, que además es marcadora y promotora de la tumorigénesis, decidimos estudiar el efecto de la IgG purificada de pacientes en T1N0Mx (tamaño tumoral menor de 2 cm y sin metástasis ganglionares) sobre la función de COX en células MCF-7, en comparación con CARB. La IgG purificada por cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharosa, del suero de 4 pacientes con tumor de mama (IgGT) (2 ug/ml) estimuló significativamente la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) (pg/10⁶cél.) respecto al control (células sin tratamiento) por RIA (control: 1.16 ± 0.01 ; IgGT: 80.39 ± 3.94 ; 289.87 ± 18.08 ; 1242.25 ± 124.22 ; 1687.32 ± 196.53 ; $p<0.05$). La IgG de pacientes con fibroadenoma benigno de mama no modificó la producción de PGE₂ (1.15 ± 0.08 ; $p<0.5$). El CARB 10⁻⁹M, incrementó con menor eficacia la producción de PGE₂ (2.95 ± 0.29 ; $p<0.05$) y el efecto fue revertido con el antagonista muscarínico atropina (10⁻⁶M) o con 4-DAMP (10⁻⁷M) antagonista M₃, los que también redujeron el efecto proliferativo (% respecto del basal) inducido por el CARB (46 ± 3 ; $p<0.05$) medido mediante la reducción de MTS a formazán. Se observó que los niveles de PGE₂ producidos, correlacionaron con la magnitud de la respuesta proliferativa inducida por las IgGT (7.75 ± 0.63 ; 26.25 ± 1.06 ; 39.38 ± 2.19 ; 35.63 ± 2.5 ; $p<0.05$). Concluimos que en el suero de pacientes con cáncer de mama en estadio I existe una fracción de anticuerpos que reconocen RM y potencian la proliferación de células MCF-7 en forma concomitante con la producción de PGE₂, lo que promovería la progresión del tumor.

0223 (148) POTENCIAL DE MEMBRANA Y PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE ANIMALES CON INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR. Y M Romero ¹, R Chiurazzi ¹, I Fenoy ¹, C Amorena ¹, A Goldman ¹

¹CESyMA-ECyT-Universidad Nacional de General San Martín <ymrom@yahoo.com>

Los macrófagos alveolares (MA) juegan un rol primordial en la iniciación de la inflamación pulmonar. Agonistas que estimulan macrófagos a liberar especies reactivas del oxígeno (ROS) causan hiperpolarización de la membrana celular. Por otra parte, se ha observado que la actividad de un canal de potasio esta vinculada a la producción de óxido nítrico y el estrés oxidativo en macrófagos activados de *Carassius auratus*. En pacientes asmáticos, la inflamación alérgica de las vías aéreas se asocia con cambios funcionales en los MA que incluyen un aumento en la producción de anión superóxido (O_2^-). El objetivo del presente trabajo fue establecer la relación entre agentes despolarizantes y la formación de O_2^- en macrófagos alveolares de ratones con inflamación alérgica pulmonar. Ratones BALB/c se sensibilizaron por vía *i.p* con OVA (20mg) + Al(OH)₃ (2mg) y desafiaron por vía aérea con OVA 3%. La producción de ROS (ensayo de reducción de NBT) y los experimentos de "voltage clamp" en configuración de "whole cell" se realizaron en MA obtenidos 48 hs post exposición a OVA. Se describió una corriente de K⁺ de un canal que rectifica hacia fuera con las mismas características en los MA de animales normales y alérgicos. Los MA de animales alérgicos mostraron un aumento en la superficie celular (29 ± 2.3 , alérgicos vs. 10.1 ± 0.6 pF, normales, $<x> \pm ES$) y en la conductancia (15.25 ± 3 , alérgicos vs. 6.95 ± 0.9 pS, normales, $<x> \pm ES$). La producción de O_2^- fue mayor en los MA de animales asmáticos y fue inhibida por la despolarización de la membrana con alto K⁺ (50mM extracelular) y por caribdotoxina (ChTx) (1.5×10^{-7} M), un inhibidor de los canales Kv1.3.

	normal 5mM	normal 50mM	normal ChTx	alérgico 5mM	alérgico 50 mM	alérgico ChTx
% cél. reactivas	34±3.5	23±0.3	18±1.4	50±5.4*	16±2	18±6

$<x> \pm ES$, * $p < 0.05$ vs. resto de los grupos experimentales. Se concluye que la producción de O_2^- en los macrófagos de animales asmáticos es mayor y fuertemente dependiente del potencial de membrana.

0224 (161) NEOVASCULARIZACIÓN EN UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN AGUDA INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO DE E. COLI. ROL DE LOS MACRÓFAGOS.

E de la Torre¹, E Hovsepian¹, N Goren¹, M E Sales¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires <eulaliadelatorre@hotmail.com>

El shock séptico (SS) inducido por infecciones bacterianas, afecta al miocardio y al sistema vascular sanguíneo. El daño es causado por los propios microorganismos infectantes o sus endotoxinas y puede ser potenciado por el infiltrado de células del sistema inmune (SI) en el miocardio. No se conoce el rol de los miocardiocitos (MC) ni el de las células del SI en la angiogénesis inflamatoria durante el SS. Teniendo en cuenta que el proceso de neovascularización puede contribuir al agravamiento o a la reparación del tejido cardiovascular dañado, nos proponemos investigar la angiogenicidad de los MC y de los macrófagos (Mfs) peritoneales en un modelo de infección aguda por lipopolisacárido (LPS) de *E. coli* en ratones BALB/c. Demostramos que los MC son capaces de estimular la neovascularización *in vivo* (Número de vasos/mm² de piel) (Control: 1.01 ± 0.12 ; MC 10⁶: 2.19 ± 0.45 ; $p < 0.001$). Además en un ensayo análogo cuantificamos la inducción epidérmica de la expresión de proteínas pro-angiogénicas por Mfs, tratados *in vitro* con LPS (10 ug/ml) en comparación con Mfs sin tratamiento (control), por Western blot (D.O./mm²). Observamos que la inoculación de Mfs (5.10⁵) estimulados con LPS indujo la expresión de MMP-9 (Control: 3.96 ± 0.02 ; LPS: 6.6 ± 0.05 ; $p < 0.05$), CD-31 (Control: 23.00 ± 0.03 ; LPS: 28.00 ± 0.11 ; $p < 0.05$) y VEGF-A (Control: 0.90 ± 0.07 ; LPS: 1.80 ± 0.04 ; $p < 0.05$). Además estudiamos el papel de Mfs peritoneales provenientes de animales infectados con LPS (1mg/g) que fueron sacrificados a las 24 h. post-infección. Observamos un incremento de la expresión de

MMP-9 (Control: 2.9 ± 0.1 ; LPS: 14.8 ± 0.1 ; $p < 0.05$) y de VEGF-A (Control: no detectado; LPS: 8.82 ± 0.09 ; $p < 0.05$) con respecto a los Mfs de animales no tratados (Control). Concluimos que los MC murinos son inductores de angiogénesis y que la infección con LPS potencia el efecto pro-angiogénico de los Mfs lo que los habilitaría como moduladores de dicha respuesta en el miocardio.

0225 (248) EL COMPUESTO A (CPDA), ES UN NOVEDOSO MODULADOR DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR) CAPAZ DE REGULAR DIFERENCIALMENTE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN (FT) TH2 GATA-3 Y TH1 T-BET. A C Liberman¹, C Castro¹, M J Perone¹, J P Druker¹, K De Bosscher², G Haegeman², E Arzt¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Dpto FBMC, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET; ²Laboratory for Eukaryotic Gene Expression and signal Transduction (LEGEST), Gent, Belgica <liberman@fbmc.fcen.uba.ar>

Recientemente se ha caracterizado un novedoso modulador del GR, el CpdA derivado de una planta del desierto de Namibia (1). El CpdA presenta una ventaja sobre los GCs al tratarse de un compuesto "disociado" que no induce la expresión de genes que contienen elementos de respuesta a GCs (GRE), aceptado como la base de los efectos secundarios no deseados de los GCs. Sin embargo, el CpdA es capaz de activar al GR de tal forma que interfiere con la actividad de FT (ej. NFkB) que dirigen la expresión de genes de citoquinas. Esta función inhibitoria es aceptada como el mecanismo que explica la capacidad immuno-modulatoria de los GCs. Por lo tanto resulta interesante estudiar el efecto del CpdA en los procesos Th1-Th2 y como su mecanismo de acción difiere del clásico mediado por GCs. Estudiamos la regulación por CpdA (10⁻⁶M) de los FT T-bet y GATA-3 claves para la diferenciación Th1 y Th2 respectivamente. La actividad transcripcional de GATA-3 y T-bet fue estudiada mediante transfecciones transientes en la línea celular EL-4 usando los elementos de respuesta de GATA-3 y T-bet clonados río arriba del gen de luciferasa y también los promotores de IL-5 (Th2) y de IFN-gamma (Th1). La expresión de T-bet fue analizada por Western Blot. Observamos que CpdA inhibe la actividad de T-bet sobre sus elementos de respuesta (38%, $p < 0.01$) y también sobre el promotor de IFN-g (30%, $p < 0.01$). Al contrario, CpdA aumenta la actividad transcripcional de GATA-3 (50%, $p < 0.01$) inducida por AMPc tanto sobre sus elementos de respuesta como sobre el promotor de IL-5 (57%, $p < 0.01$). Los ensayos de Western Blot muestran que CpdA inhibe la expresión de T-bet. Por lo tanto, el CpdA favorece una respuesta Th2 y al mismo tiempo inhibe la respuesta Th1. Estos Resultados muestran el potencial de CpdA como droga anti-inflamatoria sin poseer los efectos colaterales del tratamiento con GCs. (1) De Bosscher K, 2005, PNAS, 15827-32

0226 (264) EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) MEDIA LOS EFECTOS APOPTÓTICOS E INFLAMATORIOS EN EL HÍGADO DE RATONES C57BL/6 INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI (T.CRUZI). M T Ronco¹, D E Francés¹, A D Quiroga¹, M L Alvarez¹, G B Pisani², S Revelli³, C E Carnovale¹

¹Instituto de Fisiología Experimental - CONICET. Fac de CS Bioq y Farm. UNR; ²Cátedra de Morfología Fac de CS Bioq y Farm. UNR; ³Instituto de Inmunología. Fac Cs Médicas. UNR <tereronco@hotmail.com>

Ratones C57BL/6 infectados con *T. cruzi* desarrollan una infección sistémica aguda letal con aumento de niveles séricos de TNF- α . Dado que el hígado es uno de los órganos precursores de citoquinas y además es afectado por la infección con *T. cruzi*, evaluamos la expresión de TNF- α hepáticos y su relación con apoptosis e inflamación. Ratones 6-8 semanas fueron infectados por vía subcutánea con 100 tripomastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. Un grupo recibió anti-TNF- α (Infliximab, 10mg/kgpc) 3 veces por semana. Los animales fueron sacrificados a los 14 días

post-infección (n=6); Control(C); infectados con *T. cruzi* (TC); Control+anti-TNF- α ; infectado+anti-TNF- α (Tc+a-TNF). C y C+a-TNF no mostraron diferencias significativas; los Resultados se analizan respecto C. Parasitemias (parásitos /50 campos): Tc: 98 \pm 15; Tc+a-TNF: 266 \pm 100 \dagger . TNF- α en suero(ELISA): C:21 \pm 3pg; Tc:470 \pm 130pg \dagger ; Tc+a-TNF:150 \pm 20 \dagger . En el hígado de los ratones infectados se observó un aumento (western blot) de los niveles de TNF- α (200%) y del TNFR1(300%) respecto C. N $^{\circ}$ de infiltrados inflamatorios hepático, estimado como % del campo microscópico ocupado, C=5%; Tc:6-20%; Tc+a-TNF=5. En la fracción mitocondrial se determinaron (western blot, unidades arbitrarias) las proteínas pro-apoptóticas Bid-t (C:52 \pm 8; Tc:179 \pm 15 \dagger ; Tc+a-TNF:48 \pm 12 \dagger) y Bax (C:265 \pm 45; Tc:514 \pm 15 \dagger ; Tc+a-TNF:237 \pm 61 \dagger). Se observó un aumento significativo del índice apoptótico en los animales Tc respecto de C; el cual disminuyó posterior al tratamiento con a-TNF (% hematoxilina-eosina; C:0,015 \pm 0,003; Tc:0,300 \pm 0,020 \dagger ; Tc+a-TNF:0,050 \pm 0,001 \dagger). *p<0,05 vs C; \dagger p<0,05 vs Tc. Estos Resultados sugieren que la infección con *T. cruzi* produce aumento hepático de TNF- α ; que induce la acumulación de infiltrados inflamatorios en el hígado y la muerte celular por apoptosis a través de la unión a su receptor seguido de la translocación de Bid-t y Bax a la mitocondrias.

0227 (385) CUANTIFICACIÓN DE CITOQUINAS POR RT-PCR EN LECHE PROVENIENTE DE VACAS TRATADAS CON UN MODIFICADOR DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA INTRAMAMARIO. C Baravalle ¹, B E Dallard ¹, L F Calvino ², H H Ortega ¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral; ²INTA EEA Rafaela <cbaravall@fcv.unl.edu.ar>

Para el control de las infecciones intramamarias en bovinos, se ha contemplado la estimulación de la respuesta inmune inespecífica por medio del uso de modificadores de la respuesta biológica (MRB). En este sentido, nos propusimos evaluar por RT-PCR la expresión de citoquinas en leche bovina en respuesta a la inoculación intramamaria de *Panax ginseng* como MRB. Se recolectaron muestras de leche a las 0 hs (previa inoculación) y a las 24, 48 y 72 hs post inoculación (PI) con MRB [10 ml *P. ginseng* (3 mg/ml) por cuarto mamario] y placebo (vehículo). Se efectuó RT-PCR a todas las muestras utilizando *primers* para IL1- α y β , IL-8 y TNF- α . El análisis semicuantitativo de las bandas obtenidas se llevó a cabo por densitometría óptica en relación a la cuantificación de la expresión de un gen normalizador (β -Actina). El análisis estadístico se realizó por ANOVA y test de Duncan. Las RT-PCR permitieron detectar los ARNm de las IL1 (α y β), IL-8 y TNF- α en todas las muestras evaluadas. La expresión de IL1- α fue significativamente mayor (p<0.05) a las 48 hs PI en las muestras tratadas con MRB en relación a todos los períodos evaluados independientemente del tratamiento recibido, mientras que la expresión de IL1- β fue significativamente mayor (p<0.05) en las muestras tratadas con MRB a las 24 hs con respecto a todas las muestras tratadas con placebo. Para IL-8 se halló una diferencia significativa mayor (p<0.05) a las 48 horas PI en las muestras tratadas con MRB con respecto a las tratadas con placebo. Aunque la expresión de la IL-8 fue menor a las 72 hs en relación a las muestras tratadas con MRB a las 48 hs, no se observaron diferencias significativas entre estos períodos. Para TNF- α no se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos evaluados. Podemos concluir que el MRB utilizado (*P. ginseng*) estimuló la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, lo que podría sugerir un efecto protector en la glándula mamaria bovina promoviendo la inmunidad inespecífica.

0228 (395) CELULAS T REGULATORIAS FOXP3+ DURANTE LA INFECCION DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO. INFLUENCIA SOBRE EVENTOS TEMPRANOS RELACIONADOS CON LA RESPUESTA AL SUPERANTIGENO. G

Cabrera ¹, J Mundiñano ¹, H Costa ¹, I Nepomnaschy ¹, I Piazzon ¹

¹ILEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina <galt132000@yahoo.com.ar>

El virus del tumor mamario murino (MMTV) es un retrovirus que se transmite durante la lactancia. En las placas de Peyer (PP), la presentación de un Superantígeno (Sag) viral por células dendríticas y B infectadas a células T portadoras de un receptor V β que reconoce el Sag es un evento crítico para la amplificación viral. Hemos demostrado que la infección induce en las PP incrementos tempranos en células T regulatorias (Treg) Foxp3+ específicas para el Sag. Además se mostró que la depleción de las células Treg con anticuerpo anti-CD25 antes del inicio de la infección (AI) determina mayores niveles de infección viral. El objetivo de este estudio fue analizar la influencia de las células Treg en diferentes eventos relacionados con la respuesta al Sag. Determinamos por FACS utilizando 5,6 ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína (CFSE) que la depleción de las células Treg AI ocasiona en las PP de ratones infectados incrementos de los niveles de proliferación de células T reactivas al Sag. No depletados (ND): 30,4 \pm 2,9; Depletados (D): 42,3 \pm 6,1 p<0,05 (media del % de células T V β 6+CFSE+ en proliferación \pm DS, n=4). No se observaron diferencias en la proliferación de células T no reactivas al Sag. Hemos demostrado que la respuesta al Sag causa un aumento en el porcentaje de células IgA+/B220+ en las PP. En los ratones infectados D se observó a los 4, 8 y 11 días de infección un aumento en el porcentaje de esas células y en el número de células IgA+B220+ con respecto a los ratones ND. Día 8: ND: 9,3 \pm 3,3; D: 21,3 \pm 3,1 p<0,05 (media del número de células IgA+B220+/PP (10⁻³) \pm DS, n=4). No se registraron diferencias en los ratones no infectados ND y D. En conjunto estos Resultados sugieren que al inicio de la infección las células Treg podrían estar atenuando eventos relacionados con la respuesta al Sag, la cual es crítica para la amplificación viral, influenciando de esta forma los niveles de infección del MMTV.

0229 (447) LAS CÉLULAS ESTROMALES DE GANGLIOS LINFÓIDES AUMENTAN LA SOBREVIDA IN VITRO DE LINFOCITOS T Y B. G L Camicia ¹, D Lorenzo ¹, N Badano ¹, A Magliocco ¹, N Siachoque ¹, G Cabrera ¹, I Piazzon ¹, I Nepomnaschy ¹

¹ILEX/CONICET, Academia Nacional de Medicina <gabrielacamicia@yahoo.com.ar>

Los ratones mutantes para catepsina L (nkt) presentan altos números de linfocitos en los ganglios linfoides (GL) que correlacionan con aumentos en los niveles de glicoproteínas de la matriz extracelular (ECM) (Lombardi y col, J Immunol. 174:7022, 2005). Con el objeto de investigar la influencia del estroma de los GL en las poblaciones linfocitarias, seleccionamos células estromales (CE) -principales productoras de ECM- por cultivo a largo plazo de células adherentes de GL de ratones nkt (CENkt) y wt (CEwt) (pasaje 11). La ausencia de marcadores de linaje endotelial, macrofágico y dendrítico (FACS), la morfología fibroblástica y la expresión de mRNA para gp38 (RT-PCR) sugieren la obtención de fibroblastos reticulares. Evaluamos la influencia de las CE en la supervida y proliferación linfocitaria *in vitro* cocultivando linfocitos de GL de ratones wt en presencia o ausencia de CE wt y nkt. Determinamos los porcentajes de apoptosis y proliferación por marcación con yoduro de propidio y análisis por FACS a 1, 2, 3 y 7 días de cocultivo. Aunque no se observaron diferencias en los porcentajes de proliferación, la presencia de CE disminuyó el porcentaje de apoptosis de células CD4+ y B220+, siendo mayor el efecto de las CENkt. Ej. día 2 (media % hipodiploidía \pm DS; n=3) células CD4+: CENkt: 0,19 \pm 0,02; CEwt: 2,42 \pm 0,7; sinCE: 13,3 \pm 1,5; CENkt vs sinCE y CEwt vs sinCE p<0,005; CENkt vs CEwt p<0,05. En células B220+: CENkt: 2,08 \pm 0,03; CEwt: 19,9 \pm 6,1; sin CE: 73,5 \pm 4,7; CENkt vs sinCE

$p < 0,005$; CEwt vs sinCE y CEwt vs CENkt $p < 0,05$. Ensayos de RT-PCR mostraron expresión de mRNA para IL-7 en las CE. El medio condicionado de CE disminuyó el porcentaje de apoptosis, aunque en menor proporción que las CE, siendo el efecto del medio condicionado de CENkt mayor que el del CEwt. Conclusión: las CE de GL incrementan la viabilidad de linfocitos TCD4+ y B220+ *in vitro*, efecto que estaría mediado en parte por factores solubles cuya síntesis y/o concentración estaría incrementada en las CENkt.

0230 (527) CELULAS T REGULATORIAS FOXP3+ DURANTE LA INFECCION DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO. RETRASO EN LA DELECCION CLONAL E INFLUENCIA SOBRE LAS CELULAS CD8+. G Cabrera¹, J Mundiñano¹, H Costa¹, I Nepomnaschy¹, I Piazzon¹

¹ILEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina <galt132000@yahoo.com.ar>

El virus del tumor mamario murino (MMTV) se transmite durante la lactancia. Hemos demostrado que la infección induce en las placas de peyer (PP) incrementos tempranos en células T regulatorias (Treg) Foxp3+ específicas para un Superantígeno (Sag) viral. Además, se mostró que cuando las células Treg son depletadas al día 6 de infección (DI), una vez que la respuesta inicial al Sag ha ocurrido, se observan menores niveles de carga viral. Nuestro objetivo fue extender el análisis de la población de células Treg hasta las 6 semanas de infección y evaluar la posible influencia de las mismas sobre las células CD8+, luego de la respuesta inicial al Sag. Desde la semana 2 de infección comienza la deleción de las células CD4+ reactivas al Sag. Se determinó por FACS que a las 3 y 6 semanas de infección el porcentaje de células Treg se encuentra aumentado dentro de las células T CD4+ reactivas al Sag, mientras que el porcentaje de células T no regulatorias se encuentra disminuido, tanto en PP como en bazo y ganglios. Ej. Semana 6, ganglio, células reactivas al Sag Foxp3+ /CD4+Vb6+: no infectados (NI): 11,4±0,7; infectados (I): 45,5±8,5. Células Foxp3- /CD4+Vb6+ NI: 88,6±1,1; I: 51,8±5,7 (media del % ±DS, n=4, $p < 0,05$). No se registraron diferencias en células T Foxp3+ o Foxp3- no reactivas al Sag. Por otra parte, en los ensayos realizando deplecciones DI se observaron aumentos en el porcentaje y número de células CD8+ en ganglio y bazo y se observó mayor expresión del marcador de activación CD44 en las células CD8+ de los ratones depletados. No se registraron diferencias entre los ratones no infectados depletados y no depletados. Estos Resultados muestran que la deleción de células Treg reactivas al Sag es menor o más lenta que la de las células T no regulatorias reactivas al Sag. Además, los experimentos de deplección sugieren que el efecto observado de las células Treg sobre los niveles de infección podrían incluir influencias de estas células sobre la respuesta CD8+ antiviral.

0231 (561) SIMULTANEIDAD EN LOS EFECTOS DE ANFETAMINA SOBRE EL SISTEMA INMUNE Y LOS NIVELES DE MET-ENCEFALINA EN ÁREAS LÍMBICAS Y BAZO: PARTICIPACIÓN DE LA VÍA MESOCORTICO-LÍMBICA. M A Assis¹, A Valdomero¹, C Hansen¹, L Cancela¹

¹IFEC-CONICET, Fac. de Ciencias Químicas, UNC <amparo@fcq.unc.edu.ar>

Existe evidencia de que la administración de psicoestimulantes compromete la función inmune aumentando la vulnerabilidad a una amplia variedad de enfermedades. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que tratamientos agudos y crónicos con anfetamina (ANF) resultan en una disminución dosis-dependiente de la respuesta linfoproliferativa, concomitantemente con un incremento en los niveles de met-enkefalina (met-ENC) en el sistema inmune (bazo y timo) y en el sistema nervioso central (núcleo accumbens y corteza prefrontal (CPf)). El objetivo del pre-

sente estudio fue determinar la participación de mecanismos dopaminérgicos centrales en el fenómeno de inmunosupresión inducido por ANF y en los niveles de met-enkefalina en bazo y CPf mediante lesión selectiva de las terminales dopaminérgicas mesolímbicas. Ratas Wistar macho fueron inyectadas bilateralmente con 8 ug de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) en núcleo accumbens dos semanas previas a una exposición aguda a ANF (5mg/kg, IP). Cuatro días después de la inyección de ANF, se evaluó la respuesta linfoproliferativa mediante un cultivo de células de bazo estimuladas con ConA, así como los niveles de met-ENC en bazo y CPf por RIA. En los animales pre-tratados con 6-OHDA se obtuvo una reducción de los niveles de dopamina de un 51.4%, relativo al control. En los animales sham, ANF inhibió la respuesta proliferativa en un 73%, y aumentó la met-ENC esplénica (38%) y de CPf (34%), de acuerdo a los hallazgos previos ($p < 0,05$), mientras que la lesión con 6-OHDA revirtió el efecto de ANF sobre dichos parámetros. Estos Resultados señalan que la vía mesocorticolímbica central, además de su implicancia en el desarrollo de sensibilización conductual, participa en los efectos que ANF ejerce a nivel inmune (respuesta proliferativa y met-ENC esplénica) y central (met-ENC de CPf). Estas evidencias sustentan la relevancia de identificar mecanismos centrales en la acción que las drogas de abuso ejercen sobre el sistema inmune.

METABOLISMO Y NUTRICION 01

0232 (47) EXPOSICIÓN AGUDA A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL: CAMBIOS TEMPORALES EN EL METABOLISMO OXIDATIVO EN PULMÓN. N Magnani¹, T Marchini¹, D Tasat², S Álvarez¹, P Evelson¹

¹PRALIB-CONICET, Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín <nmagnani@ffyba.uba.ar>

Numerosos estudios sugieren que en los efectos adversos generados por la exposición a material particulado podrían estar involucrados procesos inflamatorios y estrés oxidativo. Por ello el objetivo de este trabajo fue evaluar la cinética del metabolismo oxidativo en pulmón de ratones Swiss hembra expuestos al material particulado. Se utilizó un modelo de exposición aguda a contaminantes particulados (ROFA) mediante instilación intranasal (0,20 mg/kg peso). Se evaluó el consumo de oxígeno en cortes de tejido, la producción de óxido nítrico (NO), el daño oxidativo a lípidos y proteínas a través del contenido de TBARS y carbonilos, la actividad de enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa y la capacidad antioxidante total (TRAP) en homogeneizados de pulmón. Las medidas se realizaron a una y tres horas luego de la instilación. La exposición a las partículas produjo aumentos significativos en el consumo de oxígeno de tejido del 77% luego de una hora y del 23% a las tres horas (control: 56 ± 2 ng-at O/min. g tejido, $p < 0,01$). En la producción de NO en homogeneizados se observó un aumento significativo a las 3 hs (control: $0,74 \pm 0,03$ nmol NO/min mg prot; ROFA 3 hs $1,1 \pm 0,1$ nmol NO/min mg prot; $p < 0,01$). El contenido de TBARS mostró un aumento respecto del control del 24% a una hora (control 249 ± 6 pmol/mg prot $p < 0,01$), mientras que un aumento del 26% en el contenido de carbonilos se observó a las 3 hs (control $2,3 \pm 0,1$ nmol/mg prot. $p < 0,01$). La actividad de SOD mostró un aumento significativo a las 3 hs (control $4,31 \pm 0,18$ USOD/mg prot; ROFA 3 hs $5,4 \pm 0,3$ USOD/mg prot; $p < 0,01$). La actividad de catalasa de ambos tiempos no presentó diferencias. Los valores de TRAP mostraron una disminución del 36% a las 3 horas (control: 15 ± 1 μ M Trolox/mg prot., $p < 0,01$). Los Resultados sugieren una ocurrencia de estrés oxidativo moderado que provoca un aumento en el metabolismo oxidativo que desencadenaría diferentes mecanismos moleculares de daño pulmonar.

0233 (63) ADENOSINA DEAMINASA, FRACCIONES DE COMPLEMENTO, TRANSFERRINA, CERULOPLASMINA Y TRANSTIRRETINA EN PLASMA DE NIÑOS CON FIBROSIS QUÍSTICA. ESTUDIO PRELIMINAR. P D Perris ¹, C Silva ¹, M S Felio ¹, N Slobodianik ¹

¹Cátedra de nutrición, facultad de farmacia y bioquímica, UBA <pperris@ffyb.uba.ar>

Introducción: La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por disfunción de las glándulas exócrinas. El páncreas se compromete produciendo una insuficiencia pancreática de tipo exocrina con la consiguiente eliminación de heces con una elevada cantidad de grasas y cuya consecuencia final es un serio cuadro de malnutrición. El estado nutricional es una variable determinante del pronóstico y sobrevida del paciente. **Objetivo:** Evaluar indicadores bioquímicos relacionados con el estado nutricional y los mecanismos de defensa en un grupo de niños con FQ asistidos por el equipo del Servicio de Nutrición y Diabetes del Hospital Pedro de Elizalde. **Material y Metodologías:** Se evaluaron 17 niños, de ambos sexos entre 2 meses y 9 años. Se extrajo sangre en ayunas, en el plasma se determinó la actividad de Adenosina deaminasa (ADA) (UI/L) - enzima relacionada con los linfocitos T-, por método de Giusti y Galante y fracciones proteicas (mg/dl) - fracciones de complemento C3 y C4, Transferrina(Trans), Ceruloplasmina (Cerulo) y Transtirretina (TTR)- por inmunodifusión radial cuantitativa sobre placas (Diffuplate, Biocientífica SA). Los Resultados fueron expresados como X_± DE y comparados con sus respectivos controles (C) de igual rango etareo, aplicando el test de Student. Resultados :

Grupo	ADA	C3c	C4c	TRANS	CERULO	TTR
FQ	33.6±15.0*	88.0±37.1*	19.0±9.8*	198.1±53.2*	49.2±18.5*	17.4±7.4*
C	23.0±5.6	126.3±45.5	27.5±7.7	289.0±20.0	25.1±5.9	22.0±6.6

*(p<math><0.001</math>)

Se observó un aumento significativo en la actividad de ADA y en la concentración de ceruloplasmina con disminución estadísticamente significativa en la concentración de C3c, C4c, transferrina y transtirretina. **Conclusiones:** Estos Resultados preliminares sugieren que el estado nutricional y los mecanismos de defensa de estos niños se encuentran comprometidos. Por otra parte, sería útil incluir estas determinaciones en el control periódico de los pacientes que sufren fibrosis quística. ⁵Parcialmente financiado por UBA (B074).

0234 (201) ACTIVIDAD DE LIPOPROTEINA LIPASA EN INSULINO-RESISTENCIA. V J Miksztołowicz ¹, V Zago ¹, D Lucero ¹, L Cacciagiú ¹, E Macri ², A Basilio ², R Wikinski ¹, S Friedman ², L Schreier ¹, G Berg ¹

¹LAB. DE LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS. DPTO BIOQ. CLÍNICA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. INFIBIOC-UBA; ²CATEDRA DE BIOQUÍMICA GRAL. YBUICAL. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA-UBA <veronica_mik80@hotmail.com>

La lipoproteína lipasa (LPL) es una enzima localizada principalmente en tejidos adiposo (TA) y muscular cuya síntesis es estimulada por insulina. Su actividad en situaciones de hiperinsulinemia/insulino-resistencia (IR) aún es controvertida. **Objetivo:** Evaluar actividad de LPL de TA en un modelo de IR. Ratas macho Wistar recibieron durante 12 sem dieta estándar, subdivididas en 2 grupos, control (C n=6) y DRS (n=6) al cual se le suministró sacarosa 30% en agua. No hubo diferencia en el consumo calórico (C:23,6±5,4 y DRS:24,1±6,9 Kcal/100g/día) ni en aumento de peso (C:277±32 y DRS:300±38 g). En sangre se determinaron parámetros metabólicos y se aisló VLDL. Se determinó contenido de grasa corporal (DXA), se removió y pesó TA visceral (epididimal, perirrenal e intestinal) y se midió actividad lipolítica en extractos heparínicos de TA incubados con sustrato

de [³H]trioleína. DRS presentó aumento de insulina: 29±1,2 vs C:0,92±0,85 ng/ml p<math><0,001</math> manteniendo glucemias sin diferencias, aumento de triglicéridos (TG) séricos: 86±19 vs 36±7 mg/dl $p=0,001$. Ácidos grasos libres fueron mayores en DRS:0,7±0,1 que en C:0,4±0,1 mM p<math><0,001</math>. DRS mostró aumento de DXA:27,4±4,6 vs 18,9±5,4% p<math><0,01</math> y TA visceral 35,4±5,2 vs 17,8±13,8g p<math><0,001</math>, a pesar de la falta de diferencia del peso total. TG-VLDL fue mayor en DRS (51,5 ±17,5 vs 14,9±4,3% p<math><0,001</math>). La actividad LPL/g TA fue semejante en DRS:12,5±3,1 y C 11,9±4,8 mU/g $p=ns$. Sin embargo, expresada por masa total de TA visceral en DRS fue mayor 453±223 vs C:209±90 mU $p=0,04$. Ambas expresiones de la actividad de la enzima no correlacionaron con TG-VLDL. LPL/g TA mostró correlación con DXA $r=0,68$ p<math><0,03</math> y una tendencia con TA visceral $r=0,53$ $p=0,08$. El aumento de LPL/masa TA visceral obedece a la acumulación de grasa característica de IR. El incremento de TG-VLDL en DRS se adjudicaría a sobreproducción y no a un defecto en la lipólisis. La correlación con grasa corporal y visceral sugiere que LPL favorecería el depósito de TA.

0235 (212) ROL DE LA GLUCOQUINASA Y PPAR GAMMA EN LA DISFUNCIÓN DE LA CÉLULA BETA PANCREÁTICA DE RATAS DISLIPÉMICAS INSULINO RESISTENTES. EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS N-3. M D R Ferreira Cordoneda ¹, A Chicco ¹, Y Lombardo ¹

¹Cát. Química Biológica - FBCB - UNLitoral <mferreira@fbc.unl.edu.ar>

Dislipemia, Resistencia insulínica (RI) y alterada secreción de la insulina frente a distintos secretagogos son alteraciones comunes en ratas alimentadas crónicamente con dieta rica en sacarosa (DRS). En estos animales se observa un incremento del contenido de triglicéridos (Tg) y disminuida oxidación de la glucosa en la célula β pancreática, probablemente como consecuencia de la lipotoxicidad. Profundizando en estos mecanismos el objetivo del presente trabajo fue estudiar en islotes aislados de ratas con DRS:a) otros mecanismos que podrían contribuir a la glucolipototoxicidad y disfunción de la célula β . Para tal fin analizamos la actividad de las enzimas fosforilantes de la glucosa (glucoquinasa -GK- y hexoquinasa -HK) y la masa proteica de PPAR α . b) evaluar la acción de los ácidos grasos n-3 sobre los parámetros antes mencionados. A tal efecto se utilizaron ratas macho Wistar alimentadas por 6 meses con DRS (62,5% sacarosa; 8% aceite de maíz - AM -). Luego la mitad de los animales continuó con DRS y en la otra mitad se substituyó la fuente de grasa dietaria (AM 8% por aceite de hígado de bacalao - AHB - 7% + AM 1%)(DRS + AHB) hasta 8 meses de ingesta.Ratas controles recibieron dieta control (DC) durante 8 meses.La dieta con AHB normaliza la dislipemia y la RI de las ratas con DRS, sin modificaciones en la insulinemia.Comparando con el lote DC la actividad GK disminuye significativamente en la DRS (p<math><0,05</math>) mientras incrementa significativamente (p<math><0,05</math>) la masa proteica de PPAR α . La administración de AHB a la DRS normaliza la masa proteica de PPAR α y mejora la actividad GK . La menor actividad de la enzima fosforilante, el incremento de PPAR α y la disminuida oxidación de la glucosa estarían involucradas en mecanismos responsables de la glucolipototoxicidad. La administración de AHB que normaliza los niveles plasmáticos de Tg, AGNE y glucosa, revierte estas alteraciones.

0236 (495) ACTIVIDAD DE LIPASA HEPÁTICA EN MUJERES PRE Y POSTMENOPÁUSICAS HEMODIALIZADAS. A J González ¹, G Berg ¹, A Elbert ², G López ¹, M L Muzzio ¹, V Miksztołowicz ¹, F Basilio ³, L Schreier ¹, R Wikinski ¹

¹Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas. Depto de Bioquímica Clínica. Fac Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-UBA; ²Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial; ³División Tocoginecología, Hospital Durand, Buenos Aires <anagonz@ffyb.uba.ar>

Previamente demostramos que mujeres postmenopáusicas (MP) aparentemente sanas presentan elevada actividad de lipasa hepática (LH), asociado con un perfil lipoproteico aterogénico comparado con mujeres premenopáusicas (MPre). Por otro lado, en pacientes con enfermedad renal crónica hemodializados (HD) encontramos baja actividad enzimática. **Objetivo:** Evaluar LH en MP y MPre-HD y su efecto sobre el perfil lipoproteico en comparación con MP y MPre controles (C). Se estudiaron 22 MP-HD (edad: 52-69 años) y 22 MP-C (53-64 años), ninguna sometida a terapia hormonal sustitutiva; 22 MPre-HD (25-46 años) y 22 MPre-C (26-33 años). En todas ellas se determinó LH en plasma postheparínico (60 U/kg) y el perfil lipídico-lipoproteico. Se estableció el cociente TG/col-HDL como indicador de insulino-resistencia. Los Resultados se evaluaron por ANOVA/Tukey: LH fue menor en MP-HD en relación con MP-C: 7.58 ± 1.05 vs 14.71 ± 1.12 μ moles AG/ml PPH.h $p < 0,01$, sin diferencias con respecto a MPre-HD (7.19 ± 0.83). En cambio LH en MP-C fue mayor que MPre-C (9.63 ± 0.82), $p < 0,05$. TG fue semejante entre MP-HD, MPre-HD y MP-C, pero mayor vs MPre-C $p < 0,05$. Col-total, col-HDL, col-LDL y col no-HDL fueron menores en MP-HD (189 ± 7.5 ; 43 ± 2.0 ; 102 ± 7.2 y 146 ± 8.0 mg/dl) que en MP-C (241 ± 9.2 ; 60 ± 3.5 ; 157 ± 7.9 y 182 ± 8.7 respectivamente $p < 0,05$), mientras que col-VLDL fue mayor en MP-HD: 44 ± 4.13 mg/dl vs MP-C 25 ± 3.23 $p < 0,05$. TG/col-HDL también fue mayor en MP-HD que en MP-C: 4.49 ± 0.59 vs 2.74 ± 0.43 , $p < 0,05$. En ninguno de los parámetros se observó diferencias entre MP-HD y MPre-HD. En cambio entre MP-C y MPre-C existieron las diferencias conocidas, dando cuenta de un perfil más aterogénico en las primeras. Conclusiones: Mujeres HD presentaron mayor insulino-resistencia pero LH fue baja, tanto en pre como post menopáusicas. La enfermedad renal crónica impediría la regulación hormonal de la enzima y la hemodiálisis, por su parte, depletaría los depósitos de LH por la heparina administrada durante el tratamiento.

0237 (571) EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN CORPORAL EN ESCOLARES: CONCORDANCIA ENTRE METODOLOGÍAS DE BIOIMPEDANCIA ELÉCTRICA Y ANTROPOMÉTRICAS. S. M Vidueiros ¹, G Tarducci ², G Morea ², A Bardach ², A Paganini ², G Dimarco ², B Aquino ², S Calbe ², A Pallaro ¹

¹Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²PROPIA-Universidad Nacional de La Plata simavidu@ffy.uba.ar

La bioimpedancia eléctrica (BIA) un método propuesto por su simplicidad, rapidez y sin error de examinador para evaluar composición corporal. **Objetivo:** analizar la concordancia entre Metodologías para estimar grasa corporal: BIA y medición de pliegues cutáneos. Se estudiaron 145 niños argentinos de ambos sexos (6-9 años). Se midieron peso, talla y pliegues bicipital, tricipital, subescapular y supraíliaco por un antropometrista. El porcentaje de masa grasa (%MG) por pliegues cutáneos se calculó por la ecuación de Deurenberg (PC Deurenberg). Se midió impedancia a 200 omhs y se calculó la masa magra (MM) por 7 ecuaciones: Deurenberg A y B, Schaeffer, Rush y Schoeller A, B y C; a partir de MM y el peso se obtuvo el %MG por BIA. Análisis estadístico: Test de "t", ANOVA, correlación y concordancia por Bland & Altman. Resultados:

	% MG (% \pm DE)	Coefficiente de correlación r	Diferencia promedio % (MG % \pm 2DE)
PC Deurenberg	23,30 \pm 4,60		
Deurenberg (A)	23,51 \pm 4,47	0,62	0,21 \pm 7,88
Deurenberg (B)	20,68 \pm 5,35 *	0,81	-2,62 \pm 6,27
Schaeffer	23,99 \pm 9,02	0,64	0,69 \pm 14,11
Rush	17,83 \pm 7,17 *	0,54	-5,47 \pm 12,21
Schoeller (A)	20,91 \pm 9,70 *	0,51	-2,39 \pm 16,71
Schoeller (B)	20,67 \pm 8,03 *	0,52	-2,63 \pm 13,72
Schoeller (C)	25,66 \pm 8,57 *	0,25	2,63 \pm 17,31

* Diferencia significativa respecto a PC $p < 0,01$ Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los % MG por las diferentes ecuaciones de BIA ($p < 0,01$). No se observó buena co-

relación entre BIA por las distintas ecuaciones y PC. El nivel de concordancia fue variable. Conclusiones: Las discrepancias entre los valores hallados por las diferentes ecuaciones de BIA indicarían que su uso puede no ser adecuado para la población escolar estudiada. Los autores sugieren desarrollar ecuaciones validadas frente a Metodologías de referencia que se ajusten a nuestra población. Financiado por UBACYT B098

0238 (438) NIVELES DE IGA TOTAL EN FLUIDO INTESTINAL Y SALIVA: EFECTO DE LA CALIDAD PROTEICA. S. M Vidueiros ¹, I Fernandez ¹, M E Roux ², A Pallaro ¹

¹Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires <simavidu@ffy.uba.ar>

La IgA en secreciones es considerada un parámetro inmunológico de utilidad en los estudios de valoración del estado nutricional. En estudios previos, se observó disminución en las poblaciones de linfocitos B IgA+ y linfocitos T totales CD5+ y subpoblaciones T en la vellosidad intestinal de ratas alimentadas con una dieta a base de proteína de maíz. **Objetivo:** determinar niveles de IgA total en fluidos intestinales y saliva de ratas en crecimiento alimentadas con dietas de diferente concentración y calidad proteica. Ratas Wistar fueron alimentadas desde el destete y durante 18 días con dieta al 6.5% de proteína de maíz (M). Como control de calidad proteica, un lote recibió dieta al 6.5 % de caseína (Cas). El grupo control de igual edad recibió caseína al 20 % (C). Se recolectó la saliva estimulando su secreción con pilocarpina al 1%. Los intestinos fueron removidos y se recogieron los fluidos intestinales con solución fisiológica con inhibidores de proteasas (SIGMA). Los niveles de IgA total se determinaron por ELISA (BETHYL). El análisis estadístico se realizó mediante test de ANOVA. Resultados ($X \pm DS$, $n=6-7$ /grupo): Se observó diferencia significativa en los niveles de IgA total (mg/ml) de M con respecto a los controles tanto en los fluidos intestinales (M: 0.13 ± 0.08 vs Cas: 0.46 ± 0.08 ; C: 0.44 ± 0.2 , $p < 0,01$) como en la saliva (M: 0.002 ± 0.001 vs Cas: 0.011 ± 0.004 ; C: 0.014 ± 0.013 , $p < 0,05$). Los resultados indican que la dieta de baja calidad proteica afecta la concentración de IgA total tanto en el fluido intestinal como en la saliva; este hallazgo demostraría la alteración a nivel de la inmunidad de mucosas y sugeriría la importancia de la determinación de esta Ig secretoria en una muestra no invasiva, como la saliva, en los estudios nutricionales.

Financiado por UBACYT B098.

0239 (129) INTERACCIÓN VLDL-HDL Y SU EFECTO SOBRE EL ENDOTELIO. V. Zago ¹, S Goralczany ², L Cacciagiú ¹, C Taira ², R Wikinski ¹, L Schreier ¹

¹Laboratorio de lípidos y lipoproteínas-Depto de Bioquímica Clínica. Fac Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-UBA; ²Cátedra de Farmacología, INFIBIOC-FFyB-UBA <vzago@ffy.uba.ar>

La disfunción endotelial que produce la LDL es bien conocida. En estudios previos demostramos que VLDL atípicas, como las encontradas en la insulino-resistencia, producen disfunción endotelial a diferencia de VLDL normales. Si bien se conoce que HDL puede neutralizar la acción de LDL sobre el endotelio, no ha sido estudiado su papel con respecto a las VLDL. **Objetivo:** evaluar los cambios en la relajación del endotelio dependiente de VLDL en presencia de HDL. De pacientes donantes se aislaron VLDL humanas por ultracentrifugación de composición variable (colesterol/triglicéridos: 0,15-0,36). Se separó LDL (1020-1063 g/L) como control positivo. De un donante sano se aisló HDL ($d=1063-1210$ g/L) de composición normal, conservada con EDTA y utilizada en fresco. Se incubaron anillos aislados de aorta torácica de ratas hembras SD (200-250g) y se evaluó la relajación inducida por acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) en anillos pre-contráidos con noradrenalina (10^{-8} M), con VLDL en ausencia de HDL ($n=6$), VLDL en presencia de HDL ($n=6$) y HDL sola ($n=6$). Cada

ensayo se controló por incubación en ausencia de lipoproteínas. Se utilizó 0,15 mg/prot de cada lipoproteína incubada. Se determinó la relajación del endotelio y se calculó el % de inhibición de dicha relajación. El efecto observado de la interacción VLDL-HDL se compara con los % de inhibición de VLDL+HDL esperados. Tanto LDL, como VLDL o HDL inhibieron la relajación del endotelio, % inhibición: 34±12, 31±29 y 16±10, respectivamente, p=0,24. Cuando se realizó la incubación de VLDL con HDL (VLDL-HDL), en todos los experimentos se observó disminución del efecto inhibitorio sobre la relajación del endotelio en comparación con el efecto aditivo esperado: 46±30 vs 33±30, test-t pareado, p<0,02. La interacción de VLDL-HDL produjo un efecto favorable en la relajación endotelial. Se interpreta que HDL protegería al endotelio de la disfunción que pueden provocar las VLDL

METABOLISMO Y NUTRICION O2

0240 (27) RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DEL PÉPTIDO SIMILAR A GLUCAGON TIPO 1 (GLP1R) Y LA RESISTENCIA A LA INSULINA EN RATAS DE PESO ANORMAL AL NACER. A L Burgueño¹, J Carabelli¹, M L Schuman¹, N L Gonzales Mansilla¹, A L Alvarez¹, M S Landa¹, S I García¹, S Sookoian¹, C J Pirola¹

¹INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS <adriburgue@gmail.com>

El peso anormal al nacer predispone para morbimortalidad cardiovascular relacionada al síndrome metabólico o de insulino-resistencia. La infusión de GLP1 en ratones normales disminuye la ingesta de alimento, lo que no se observa en ratones *GLP1R*^{-/-}; que presentan la homeostasis de la glucosa alterada aún con peso corporal normal. Estudiamos la expresión de *GLP1R* (real time PCR) en ratas de 35 semanas, nacidas con bajo o alto peso al nacer (BP y AP) sometidas a dieta normal (DN) o grasa (40%, DG) durante 18 semanas. En este modelo, entre los machos con DN, los de AP presentaron un HOMA menor que los otros grupos. Al ingerir DG, los machos de peso anormal, aumentaron su HOMA respecto al mismo grupo de DN. Además, los de BP de DG tuvieron un HOMA mayor a los demás grupos de la misma dieta. Entre las hembras de DN, las de BP presentaron un HOMA menor y, al ingerir DG fueron las únicas que mostraron un aumento. Con respecto a *GLP1R*, encontramos que las hembras de AP aumentaron su expresión al recibir DG. En cambio en los machos, la ingesta de DG disminuyó la expresión en los BP y AP al compararlos con los NP o con los mismos grupos de DN.

Sexo	Peso al nacer	Dieta	HOMA	GLP1R	N
HEMBRAS	BP	N	4,65 ± 3,02 ^(#)	0,097 ± 0,071	4
		G	14,83 ± 3,90 ^(*)	0,071 ± 0,034	4
	NP	N	9,04 ± 2,55 ^(#)	0,028 ± 0,011	6
		G	11,90 ± 2,76	0,059 ± 0,007	5
	AP	N	9,56 ± 2,71	0,017 ± 0,009	4
		G	15,62 ± 2,71	0,150 ± 0,055 ^(*)	4
MACHOS	BP	N	20,83 ± 3,02 ^(#)	0,379 ± 0,145	5
		G	33,49 ± 3,90 ^(#&*)	0,020 ± 0,011 ^(*,#)	4
	NP	N	17,70 ± 3,02	0,415 ± 0,075	5
		G	18,29 ± 2,33	0,280 ± 0,062	6
	AP	N	9,89 ± 2,76 ^(#)	0,160 ± 0,083 ^(#)	6
		G	19,32 ± 2,55 ^(*)	0,014 ± 0,009 ^(*,#)	6

* p<0.05 vs mismo peso DN, & vs NP misma dieta y # vs AP misma dieta. La ingesta de DG en los machos de peso anormal ayudaría a desenmascarar una leve insulino resistencia que se acompaña de una caída de la expresión de *GLP1R*; mientras que el aumento en la expresión de *GLP1R* entre las hembras de DG podría explicar por qué éstas no presentaron alteraciones en el índice HOMA.

0241 (92) EFECTO ESTROGENOMÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE FRUTOS DE PROSOPIS TORQUATA..

M Carrasco¹, A Salinas², A Mangione^{2,3}, E Gil²

¹UNSL; ²Universidad Nacional de San Luis; ³IMIBIO-CONICET <mcarras@unsl.edu.ar>

Los fitoestrógenos son compuestos naturales encontrados en distintos órganos de plantas que producen respuestas estrogénicas. Al estudiar la actividad biológica de compuestos del fruto de *Prosopis torquata*, hemos demostrado que los mismos, administrados en la ingesta de ratas Wistar hembras prepúberes, presentan una tendencia funcional uterotrófica. El objetivo del presente trabajo fue investigar la acción fitoestrogenomímica del extracto metanólico del fruto sobre la funcionalidad reproductiva de ratas hembras. El mismo fue administrado subcutáneamente en la etapa neonatal. Se utilizaron cuatro grupos de 5 ó 7 animales cada uno. A tres grupos alimentados con dieta libre de soja se les administró subcutáneamente durante 5 días y a partir del 3° día de edad, en total, 1 mg de Estradiol (Grupo E), 3 mg de Extracto metanólico (Grupo ExM) y vehículo (aceite de sésamo + DMSO) (Grupo C). Al 4° grupo alimentado con dieta suplementada con soja, se le administró vehículo (Grupo S). Los animales fueron sacrificados al momento de la Apertura Vaginal (AV). Se extrajeron los ovarios para determinar presencia y ausencia de Folículos (F) y Cuerpos Lúteos (CL). Se observó que el Grupo ExM presentó una AV significativamente temprana comparada con la AV del grupo C (36.4 ± 0.979 vs 53.28 ± 3.455 p<0.001) y no se observaron diferencias significativas con la AV del grupo S (36.66 ± 0.4216). La AV de los grupos ExM, C y S fueron significativamente diferentes al grupo E (30.2 ± 0.96). El corte histológico del ovario de Grupo E se caracterizó por la presencia en la corteza de F en la última etapa del desarrollo y ausencia de CL, en el Grupo ExM se observa CL de gran tamaño y ausencia de F muy diferente del Grupo S que presenta distintas poblaciones de F y pocos y pequeños CL. El extracto metanólico presentaría principios activos con actividad estrogénomimica que producirían una AV temprana y una alta secreción de LH como lo demuestra la presencia de CL.

0242 (591) INDICADORES DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON OBESIDAD ABDOMINAL. L A Gómez Rosso^{1,2}, T Meroño¹, G Giunta², L Marziali², L Boero¹, L Schreier¹, L Cuniberti², F Brites¹

¹Dpto. Bioquímica Clínica, Fac. Fcia. y Bioq., INFIBIOC, CONICET, UBA; ²Universidad Favaloro. <leonardogomezrosso@hotmail.com>

La obesidad abdominal (OA) es considerada una importante factor de riesgo para diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar bioindicadores de inflamación, disfunción endotelial y aterosclerosis, así como marcadores de resistencia insulínica (RI) en sujetos con valores variables de circunferencia de cintura (CC). De un total de 100 hombres que se sometieron a un chequeo de rutina, se seleccionaron 87 sin antecedentes cardiovasculares, diabetes, alteración tiroidea, nefropatía, hepatopatía o tratamiento hipolipemiente. La población fue dividida en 4 grupos de acuerdo a los cuartiles de CC: 1) <90cm; 2) 90-98cm; 3) 99-103cm; y 4) >103cm. Se evaluaron peso, altura, niveles de glucosa, triglicéridos (TG), colesterol (C) total, C-HDL, C-LDL, apo A-1 y apo B (métodos estandarizados), insulina (MEIA) y adiponectina (ELISA). Se analizó la composición química de HDL (ultracentrifugación) y la actividad de la proteína transportadora de C esterificado (CETP; radiométrico). Se midió la concentración de moléculas de adhesión endoteliales (VCAM-1, ICAM-1 y Selectina E; ELISA). Se calcularon los índices HOMA y QUICKI. Empleando el test de ANOVA/K. Wallis, se evidenció: a) aumento de insulina (p<0,0005), HOMA (p<0,0005) y TG-HDL (p<0,05) en 4 vs. 1, 2 y 3; b) incremento de TG (p<0,05) en 3 y 4 vs. 1; c)

valores mayores de CETP ($p < 0,05$) y VCAM-1 ($p < 0,01$) en 4 vs. 1 y 3; d) disminución de QUICKI ($p < 0,0005$) en 2, 3 y 4 vs. 1; y e) reducción de C-HDL ($p < 0,05$) en 4 vs. 1, 2 y 3. En los pacientes con mayor grado de OA, además del aumento de marcadores de RI, se observó un perfil lipoproteico más aterogénico, asociado a alteraciones cuali y cuantitativas de las lipoproteínas, mayor actividad de CETP y aumento de VCAM-1, responsable de la interacción entre los leucocitos circulantes y el endotelio. Las alteraciones descriptas confirmarían un estado proinflamatorio y proaterogénico asociado a la OA.

0243 (143) EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIETILÉNICOS N-3 SOBRE EL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS NO SATURADOS Y LA DISLIPIDEMIA EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN SACAROSA. G J Hein¹, A Chicco¹, Y Lombardo¹, R R Brenner², M Montanaro², A Bernasconi², M Pellón Maison², G Finarelli²

¹Cat. Química Biológica - FBCB - UNLitoral; ²INIBIOLP, (CONICET-UNLP), Facultad de Ciencias Médicas, La Plata <ghein@fbc.unl.edu.ar>

Una dieta rica en sacarosa (SRD) comparada con una de almidón induce a lo largo del tiempo desórdenes metabólicos y resistencia a la insulina similares al síndrome metabólico y aquellos encontrados en la diabetes tipo 2. Se produce hipertrigliceridemia y a los ocho meses evoluciona hacia una normoinsulinemia. Usando ese modelo de rata se estudió como el cambio del 8% de aceite de maíz por 1% de ese aceite más 7% de aceite de hígado de bacalao modificaban los receptores nucleares LXR α , PPAR α , el SREBP-1c, la transcripción de los ARNm de las $\Delta 9$, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, su actividad enzimática y la composición ácida y especies moleculares de los lípidos hepáticos. La dieta SRD incrementaba los TG plasmáticos y hepáticos y, el tratamiento con ácidos grasos n-3 los disminuyó en ambos sitios. También disminuyó el contenido de ácidos grasos libres hepáticos incrementados por la dieta SRD. Los ARNm y las actividades de las desaturasas son normalmente incrementados por la SRD. El aceite de pescado deprimió la SCD-1 en ratas normales. Las variaciones en las composiciones de los ácidos grasos en el hígado sugieren poca intervención de las desaturasas, y la disminución del 20:4 n-6 y aumento de los polietilénicos n-3 hallado, es principalmente provocado directamente por aporte y competencia con los ácidos n-3 del aceite de pescado. Se discute la función de los LXR, PPAR α y SREBP-1c y efectos fisiológicos.

0244 (482) RESPUESTA DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE HEPÁTICO EN UN MODELO DE INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA POR ADMINISTRACIÓN DE DIETA RICA EN FRUCTOSA. F Francini¹, G Schinella², M C Castro¹, J J Gagliardino¹, M L Massa¹

¹CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada) CCT-CONICET-UNLP; ²Cátedra de Farmacología Básica, Facultad Ciencias Médicas UNLP, CIC <f_francini@yahoo.com>

Objetivo: Estudiar en un modelo de insulinorresistencia (IR) inducida por la administración de dieta rica en fructosa (DRF), los cambios generados en el sistema de defensa antioxidante hepático. **Metodologías:** Se alimentaron ratas Wistar 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), triglicéridemias (TG) (Kit comercial), insulinemias (In) (RIA) y HOMA-R (indicador de IR). En hígado se determinó 1) contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y glutatión reducido (GSH) (espectrofotometría), 2) niveles de ARNm (qPCR), expresión proteica (Western blot) y actividad (espectrofotometría) de superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) y 3) susceptibilidad microsomal a la peroxidación lipídica inducida mediante sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Resultados: (F vs. C): G 8.3 ± 0.2 vs. 7.2 ± 0.3 mM, $p < 0.005$; TG 1.3 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 mM, $p < 0.001$; In 4.7 ± 0.6 vs. 2.7 ± 0.5 ng/ml, $p < 0.02$; HOMA 43 ± 3 vs. 26 ± 2 $p < 0.001$; GSH

3.2 ± 0.26 vs. 4.2 ± 0.28 $\mu\text{mol/gr}$. tejido, $p < 0.05$, no registramos cambios significativos en los niveles de TBARS. La expresión génica de CAT, SOD y GPx fue: 43 ± 9 vs. $100 \pm 5\%$, $p < 0.001$; 28 ± 7 vs. $100 \pm 22\%$, $p < 0.01$; 51 ± 15 vs. $100 \pm 4\%$, $p < 0.01$; respectivamente. Los niveles proteicos de CAT, SOD y GPx: 79 ± 6 vs. $100 \pm 3\%$, $p < 0.02$; 70 ± 8 vs. $100 \pm 2\%$, $p < 0.003$; sin cambios para GPx. La actividad enzimática sólo mostró una disminución significativa en CAT (15%) ($p < 0.05$). No registramos diferencias significativas en la susceptibilidad a la peroxidación lipídica microsomal. Conclusiones: La disminución en la expresión génica de las enzimas antioxidantes, solo se manifestó en una disminución de la actividad de CAT y del contenido de GSH. Estos cambios inducidos por la DRF en el hígado no fueron suficientes para modificar la peroxidación de los lípidos de membrana.

0245 (214) MICROANGIOPATIA DIABÉTICA: ESTUDIOS HEMORREOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS. A Re Andrea¹, N Lebensohn¹, L Carrera², R Etchepare², J Valverde¹, M D'Arrigo¹, P Foresto¹

¹Lab. Inmunohem. y Hemorreol. Depto. Bioquímica Clínica. Fbioyf .UNR; ²Facultad de Medicina UNR <darrigomabel@yahoo.com.ar>

La microangiopatía diabética es una de las complicaciones más importantes en este tipo de pacientes, las cuales pueden padecer disturbios microcirculatorios a nivel cutáneo y otros territorios como la retina. Un incremento en la viscosidad sanguínea como consecuencia de la hiperagregación eritrocitaria en los segmentos postcapilares promueven un incremento de la presión capilar y el desarrollo de la microangiopatía con la aparición de lesiones cutáneas y oftalmológicas características de la diabetes. El objetivo de este trabajo fue evaluar parámetros bioquímicos, reológicos y clínicos en un grupo de pacientes diabéticos ($n=63$) y compararlo con un grupo control ($n=40$). Se realizó una detallada historia clínica, examen oftalmológico y dermatológico completo, estudios bioquímicos (glucemia, colesterol, triglicéridos, hemoglobina glicosilada) y reológicos (viscosidad sanguínea, plasmática, relativa, agregación eritrocitaria (ASP), deformabilidad eritrocitaria (Tk) y fibrinógeno). De los 63 pacientes diabéticos, 23 presentaron lesiones cutáneas atribuidas a las complicaciones microcirculatorias características de esta enfermedad. Se detectaron cuadros de dermatopatía diabética, retinopatía proliferativa y no proliferativa. Estos pacientes presentaron un perfil bioquímico y reológico (viscosidad de sangre entera, plasmática, relativa y Tk) con diferencias estadísticamente significativas respecto a los normales ($p < 0,05$); mientras que fibrinógeno y ASP mostraron discrepancias aun más marcadas ($p < 0,005$). Los estudios realizados posibilitarían definir un perfil microcirculatorio en pacientes diabéticos permitiendo la adopción de conductas terapéuticas susceptibles de prevenir daños irreversibles.

00246 (635) SÍNDROME DE CUSHING CON NORMOGLUCEMIA: EVALUACIÓN DE INDICADORES DE RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR. L Boero¹, M Manavela², P Maidana¹, N Elissondo¹, L Gómez Rosso¹, T Meroño¹, S Mallea Gil³, K Danilowicz², F Brites¹

¹Dpto. Bioquímica Clínica, Fac. Fcia. y Bioq., INFIBIOC, UBA; ²Servicio de Endocrinología, Htal. de Clínicas, UBA; ³Servicio de Neuroendocrinología, Htal. Militar <lauraboero@fibertel.com.ar>

En pacientes con Síndrome de Cushing (SC), se ha reportado dislipemia y alteraciones del metabolismo glucídico, siendo la mortalidad por enfermedad cardiovascular cuatro veces mayor. Sin embargo, la información sobre otros indicadores de inflamación y riesgo de enfermedad cardiovascular es escasa y controvertida. Nuestro objetivo fue evaluar marcadores de inflamación y factores de riesgo aterogénico en pacientes con SC normoglucémicos en comparación con controles sanos. Se estudiaron 13 pacientes con SC normoglucémicos y 13 controles pareados por sexo y edad (9 mujeres y 4 hombres). Se evaluaron el índice de masa

corporal (IMC), la circunferencia de cintura (CC), los niveles plasmáticos de cortisol (inmunoensayo quimioluminiscente), glucosa, triglicéridos (TG), colesterol (C) total, C-HDL, C-no-HDL, C-VLDL, C-LDL, apo A-I, apo B (métodos estandarizados), proteína C reactiva (PCR; inmunoturbidimetría ultrasensible) y VCAM-1 (ELISA). Se determinaron las actividades de proteína transportadora de C esterificado (CETP), acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH) (métodos radiométricos), arilesterasa (ARE) y paraoxonasa (PON) (métodos cinéticos). Los pacientes presentaron aumento de IMC (Media±DE) (28±6 vs. 23±3 kg/m²; p<0,05), CC (93±16 vs. 82±9 cm; p<0,05), cortisol (25±12 vs. 12±4 ug/dl; p<0,0001), TG (164±92 vs. 81±24 mg/dl), C-total (226±66 vs. 174±26 mg/dl), C-no HDL (171±68 vs. 121±24 mg/dl), C-VLDL (22±9 vs. 15±6 mg/dl), y apo B (108±43 vs. 77±18 mg/dl) (p<0,05). Al analizar los datos ajustando por IMC, sólo se mantuvo el incremento de los niveles de TG (p<0,05). Los pacientes con SC presentaron un perfil de lípidos y lipoproteínas más aterogénico, el cual, a excepción de los TG, podría estar relacionado con el incremento en el IMC. Por otro lado, no se detectaron modificaciones en los otros indicadores evaluados. Este hecho podría ser parcialmente atribuido a la condición de normogluceemia de los pacientes con SC incluidos en el presente estudio.

0247 (588) ALTERACIONES DEL METABOLISMO LIPOPROTEICO EN MUJERES CON ANEMIA FERROPÉNICA.. T Meroño ¹, P Sorroche ², L Casañas ², L Gómez Rosso ¹, L Boero ¹, J Arbelbide ³, F Brites ¹

¹Dpto. Bioquímica Clínica, Fac. Fcia. y Bioq., INFIBIOC, UBA; ²Lab. Central, Htal. Italiano; ³Servicio de Hematología, Htal. Italiano <tomasmoro@yahoo.com.ar>

La vida media y funcionalidad de los eritrocitos estaría afectada por su composición lipídica, la cual está alterada en la anemia ferropénica (AF). Se ha reportado que el eflujo de colesterol desde la membrana eritrocitaria hacia lipoproteínas circulantes y su trasporte hacia el hígado son influenciados no sólo por la concentración plasmática de lipoproteínas sino también por la actividad de la lecitina:colesterol aciltransferasa, la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) y la paraoxonasa, las cuales cumplen un papel crucial en la aterogénesis. El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el perfil de lípidos y lipoproteínas, y las actividades de CETP y paraoxonasa en pacientes con AF. Se estudiaron 17 mujeres con AF y 17 controles pareadas por sexo y edad. Se evaluaron: hemograma, ferremia, % de saturación de transferrina, ferritina, triglicéridos, colesterol (C) total, C-HDL, C-LDL, apo A-I, apo B (Metodologías estandarizadas), y las actividades de CETP (método radiométrico) y paraoxonasa (método cinético). Las pacientes con AF presentaron alteraciones características del hemograma, disminución de ferremia (Media±DE) (31±17 vs. 95±27 ug/dl; p<0,0001), % de saturación de transferrina (9±7 vs. 29±11 %; p<0,0001) y ferritina (15±23 vs. 42±27 ng/ml; p<0,0005) en comparación con los controles. Los niveles de C-HDL (49±11 vs. 65±19 mg/dl; p<0,05) y la actividad de paraoxonasa (127±21 vs. 148±37 umol/ml.min; p<0,05) estaban disminuidos, mientras que la actividad de CETP (250±70 vs. 202±71 %/ml.h; p<0,05) se hallaba aumentada en las pacientes. La actividad de CETP se asoció negativamente con hematocrito (r=-0,47; p<0,01), hemoglobina (r=-0,45; p<0,01) y ferremia (r=-0,51; p<0,01). La disminución de los niveles de C-HDL, de la actividad de paraoxonasa, enzima antioxidante ligada a HDL, y el aumento de CETP, responsable de modular la composición lipoproteica, observados en las mujeres con AF reflejarían un deterioro de los mecanismos antiaterogénicos.

METABOLISMO Y NUTRICION P1

0248 (45) DEPÓSITOS ELEVADOS DE HIERRO Y CAPACIDAD DE UNIÓN DE HIERRO NO SATURADA EN UN GRUPO DE VARONES DADORES DE SANGRE. RESULTADOS PRELIMINARES.. S H Langini ¹, M M Lardo ², C Carbia ³, M Pandolfo ⁴, S FLEISCHMAN ¹, A Lazarowski ², M E Rio ^{1 5}

¹Cátedra de Nutrición. -Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA); ²Sección Hematología. Depto Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA); ³Sección Hematología, Sección Química Clínica. Depto Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA); ⁴Sección Química Clínica. Depto Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA); ⁵CONICET <slangini@ffyb.uba.ar>

Se ha postulado que en personas sanas la "sobrenutrición con hierro" (Fe) aumentaría el riesgo de enfermedades crónicas. Para obtener información sobre los efectos de la adición de Fe a la harina de trigo (Ley 25630, 2002), durante 2005 (G05) y 2007 (G07) se tomaron muestras de varones sanos dadores de sangre^(a) (>18 años) cuyos valores máximos de ferritina sérica (FS) -706 y 1167 µg/L respectivamente-, justifican realizar estudios adicionales para detectar posible riesgo por sobrecarga. Por ello, se midió en suero (n=295) Fe sérico (Fe_s) por test colorimétrico (FerroZine) y capacidad de unión de Fe no saturada (UIBC) (Roche Diagnostics), en un autoanalizador Hitachi 917 (Roche). La saturación de transferrina (%ST) se obtuvo a partir de Fe_s y de la capacidad total de fijación de Fe (TIBC) obtenida por cálculo. Los individuos presentaban serología de rutina y Proteína C Reactiva negativas. La media±DS; rango, y % de casos con valores normales para los indicadores estudiados fueron:

Grupo	%ST	%ST (20-40)	UIBC (µg/dL)	UIBC 110-370 (µg/dL)	FS (µg/L) ^(b)
G05 (n=159)	34 ± 10.9 ^a ;	71%	213 ± 71;	95.6%	192±131 ^c ;
G07 (n= 136)	8.1-76.7		60-656		10.5-706
	31.8 ± 9.7 ^b ;	75%	217 ± 53;	98.5%	276±212 ^d ;
	11.1-59.1		85-370		53-1197

^ap=0.0356; ^bp<0.0001; ^c Langini y col. XVI Congreso. Argentino de Nutrición, 2007

No hubo correlación (P>0,05) entre FS vs ST o UIBC. Se encontraron, FS>300 µg/L con ST> 40% en 6.7% de los casos (G07), y en G05, 3.8% del cual 1.26% tuvo además UIBC<110 µg/dL. Si bien FS>300 µg/L puede indicar depósitos elevados, en ningún caso el Fe_s excedió la capacidad de fijación de la transferrina (UIBC negativo). No obstante, los casos con indicadores fuera del rango de referencia no permiten descartar el posible incremento del riesgo por consumo excesivo de Fe en el contexto de la dieta argentina habitual asociada a la fortificación con Fe de alcance masivo. Parcialmente financiado por CONICET (PIP 02306 y 5068) y ROCHE. ^(a)Serv. Hemoterapia. Htal Clínicas.J de San Martín (UBA)

0249 (110) LA METILACIÓN EN EL PROMOTOR DEL GEN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN MITOCONDRIAL A (TFAM) SE ASOCIA CON INSULINO RESISTENCIA EN ADOLESCENTES. C Gemma ¹, S Sookoian ¹, G Dieuzeide ², S I García ¹, T Fernández Gianotti ¹, C D González ³, C J Pirola ¹

¹INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MÉDICAS ALFREDO LANARI; ²CAIDEM, Chacabuco, Argentina.; ³Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA <biank10@yahoo.com>

La resistencia a insulina está asociada con disfunción mitocondrial y una disminución en el número de mitocondrias. Los procesos involucrados en la disfunción mitocondrial están sujetos a un fuerte control genético y epigenético. El factor de transcripción mitocondrial A (TFAM) es esencial para el mantenimiento del ADN mitocondrial (ADNmt) ya que regula directamente el número de copias, la iniciación de la transcripción y la replicación del ADNmt. En un estudio reciente, observamos que una disminución en el contenido de ADNmt en leucocitos estaba asociada con insulino resistencia (IR) en adolescentes. La posibilidad de que la metilación en el ADN sea variable entre individuos y pueda contribuir a la susceptibilidad de enfermedades complejas ha recibido atención ultimamente. Postulamos que la metilación en el promotor del gen TFAM podría estar asociada con las caracte-

rísticas clínicas, antropométricas y variables de laboratorio de IR en adolescentes. De un estudio poblacional de sección transversal se tomaron muestras de sangre de 175 adolescentes de un total de 934 estudiantes de escuela secundaria. La población fue dividida en dos grupos: con y sin IR. Se analizó el estado de metilación de tres CpGs en el gen TFAM en la posición -500, -443 y -434. Para esto, el ADN genómico leucocitario se trató con bisulfito de sodio, y luego se realizó una PCR metilación específica (MSP) para calcular la relación ADN metilado/ADN no metilado (Met/No met) mediante PCR en tiempo real. La relación Met/No met en el promotor de TFAM correlacionó inversamente con variables bioquímicas de IR (insulina plasmática R: -0.26, $p < 0.004$, índice HOMA R: -0.27, $p < 0.002$), y obesidad (R: -0.27, $p < 0.002$). Además la relación se asoció con IR como variable dicotómica (sin IR $n=45$, 0.014 ± 0.002 y con IR $n=77$, 0.011 ± 0.001 , $p < 0.016$). En conclusión, nuestros Resultados por primera vez sugieren un rol de la metilación en el promotor del gen TFAM en la patogénesis de la insulino resistencia en adolescentes.

0250 (123) INSULINO-RESISTENCIA Y ENFERMEDAD GRASA HEPÁTICA NO ALCOHÓLICA. RELACIÓN CON FACTORES CARDIOMETABÓLICOS. D M Lucero¹, V Zago¹, L Cacciagiú¹, M Graffigna², G I Lopez¹, G Berg¹, S Belli², C Estepo³, H Fainboim³, O Levalle², R Wikinski¹, L Schreier¹

¹LABORATORIO DE LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS-DEPTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA. FAC FARMACIA Y BIOQUÍMICA-INFIBIOC-UBA; ²División de Endocrinología, Hospital Durand; ³Unidad de Hepatología, Hospital Muñiz <diego_lucero81@hotmail.com>

La enfermedad grasa hepática no alcohólica (EHGNA) es una condición de creciente prevalencia asociada al síndrome metabólico (SM). La patogénesis de EHGNA no se encuentra aún dilucidada pero se reconoce su fuerte relación con la insulino-resistencia (IR) y componentes del SM. **Objetivo:** Evaluar la influencia del grado de IR en la prevalencia del hígado graso y factores cardiometabólicos asociados. Se estudiaron 185 pacientes con SM (según IDF) no diabéticos y se subdividieron por arriba (A) y por debajo (B) de la mediana del HOMA-IR (3,30). Se realizaron ecografías hepáticas por único observador para evaluar esteatosis como leve-moderada-severa. Se obtuvo suero en subgrupos de pacientes con 12 h de ayuno y se midió adiponectina (ELISA) y ácidos grasos libres (AGL), se aisló VLDL y se determinó su masa y composición química. La prevalencia de esteatosis severa fue mayor en el grupo A (68%) que en B (26 %) $p < 0,01$. En cambio, la ausencia de EHGNA fue mayor en B: 42 % vs 15 % $p < 0.0001$ (test Fisher). El riesgo relativo (RR) fue 3,4; IC:2,1-5,6. Las diferencias de indicadores de los componentes de SM y BMI entre grupos fueron más acentuadas en A $p < 0,01$. AGL y apo B-VLDL fueron mayores en A que en B: $0,67 \pm 0,32$ vs $0,50 \pm 0,16$ mM y $5,0 \pm 3,2$ vs $2,7 \pm 1,8$ mg% respectivamente, $p < 0,05$ y directamente asociados entre sí ($r = 0,36$ $p < 0,04$). Las características de VLDL fueron semejantes en ambos grupos, $p = 0,22$. Adiponectina presentó disminución significativa en A: $7,4 \pm 3,8$ vs $9,6 \pm 6,3$ $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,04$ y correlacionó inversamente con AGL ($r = -0,4$ $p < 0,03$) y con apo B-VLDL ($r = -0,5$ $p < 0,02$), aún después de ajustar por cintura ($\beta = -0,29$) y BMI ($\beta = -0,26$) $p < 0,03$. Los pacientes con IR más pronunciada presentaron un RR 3,4 veces mayor para desarrollar EHGNA severa. El mayor flujo de AGL al hígado promovería tanto la sobreproducción hepática de VLDL -indicado por el aumento de apoB-VLDL- como el depósito de triglicéridos en el hígado, a su vez favorecido por la menor concentración de adiponectina

0251 (141) EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN EL CEREBRO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA. S M Ferreira¹, C Reides¹, C Moranchel¹, F Lerner¹, S Llesuy¹

¹Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA <smferrer@ffyb.uba.ar>

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por atrofia en el nervio óptico y pérdida del campo visual.

Los mecanismos de daño propuestos incluyen excitotoxicidad y estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue evaluar el daño oxidativo en el cerebro en un modelo experimental de glaucoma. Se utilizaron ratas Wistar ($n = 12$) a las cuales a un grupo se les generó glaucoma por cauterización de dos venas episclerales del ojo izquierdo (grupo G), mientras que otro grupo se las sometió al mismo protocolo quirúrgico sin cauterización (grupo C). Las terminaciones se realizaron en homogeneizados de cerebro durante el séptimo día posterior a la cirugía. Los parámetros evaluados fueron: quimioluminiscencia espontánea (QL), proteínas oxidadas (PO) y las actividades de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT). Todos los parámetros se determinaron por técnicas espectrofotométricas a excepción de la QL. La QL para el grupo G fue 690 ± 41 cpm/ mg proteína (control 432 ± 29 cpm/ mg proteína * $p < 0,001$). Las PO para el grupo G fue $2,84 \pm 0,216$ nmoles/ mg de proteína (control $1,46 \pm 0,27$ nmoles/ mg de proteína * $p < 0,001$). La actividad de la SOD para el grupo G fue $3,98 \pm 0,43$ U/ mg proteína (control $2,51 \pm 0,28$ U/ mg proteína * $p < 0,05$). La actividad de la GPX en el grupo G fue $0,067 \pm 0,008$ U/ mg proteína.min (control $0,042 \pm 0,003$ U/ mg proteína.min * $p < 0,05$). La actividad de CAT no mostró cambios significativos. Estos Resultados sugieren que el daño oxidativo se observa como un aumento significativo de la oxidación tanto de lípidos como de proteínas. A su vez se encontraron incrementadas significativamente las defensas antioxidantes enzimáticas, probablemente como una respuesta adaptativa al aumento del daño oxidativo. En base a estos Resultados podríamos sugerir que el daño glaucomatoso se extiende no sólo a nivel del nervio óptico sino también en la zona del cerebro donde se encuentra el núcleo geniculado.

0252(186) EFECTO DE LA DESFERROXIAMINA, CIMETIDINA Y COLESTIRAMINA SOBRE EL DAÑO HEPÁTICO EN UN MODELO DE PROTOPORFIRIA INDUCIDA POR GRISEOFULVINA. M d C Martínez¹, S G Afonso², A M C Batlle²

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - UBA; ²Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET <mcmartin@qb.fcen.uba.ar>

La Protoporfirina Eritropoyética (PPE), enfermedad hereditaria asociada a una deficiencia de Ferroquelatasa (FeQ), causa 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 pacientes con PPE y disfunción hepática, se utilizan ácidos biliares (facilitan la excreción de PP), Desferroxamina (Dx) (quelante de hierro), Cimetidina (Cim) (inhibe la actividad de ALA sintetasa (ALA-S)) y Colestiramina (Col) (suprime la circulación enterohepática de porfirinas), que mejoran leve y temporalmente el cuadro clínico. En roedores la Griseofulvina (Gris) inhibe la FeQ con acumulación de hierro y PP produciendo manifestaciones hepáticas similares a las de PPE. Previamente demostramos que la administración de Gris a ratones aumenta la actividad de ALA-S y la PP en hígado, generando estrés oxidativo y daño hepático. El tratamiento con ácidos biliares aumentó la excreción de PP sin revertir el daño oxidativo. El objetivo fue evaluar el efecto de Dx (75mg/kg ip), Cim (72mg/ml agua de bebida) y Col (0.125/p/p en la comida) en ratones alimentados con Gris (0,5% p/p) sobre la biosíntesis del hemo, el sistema de defensa antioxidante y el daño hepático. En relación a los parámetros alterados por Gris, Cim y Col disminuyeron 33% y 60% ($p < 0,01$) la actividad de ALA-S; 255% ($p < 0,01$) y 36% ($p < 0,05$) la acumulación de PP hepática, respectivamente. La Cim, además, redujo 65% ($p < 0,01$) el glutatión reducido y aumentó las actividades de Glutathion Reductasa (20%, $p < 0,01$) y Superóxido Dismutasa (64%, $p < 0,01$). La Col también redujo los niveles de malondialdehído (44%, $p < 0,01$). La Dx aumentó 37% ($p < 0,01$) la actividad de Glutathion-S-transferasa. Los Resultados indicarían que si bien la reversión de las alteraciones en la biosíntesis del hemo mejora levemente el daño hepático producido por la Gris, ni el hierro ni la PP acumulada serían los únicos factores responsables del estado de estrés oxidativo.

0253 (210) EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE LA FUENTE PROTEICA (CASEÍNA POR SOJA) SOBRE LA ADIPOSIDAD VISCERAL EN RATAS DISLIPÉMICAS, INSULINO RESISTENTES (IR). M E G D'alessandro¹, D Selenscig¹, E Oliva¹, A Chicco¹

¹Dpto. Cs. Biológicas - FBCB - UNLitoral <medaless@fbc.unl.edu.ar>

La sustitución de proteína animal por proteína de soja dietaria reduce las concentraciones plasmáticas de Tg, LDL-col y colesterol total en humanos y animales. Por otra parte, en modelos animales de obesidad la ingesta de esta proteína limita o reduce la acumulación de grasa corporal y mejora la IR. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la sustitución de la fuente proteica sobre algunos aspectos del tejido adiposo (TA) (morfología, contenido de leptina) en ratas dislipémicas e IR por la administración crónica de dieta rica en sacarosa (DRS). Se utilizaron ratas machos Wistar agrupadas en dos lotes: Dieta Control (DC) % p/p: almidón 62.5 y DRS: sacarosa 62.5. Ambas dietas contenían caseína 18% como fuente proteica y se administraron por 4 meses. Luego el lote DRS se subdividió al azar en dos sublotos, uno continuó con la DRS y en el otro la caseína fue reemplazada por proteína de soja (DRS-S). Todos los lotes y sublotos continuaron con sus respectivas dietas hasta los 8 meses. Determinaciones: A) Plasmáticas: Tg, AGNE, glucosa, insulina y leptina. B) Análisis de la composición de la carcasa. C) TA: contenido de leptina, Tg, tamaño, número e histograma de distribución celular. Comparado con el grupo DRS la sustitución de caseína por proteína de soja normalizó los niveles de glucemia y la dislipemia. La reducida leptinemia en DRS incrementa en DRS-S. La proteína de soja redujo el peso de la carcasa y el contenido de grasa e incrementó el contenido de agua respecto a DRS, con valores semejantes al control. La hipertrofia celular y el alterado histograma de distribución celular observado en DRS mejoró significativamente en el grupo DRS-S. El contenido de leptina en TA fue mayor en DRS vs DC ($p < 0.05$). La sustitución con soja disminuye este parámetro sin normalizarlo ($p < 0.05$, DRS-S vs DRS). Los Resultados sugieren que la proteína de soja es capaz de disminuir la adiposidad visceral, mejorando la dislipemia y la homeostasis de la glucosa.

0254 (230) GLICOSILACIÓN NO ENZIMÁTICA DE LA PBGS: IN VIVO E IN VITRO. L Varela¹, L Oliveri¹, J P Rossi², A Batlle¹, E Gerez¹

¹Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas J. de San Martín; ²IQUIFIB - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA <sabina@qb.fcen.uba.ar>

La diabetes mellitus se caracteriza por la hiperglicemia la cual se asocia a las complicaciones de la enfermedad. La actividad de porfobilinógeno sintetasa (PBGS) disminuye en sangre de pacientes diabéticos respecto a los controles normales. La inactivación de la PBGS podría involucrar cambios en la expresión génica y/o alteraciones postraduccionales como la glicación no enzimática de la/s lisina/s cercanas al sitio activo de la enzima, o la oxidación de los residuos cisteína esenciales para la actividad. Para estudiar la causa de la disminución en la actividad de la PBGS se desarrolló un modelo murino de diabetes. Ratones machos adultos de la cepa CF1 fueron diabetizados con una única dosis de estreptozotocina (STZ) (170 mg/kg, ip) y divididos en dos grupos. El grupo STZ no recibió tratamiento adicional. El grupo STZ+I (I: insulina, 30 U/100 g, sc) recibió insulina durante 9 días antes del sacrificio. En el grupo STZ la actividad de la PBGS hepática era del 40% respecto al control (VC:12,33±1,06 U/mg; VSTZ:5,01±1,55 U/mg, $p < 0,05$). La expresión del ARNm y los niveles de proteína de la PBGS no estaban modificados. El tratamiento con insulina (grupo STZ+I) normalizó la glucemia y restauró la actividad de la enzima a los valores normales

(VC:12,33±1,06 U/mg, VSTZ+I: 10,72±1,37 U/mg). En una segunda etapa se evaluó la hipótesis de la pérdida de actividad por glicación no enzimática. Para ello, se realizaron ensayos *in vitro* con la enzima pura recombinante humana (PBGSh) la cual se incubó a diferentes tiempos con glucosa/BH₄Na (20 mM) y manitol/BH₄Na (20 mM). La reducción con BH₄Na estabiliza la formación de los aductos primarios de glicación de la enzima. Se observó una disminución mayor al 50% en la actividad del PBGS a partir de la hora de incubación en presencia de glucosa (VC:620,67±30,89 U/mg; VG: 269±26,87 U/mg, $p < 0,05$). Estos Resultados sugieren que la pérdida de actividad del PBGS observada *in vivo* sería debido a la glicación no enzimática.

0255 (241) EFECTO DE LA VITAMINA B12 SOBRE CULTIVOS DE EPIMASTIGOTES DE TRYPANOSOMA CRUZI. A B Ciccarelli¹, A Batlle¹, E Lombardo¹

¹Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP) - CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA <ciccarelli@qb.fcen.uba.ar>

Trypanosoma cruzi requiere de compuestos hémicos para su crecimiento, observándose que tanto la falta como acumulación de hemo son letales. En este trabajo evaluamos el efecto de un análogo del hemo, la vitamina B₁₂, sobre la captación de hemina y evolución de los cultivos. El modelo de captación utilizado emplea epimastigotes en fase exponencial tardía resuspendidos en buffer Na-PO₄ 50mM pH 7,4; a los que se adiciona ASB (para evitar inespecíficos) y hemina. Se mantiene el sistema viable durante 15 min, luego las células se separan centrifugando 1min a 10.000 xg y en el sobrenadante se cuantifica espectrofotométricamente (A_{400nm}) la hemina remanente. En ausencia de vit B₁₂, al medir la velocidad inicial de incorporación (v₀) en función de cantidades variables de hemina (0-61,35 μM) se observó una curva sigmoidea que indicaría la participación de receptores de membrana modulados en forma alostérica. El agregado de hemina (7,5-15 mg/l) tres horas antes de la cosecha, puso de manifiesto el efecto alostérico positivo de la misma. En presencia de vit B₁₂ se hizo evidente su interacción con la hemina mostrando un efecto dual, para concentraciones entre 15-25 μM y 45-60 μM se observó un efecto modulador positivo y negativo respectivamente. Cuando la vit B₁₂ (30,8-123,2 μM) fue agregada junto con la hemina (10 mg/l) al medio de cultivo, la tasa de crecimiento evaluada durante 7 días disminuyó significativamente hasta un 43-50% independientemente del día de crecimiento y una importante proporción de células (30-40%) perdió la movilidad (no la viabilidad). Para concentraciones de hemina de 0, 10 y 30 mg/l, el agregado de vit B₁₂ (123,2 μM) manifestó una superposición de los efectos de ambos compuestos, atenuando las alteraciones producidas por altas concentraciones de hemina. Concluimos que la vit B₁₂ es capaz de modular la captación de hemo y además ejercer un importante efecto citotóxico disminuyendo notoriamente tanto la proliferación como la movilidad de las células.

0256 (336) NIVELES DE MARCADORES ÓSEOS DEL TIPO CTX EN RELACIÓN CON LA INGESTA HABITUAL DE CALCIO EN NIÑOS ENTRE 6 Y 9 AÑOS DE EDAD. ESTUDIO PILOTO EN ESCOLARES. M E Rio^{1,2}, H C Dupraz¹, N M Piazza³, G G Pellegrini⁴, J Somoza⁴, S N Zeni^{2,4}

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica.UBA.; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); ³Dirección de Epidemiología. Municipio de Vicente López. Pcia. de Bs. As.; ⁴Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas J. de San Martín. UBA <merio@ffy.uba.ar>

Durante el crecimiento el hueso se encuentra en continuo modelamiento, cuya tasa de formación disminuye con la edad dando lugar al remodelamiento. Ambos se diferencian en que en el primero puede formarse nuevo tejido donde previamente no ha ocurrido resorción. Cuando el hueso es de reciente formación, el

teopeptido carboxilo terminal del colágeno tipo I (CTX) se encuentra en una estructura espacial denominada alfa; cuando el hueso envejece se produce una isomerización espontánea hacia la forma beta. Ambas pueden evaluarse en orina. En este trabajo se presenta información concerniente al efecto producido por la ingesta habitual de calcio (Ca) sobre los niveles de alfa y beta CTX, en muestras de orina basal, de 68 escolares sanos (6-9 años), concurrentes a escuelas públicas en el Municipio de V. López (GBA) Se recolectó la segunda orina de la mañana en ayunas en la que se evaluaron: α y β CTX ($\mu\text{g}/\text{mmol}$) (Nordic Bioscience. Denmark), Ca, por absorción atómica y creatinina según Jaffé. Los Resultados expresados como cociente en relación a la creatinina se analizaron por grado y en función del indicador Ca/Cr: <0,07, inadecuado; 0,07 a 0,15; adecuado y > 0,15, alto. La tabla muestra promedios \pm DS:

Marcador	α -CTX		β -CTX			
Ca/Cr	<0,07	0,15<0,07	>0,15	<0,07	0,07 a 0,15	>0,15
Grado						
1?	17,1 \pm 3,8	23,8 \pm 12,9	25,5 \pm 5,0	12,1 \pm 5,5	12,2 \pm 4,5	14,5 \pm 3,8
2?	16,5 \pm 4,3	15,9 \pm 5,0	s.d.	12,9 \pm 3,5	16,2 \pm 12,0	s.d.
3?	15,6 \pm 3,9	21,1 \pm 12,8	s.d.	12,2 \pm 1,7	14,0 \pm 4,1	sd
4?	19,8 \pm 8,2	13,9 \pm 3,0	13,4 \pm 4,3	13,8 \pm 4,1	13,3 \pm 3,5	13,3 \pm 11,9

Sin alcanzar diferencias sig., la tendencia de los niveles de α -CTX se modificó por edad (grado) e ingesta de Ca. Por el contrario, dentro del grupo etareo estudiado, ni la edad ni el Ca habitual afectaron al β -CTX. **Conclusiones.** Las diferencias entre ambos marcadores señalan al α -CTX como más promisorio para estudios de crecimiento y modelamiento óseo en niños que la forma beta. Financiación: UBACyT B/ 753 (US). Tesis doctoral del Bioquímico H. Dupraz.

0257 (358) UTILIDAD DE INDICADORES ANTROPOMETRICOS EN PACIENTES CON TUMORES DIGESTIVOS. L.A Corzo

¹2, P Andrenacci ¹2, A Gonzalez ¹, E Macri ³

¹Hospital Udaondo; ²Universidad Barceló; ³Universidad Barcelo <lauracorzo@hotmail.com>

La desnutrición (DNT) es frecuente en pacientes oncológicos y se asocia a un incremento de la morbi-mortalidad, especialmente si afecta el aparato digestivo. Existen controversias en cuanto a la elección del método ideal para establecer la DNT y la composición corporal en estos pacientes. El gold standard es la densitometría sin embargo, es difícil de realizar de rutina. La Bioimpedancia (BIA) constituye una buena alternativa pero no está disponible en todos los centros de atención. Las mediciones antropométricas, si bien, son fáciles y accesibles, aún no han sido validadas en pacientes enfermos. **Objetivos:** valorar el estado nutricional y determinar la utilidad de distintos índices antropométricos como estimadores de la composición corporal en pacientes con tumores digestivos. Se evaluaron 20 pacientes con diagnóstico tomográfico de tumor digestivo internados en clínica médica. En ayunas se determinaron BIA [Maltron BF 905, masa grasa (MG) y masa corporal libre de grasa (MCLG)], valoración global subjetiva (VGS) y antropometría [IMC índice de masa corporal (kg/m^2) y % de grasa IMC; pliegue tricípital (PT mm) y circunferencia media muscular del brazo (CMMB cm)]. Se consideró DNT: IMC =18,5; MG(BIA) =10% y =20%, CMMB =25,3 y =23,2 en hombres y mujeres respectivamente. Se determinó según Spearman la correlación MG vs % grasa IMC ó vs PT; CMMB vs MCLG. Resultados (media \pm DE): PT=12,6 \pm 7,3mm, CMMB=21,7 \pm 3,1cm, IMC=23,3 \pm 6,1 kg/m^2 , MCLG=71,7 \pm 15,6% y MG=23,9 \pm 12,6%. Se diagnosticaron como desnutridos el 85% de los pacientes según VGS y CMMB y el 20% según IMC y BIA. Tanto el % grasa estimado del IMC como el PT mostraron una correlación importante con MG según BIA (0,89,p<0,0001 y 0,8230,p<0,0001 respectivamente.) No se encontró asociación significativa entre CMMB y MCLG. Considerando BIA como referencia, VGS y CMMB sobrestimaron la DNT. Tanto el IMC como PT podrían utilizarse como Metodologías al-

ternativos aceptables para valorar la composición corporal en pacientes oncológicos.

0258 (506) COMPOSICION CORPORAL Y CONTENIDO DE LIPIDOS DE LA DIETA: ESTUDIO LONGITUDINAL EN RATAS A LO LARGO DE DOS GENERACIONES. C G Suarez ¹, A G Ferreira Monteiro ¹, P N Rodriguez ¹, G Ponce ², G Pelegrini ¹, S N Zeni ¹, S M Friedman ¹

¹Cat de Bioq Gral y Bucal Facultad de Odontología UBA;

²Bioquímica Clínica Univ Nacional San Juan Bosco <crissuarez007@yahoo.com.ar>

Objetivo: analizar el efecto del consumo crónico (2 generaciones) de dietas con diferente contenido de lípidos sobre la composición corporal. Al destete ratas Wistar hembra (n=30) se dividieron en 3 grupos, uno se sacrificó para obtener valores basales (Co); los restantes recibieron ad libitum y durante todo el periodo experimental, una de 2 dietas isocalóricas con un % de grasa de A=7 y B=15. A los 70 días de edad (M₁) se aparearon; sus crías se evaluaron al destete (C₁); a los 70 días (M₂) 20 de ellas se aparearon. Las crías (C₂) se analizaron al destete. El número de crías por hembra se mantuvo en 10. Se estudiaron peso (P,g), %grasa, %agua (%H₂O), contenido mineral total (CMO, DEXA Lunar DPX) en Co, C₁, C₂, M₁ y M₂. Resultados (Media \pm ES) Peso_g y %Grasa_g: C₂ > C₁ > C₀ (p<0,01); M₂ vs M₁ (p=0,05). Peso_A y %Grasa_A: C₂, C₁, C₀ (p=0,05); M₂ vs M₁ (p=0,05). El %H₂O y CMO no mostraron diferencias significativas; %Grasa_B aumentó significativamente a lo largo de los ciclos reproductivos en la progenie. Conclusión: el consumo crónico de dietas con contenido lipídico superior al requerimiento conlleva a un aumento progresivo en el depósito de grasa corporal al destete. UBACyT O 008.

0259 (626) INTERACCIÓN DEL PLOMO ADMINISTRADO CRÓNICAMENTE A DOSIS BAJAS CON METALES ESENCIALES. A E Piñeiro ¹, A H Sassone ¹, J A Navoni ¹, M Carretero ¹, O E Roses ¹, C M López ¹

¹Cátedra de Toxicología y Química Legal-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA <apineiro@fyb.uba.ar>

Previamente estudiamos los efectos a largo plazo del plomo (Pb) (1000 ppm) sobre la homeostasis de varios metales y observamos diferencias significativas con el selenio (Se) y el zinc (Zn). Como objetivo nos planteamos evaluar la interacción del Pb a concentraciones sanguíneas (PbS) de alrededor de 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$, punto de corte en el ámbito laboral, con el calcio (Ca), cobre (Cu), Se y Zn. Se utilizaron 60 ratas Wistar machos adultos de 264 \pm 40 g de peso inicial. Los animales fueron divididos en dos grupos experimentales: control (C) y tratados (T2, T4, T6). El grupo T recibió acetato de Pb (500 ppm de Pb) en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses. El grupo C recibió agua destilada. Se obtuvieron muestras de sangre entera y plasma que fueron conservados a -18 °C hasta su procesamiento. La cuantificación de los metales se realizó por absorción atómica. Se aplicaron los tests estadísticos de Student, ANOVA, Mann-Whitney y Welch. La PbS en el grupo T fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo C (p< de 0,0001). La concentración promedio fue 39,0 \pm 6,5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ vs 4,6 \pm 1,9 $\mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente. Respecto a C, las concentraciones de Ca (2 y 4 meses); Se y Zn (6 meses) disminuyeron (p<0,05). La comparación de las concentraciones de los metales a los diferentes tiempos de tratamiento arrojó diferencias significativas en los niveles de Ca y Se (2 meses vs 4 y 6 meses) (p<0,05). Los valores de Cu no variaron significativamente a lo largo del tratamiento. El Pb, aún a dosis bajas, afecta los niveles plasmáticos de Ca, Se y Zn. La disminución de Zn, disminuiría la síntesis de metalotioneínas, dejando al Pb en estado libre para que ejerza su toxicidad. La disminución del Se observada a los 6 meses indicaría que sus efectos protectivos antioxidantes disminuyen al aumentar el tiempo de exposición al metal. La disminución del Ca plasmático es atribuida a la competición con el Pb en el intestino sobre sitios de unión de proteínas que ligan el Ca.

METABOLISMO Y NUTRICION P2

0260 (133) LA INCUBACIÓN CON SOD, TIRÓN, O APOCININA RESTAURA LA RELAJACIÓN ENDOTELIO-DEPENDIENTE DISMINUIDA QUE PRESENTAN LAS RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA. C.F. Reyes Toso¹, M L Wallinger¹, A Witriw², M Vazquez², M Roson¹, L M Linares¹

¹Departamento de Fisiología Facultad de Medicina - UBA;

²ESCUELA DE NUTRICION FACULTAD DE MEDICINA UBA <creyestoso@intramed.net.ar>

Los anillos de aorta torácica extraídos de ratas Wistar machos (alimentadas con dietas con alto contenido de fructosa -FF-) presentan una relajación acetilcolina-dependiente (Ach-d) disminuida, que se intensifica al incubarse en un medio con alta concentración de glucosa. En estas condiciones se produce acumulación del anión superóxido. El objetivo de este trabajo consiste en analizar la participación del estrés oxidativo en la alteración de la respuesta vascular. Se evaluó la reactividad vascular en anillos de aorta incubados con glucosa o manitol -44 mmol/l- (para descartar el efecto del medio hiperosmolar), en presencia de superóxido dismutasa (SOD), Tiron o apocinina. 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 CIK (60 mmol/l); 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 las sustancias mencionadas. 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 FF presentaron un aumento de TBARS con respecto a los valores hallados en las ratas controles en plasma: 2.203 ± 0.14 vs 1.630 ± 0.07 micromoles/l ($P < 0.01$), hígado y corazón ($P < 0.01$). La relajación Ach-d disminuyó en las ratas FF (ANOVA factorial: $P < 0.01$) (EC50 (mol) 2.29×10^{-7} vs 8.83×10^{-8}), siendo este efecto revertido al incubarse con SOD, Tiron o apocinina (ANOVA factorial: $P < 0.001$). **Conclusión:** Estos Resultados demuestran que la presencia de antioxidantes, o la inhibición de la NADPH oxidasa, en el medio de incubación de anillos de ratas con FF restaura la relajación Ach-d, probablemente evitando la acumulación del anión superóxido y la formación de peroxinitritos.

0261 (222) DETERMINACION DEL PERFIL LIPÍDICO Y SU CORRELACIÓN CON LA MASA ÓSEA EN LA HIPERCOLESTEROLEMIA EXPERIMENTAL DE ORIGEN NUTRICIONAL. E V Macri¹, V Zago², C Gamba¹, C Ramos¹, M González Cháves¹, S Zeni¹, L Schreier², S Friedman¹

¹Cátedra de Bioquímica. Facultad de Odontología. UBA;

²Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.B.A. <vanesamacri@gmail.com>

En pacientes hipercolesterolémicos es frecuente la recomendación del consumo de alimentos con aceite de girasol alto oleico (AGAO, ù-9), aceite derivado del girasol convencional (AG, ù-6), desarrollado por la industria para disminuir el consumo de grasas trans. Pero el efecto de su uso sobre el perfil lipídico-lipoproteico y la masa ósea es incierto. Objetivos: Estudiar en ratas hipercolesterolémicas el efecto de dietas ricas en ù-9 y ù-6 sobre los lípidos séricos e investigar la relación entre el perfil lipídico y el contenido mineral óseo (CMO). Ratas Wistar macho (n=43) de 21±2d fueron asignadas aleatoriamente a grupo control (C) o 5 grupos experimentales (E: ù9, ù6, ù9+col, ù6+col y dieta aterogénica=DA). El estudio se dividió en 2 periodos (P₁, P₂) de 3 semanas c/u. C siempre recibió pellets. En P₁ todos los E recibieron DA (pellets+sales biliares+colesterina+manteca). En P₂, Eù9 y ù6 reemplazaron DA por AGAO o AG; Eù9+col y Eù6+col reemplazaron manteca por AGAO o AG; E DA continuó igual. Se

midieron en P₁: colesterol total (col-T) y en P₂: col-T, col HDL, noHDL y CMO total (DXA, Lunar DPX). Resultados [media ± DE, Mann-Whitney, test t pareado, correlación de Spearman]: en P₁, el col-T aumentó en los E con DA (E 240.4 ± 53.9 vs C 78.5 ± 15.2 mg/dL $p < 0.0001$). En P₂, col-T en ù9+col aumentó 54% vs P₁ ($p = 0.003$) y en ù6+col disminuyó 19% ($p = 0.034$). Col-noHDL disminuyó en los E sin DA. La correlación entre perfil lipídico y CMO en ratas hipercolesterolémicas (n=20) fue, r(p): -0.76 (0.0001); -0.75 (0.0002) y +0.46 (0.04) para Col-T, Col-noHDL y Col-HDL, respectivamente; y en normocolesterolémicas (n=23): -0.17 (ns); -0.58 (0.004) y +0.26 (ns) para Col-T, Col-noHDL y Col-HDL, respectivamente. La dieta rica en ù9 mostró un perfil más aterogénico cuestionando la utilidad de AGAO en pacientes hipercolesterolémicos. Además, las correlaciones revelan un efecto negativo del perfil lipídico aterogénico sobre la masa ósea. Estos Resultados sugieren un seguimiento del CMO en la hipercolesterolemia.

0262 (239) INHIBICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA CON UN EXTRACTO DE ROSMARINUS OFFICINALIS L. C. G. Reides¹, S Ferreira¹, A Carlucci², R Pasquali², C Bregni², S Llesuy¹

¹Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA; ²Cátedra de Farmacotecnia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA <creides@ffyba.uba.ar>

Los extractos de plantas han atraído el interés como fuentes naturales de antioxidantes. El *Rosmarinus officinalis* L. (RO) es conocido por sus propiedades antibacterianas, hipoglucemiantes y quimiopreventivas, las cuales podrían relacionarse con su capacidad antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante y el efecto sobre la peroxidación lipídica de un extracto glicólico de RO (EG). Se utilizó un EG de 15 mg de extracto seco/mL. Para evaluar la capacidad antioxidante del EG se utilizaron de cerebro e hígado de ratas Wistar de 250 ± 30 g. Las determinaciones de oxidación lipídica se realizaron con una técnica de quimioluminiscencia (QL) y para el hígado la peroxidación se indujo por el agregado de hidropéroxido de ter-butilo. La concentración de antioxidantes hidrosolubles se midió por medio de la capacidad antioxidante total (TRAP) y el ensayo de ABTS, mientras que para los antioxidantes liposolubles se efectuó el ensayo de DPPH. También se evaluaron los fenoles totales (FT) y los flavonoides totales (FLT). Todos los parámetros se determinaron por técnicas espectrofotométricas, a excepción del TRAP. La QL del cerebro mostró una inhibición del 50 % por el agregado de 0,26 mL del EG respecto del control (1938 ± 36 cpm/mg proteína) en tanto que para el ensayo de QL de hígado se observó una inhibición del 50% (control: 8960 ± 89 cpm/mg proteína) con 15 mL del EG. Los valores de la capacidad antioxidante total para el EG fueron: TRAP $0,88 \pm 0,02$ mmoles Trolox/g; DPPH $1,63 \pm 0,10$ mmoles ácido ascórbico/g y ABTS $1,40 \pm 0,04$ mmoles ácido ascórbico/g. La concentración de FT fue de 75 ± 9 mg ácido gálico/g y la de FLT de 54 ± 7 mg quercitina/g. Estos Resultados permiten sugerir que existe una inhibición de la peroxidación lipídica debido a la capacidad antioxidante del EG y que esta propiedad podría ser utilizada para la preparación de diferentes formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de patologías asociadas al estrés oxidativo.

0263 (250) TRATAMIENTOS MATERNOS CON AGONISTAS DE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES (PPARS) REGULAN LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y DE LIPOPERÓXIDOS EN LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA DE RATAS DIABÉTICAS. E Capobianco¹, N Martínez¹, M Sosa¹, A Jawerbaum¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO) <evacapobianco@yahoo.com.ar>

La 15deoxy-delta^{12,14}PGJ₂ (15dPGJ₂), agonista del receptor PPAR α , tiene importantes efectos anti-inflamatorios, y sus nive-

les están reducidos en la placenta diabética. En trabajos recientes, observamos que dietas ricas en ácidos grasos mono y poliinsaturados, agonistas de PPARs, incrementan sus niveles en placentas de ratas diabéticas. **Objetivo:** estudiar la capacidad de agonistas dietarios de PPARs de regular los niveles fetales de 15dPGJ₂, y de modular la producción de óxido nítrico (NO) y la peroxidación lipídica en el feto y la placenta de rata. **Metodologías:** Desde el día 0,5 de preñez, ratas controles (C) y diabéticas por administración neonatal de estreptozotocina (D) recibieron la dieta estándar suplementada o no con 6% de aceite de oliva (AO: contiene 75% de ácido oleico) o 6% de aceite de cártamo (AC: contiene 75% de ácido linoleico). En el día 13,5 de preñez los fetos y las placentas fueron explantados. Se dosaron los niveles de 15dPGJ₂ (EIA), los niveles de nitratos/nitritos (N/N, metabolitos estables del NO, reacción de Griess) y los lipoperóxidos (índice del estado oxidativo, reacción con el ácido tiobarbitúrico: TBARS). Resultados: En placentas y fetos C, los niveles de 15dPGJ₂, N/N y TBARS no se modificaron por las dietas suplementadas. En las placentas D, que presentan elevados niveles de N/N (p<0,001) y TBARS (p<0,05), las dietas AO y AC aumentaron los N/N (p<0,01), mientras que los niveles de TBARS fueron elevados por la dieta AO (p<0,001) y reducidos por la dieta AC (p<0,01). En los fetos D, que presentan reducidos niveles de 15dPGJ₂ (p<0,001) y elevados N/N (p<0,01) y TBARS (p<0,05), las dietas AO y AC elevaron los niveles de 15dPGJ₂ (p<0,01) y disminuyeron los niveles de N/N (p<0,05) y TBARS (p<0,05). **Conclusiones:** Los tratamientos dietarios con aceites ricos en ácidos grasos mono y poliinsaturados, agonistas de PPARs, incrementan la capacidad anti-inflamatoria de la placenta y ejercen efectos beneficiosos para el feto de rata D.

0264 (403) MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE OXIDACIÓN A LÍPIDOS GENERADOS POR HIERRO Y NÍQUEL EN LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES. N F Ferrarotti¹

², R Musacco Sebío¹, M G Repetto¹

¹Cátedra de Química General e Inorgánica, Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Análisis Clínicos I, Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica, Fac. Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. <ferrarot@ffy.uba.ar>

La citotoxicidad del hierro (Fe) y níquel (Ni) esta asociada a procesos oxidativos mediados por especies reactivas del oxígeno. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos bioquímicos involucrados en relación al estrés reversible o daño oxidativo irreversible. Se evaluaron mediante espectrofotometría la generación de anión superóxido (O₂⁻) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el contenido de glutatión (GSH), la actividad de NADPH oxidasa, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat), y un indicador de peroxidación de lípidos (TBARS) en leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos. Se estudiaron 6 grupos (G) de PMN:G1: en reposo; G2: reposo e incubados con Fe(III) (100 µM); G3: reposo y con Ni(II) (100 µM); G4: estimulados con éster de forbol (PMA, 0.1 µg/mL); G5: con Fe y PMA; G6: con Ni y PMA. Resultados:

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
NADPH oxidasa (nmol NADPH/ min/10 ⁶ cél)	0.55±0.02	5.0±0.4*	0.52±0.02	2.5±0.01*	0.17±0.01**	0.23±0.01**
O ₂ (nmol/ min/10 ⁶ cél)	2.00±0.01	3.4±0.2	2.40±0.02	3.0±0.1*	1.2±0.2**	1.8±0.2**
H ₂ O ₂ (nmol/ min/10 ⁶ cél)	0.48±0.02	6.4±0.2*	5.20±0.01*	8.5±0.2*	3.5±0.3**	3.3±0.1**
GSH (µmol/10 ⁶ cél)	0.41±0.01	0.34±0.01*	0.42±0.01	0.31±0.01*	0.32±0.02	0.30±0.01
SOD (mU/10 ⁶ cél)	3.50±0.02	14.8±0.3*	17.6±0.3*	10.0±0.8*	8.0±0.3	10.0±0.2
Cat (pmol/10 ⁶ cél)	0.22±0.01	1.0±0.1*	0.15±0.02	0.3±0.1*	0.3±0.1	0.6±0.1
TBARS (µmol/10 ⁶ cél)	0.09±0.01	0.25±0.02*	0.06±0.01	0.44±0.01*	0.08±0.02**	0.04±0.01**

*p<0.05 con respecto al grupo 1, **p<0.05 con respecto al grupo 4

Conclusiones: Fe y Ni inhiben la actividad de NADPH oxidasa e inducen la generación de H₂O₂ por mecanismos diferentes en

PMN. La toxicidad por Fe está asociada a daño oxidativo irreversible a lípidos por procesos redox, mediante el consumo de NADPH y GSH, reducción de Fe(III) a Fe(II) y participación en la reacción de Fenton. El Ni(II) genera estrés oxidativo reversible con protección antioxidante. El H₂O₂ actuaría como agente oxidante en la toxicidad por Fe, y como mensajero de procesos inflamatorios en la toxicidad por Ni.

0265 (406) CONDICIONANTES EPIDEMIOLÓGICOS DE LA DESNUTRICIÓN INFANTIL EN LA COMUNIDAD MOCOVÍ.

S A Labadié¹, R A Fernández^{2,3}, P Aguirre⁴

¹Escuela de Salud Pública Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba; ²Escuela de Salud Pública, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; ³Departamento de Admisión, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; ⁴Departamento de Nutrición, Dirección de Salud Materno Infantil, Ministerio de Salud de la Nación <sirleylabadie@yahoo.com.ar>

Introducción: La Comunidad Mocoquí es un espacio pluricultural donde criollos y mocoquíes comparten la pobreza, marginalidad y el aislamiento geopolítico. La situación es preocupante, pues el contexto en el que las personas están insertas, determinan el proceso salud - enfermedad. Especialmente son los niños quienes se ven privados de muchos de sus derechos, entre ellos el derecho a la salud y la nutrición. La Desnutrición en la primera infancia puede causar retraso en el crecimiento y desarrollo cerebral del niño. **Objetivo:** Estimar asociación entre condiciones habitacionales, demográficas, socio-culturales y perinatales, y el estado nutricional de niños indígenas en la comunidad Mocoquí. **Material y Metodologías:** Modelo etnoepidemiológico, combina abordajes cuantitativos y cualitativos. Para el análisis cuantitativo se realizó un estudio correlacional de corte transversal. La información se obtuvo de fuentes secundarias (cuestionario con preguntas estructuradas y revisión de Historias Clínicas). Población del estudio: 140 niños menores de 5 años de origen indígena. La valoración del estado nutricional se realizó según estándares nacionales de crecimiento y los niveles de asociación fueron comprobados con regresión múltiple, con un valor de significación de 0,05. Para el abordaje cualitativo se realizó un estudio de casos con análisis del discurso. Resultados Cuantitativos: El 51,06% de los niños presentaron malnutrición, con un 30,85% de prevalencia en desnutrición. El valor de desnutrición aguda fue de 9,57% y de crónica 10,64%. Los factores de riesgo del estado nutricional fueron, la edad de los niños entre 1 y 4 años y la edad materna entre 20 y 31 años. Las familias nucleares, las familias extensas y la provisión de agua de red interna, se identificaron como factores protectores del estado nutricional. Conclusiones: La alta prevalencia de desnutrición infantil registrada, revela la necesidad de generar estrategias sanitarias locales basadas en el enfoque de riesgo.

0266 (415) PORFIRIAS HEPÁTICAS INFANTO-JUVENILES. UNA MANIFESTACIÓN POCO FRECUENTE.. V A Melito^{1,2}, M V Rossetti^{1,2}, B X Granata¹, E N Gerez¹, A Batlle¹, V E Parea^{1,2}

¹Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas J. de San Martín; ²Depto de Química Biológica-FCEN-UBA <melito@qb.fcen.uba.ar>

Las Porfirias son patologías poco comunes y con síntomas inespecíficos que generalmente dificultan el diagnóstico médico. Se producen por fallas enzimáticas del camino del Hemo. Se clasifican en hepáticas y eritropoyéticas o en agudas, cutáneas y mixtas. Las eritropoyéticas se manifiestan desde la infancia o el nacimiento. Las porfirias hepáticas autosómicas dominantes, Porfiria Cutánea Tardía (PCT), Porfiria Aguda Intermitente (PAI), Porfiria Variegada (PV), Coproporfiria Hereditaria (CPH), se desencadenan en adultos. Están descriptos pocos casos en niños y adolescentes. Presentamos el estudio de 26 pacientes PCT, 7

PAI, 3 PV y 1 CPH. Se determinó el contenido de ALA, PBG y porfirinas en orina (PTO), plasma (IPP) y materia fecal (PTMF) y actividad enzimática en glóbulos rojos (GR). El gen afectado se amplificó y secuenció automáticamente. En el grupo PCT los valores de PTO (831-9861 µg/24 h) e IPP (1,63-8,60) fueron similares a los de adultos. En las porfirias agudas, ALA y PBG en orina, PTO e IPP estaban elevados de acuerdo a cada tipo de porfiria: PAI ALA: 5-25 mg/24h; PBG: 60-90 mg/24h; PTO: 1500-10000 µg/24h; IPP: 2-4 ($\lambda=619\text{nm}$); PV ALA: 3-8 mg/24h; PBG: 6-18 mg/24h; PTO: 500-2500 µg/24h; IPP: 7-12 ($\lambda=625\text{nm}$); PTMF: 1500-2000 µg/g; CPH PTO: 1700 µg/24h; IPP: 1,5 ($\lambda=619\text{nm}$); PTMF: 113 µg/g. Valor Normal: ALA: ? 4 mg/24h; PBG: ? 2 mg/24h; PTO: 20-250 µg/24h; IPP: ? 1,30 ($\lambda=619\text{nm}$); PTMF: 30-130 µg/g. En todos los casos la enzima afectada estaba disminuida un 50%. El diagnóstico temprano de estos casos minimiza el riesgo de complicaciones asociadas. Su descripción, tratamiento y evolución facilitan el diagnóstico diferencial de porfiria y las posibilidades terapéuticas a aplicar en cada caso. El análisis molecular en el propósito reveló la mutación responsable de la porfiria y permitió realizar el diagnóstico presintomático en las familias el cual llevó a la detección de 48 portadores jóvenes y a su asesoramiento a fin de evitar la manifestación de la porfiria.

0267 (427) ÓXIDO NITRICO (NO) Y ESTRÉS OXIDATIVO (EO) DURANTE LA ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL EN RATAS CON SOBRECARGA ORAL DE FRUCTOSA (SF). A Carranza¹, A Azich², M Mayer¹, P I Ingaramo³, M T Ronco³, H A Peredo⁴, A M Puyó⁵, M Galleano²

¹Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.; ²Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires-CONICET.; ³IFISE (CONICET), Facultad de Cs. Bioqcs. y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.; ⁴Farmacotecnia II, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.; ⁵Anatomía, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. <carranza.ma@gmail.com>

SF es considerado un modelo de síndrome metabólico, cuadro asociado a EO en el cual varios aspectos del metabolismo del NO aún son desconocidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción de NO y los indicadores de EO durante la endotoxemia experimental en animales controles y SF. Machos Sprague-Dawley de 180 g fueron tratados durante 14 semanas con solución de F 10% P/V en el agua de bebida (F, n=16) o con agua corriente (C, n=16). Seis horas antes de ser sacrificados 8 animales de cada grupo fueron sometidos a endotoxemia por administración de lipopolisacárido de E. coli (LPS) (ip, 4mg/kg) y los restantes 8 animales de cada grupo fueron inyectados con solución fisiológica, quedando establecidos los grupos C, F, C+LPS and F+LPS. Se determinaron: a) niveles de NO en circulación cuantificando el complejo NO-Hemoglobina en sangre a través de espectroscopía de resonancia paramagnética; b) contenido de nitratos y nitritos plasmáticos (NOx), por reacción de Griess previa reducción enzimática; c) expresión de iNOS en hígado por Western Blott y d) sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (por fluorometría) y 8-isoprostanos (8-iso) por ELISA en plasma.

	NO-Hb (UA)	NOx (iM)	iNOS(UA)	TBARS (iM)	8-iso (pg/ml)
C	<0,5	9,0±0,7	2,5±1,3	0,57±0,07	184±45
F	<0,5	13,1±0,6	0,6±0,3	0,51±0,02	192±26
C+LPS	19±2	264±11 ^a	68±3 ^a	0,98±0,03 ^a	3557±400 ^a
F+LPS	11±1 ^b	212±18 ^{a,b}	55±6 ^{a,b}	0,86±0,08 ^a	2960±620 ^a

^a p<0,05 vs C y F; ^b p<0,05 vs C+LPS (ANOVA)

Los Resultados muestran que, bajo nuestras condiciones experimentales, SF no afectó la producción de NO ni generó EO basalmente, sin embargo, frente al LPS la inducción de la iNOS

y, como consecuencia en los niveles de NO y NOx, fueron significativamente menores en los animales SF con respecto a los controles. Podemos concluir que la respuesta al LPS en relación al NO es diferente en animales SF. Experimentos posteriores serán necesarios para establecer la causa de esta respuesta diferencial.

Financiado por UBACyT B802 y B106.

0268 (459) EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN PROTEICA SOBRE LOS NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y LA APOPTOSIS CELULAR EN HÍGADO DE RATÓN. J R Mendieta¹, A M Guidici¹, V J Caballero¹, R D Conde¹, A N Chisari¹

¹Instituto de Investigaciones Biológicas FCEyN UNMDP <jumend@mdp.edu.ar>

Los aminoácidos son precursores de distintas moléculas entre las que se encuentra el glutatión (GSH), antioxidante mayoritario en las células. Los niveles de GSH pueden variar por la presencia de alta concentración de glucosa y nutrientes, afectando el equilibrio oxidativo y la inducción de apoptosis celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de una dieta sin proteínas o sin proteínas suplementada con Met sobre los niveles de GSH, especies reactivas de oxígeno (ROS), y actividad de caspasa 3 en el citosol hepático de ratón. Para tal fin, ratones hembra adultos Balb/C fueron divididos en 4 grupos (n: 5 de c/u) sometidos durante 5d a distintas dietas, a saber: C, dieta completa control; SP, dieta sin proteínas ni aminoácidos; SPM, SP suplementada con Met; SPR, SP realimentados con dieta completa por 24 h. Se observó una disminución en los niveles de GSH en SP (77.8±0.1%) y SPM (69.3±0.4%*) con respecto a C (100%) (*p<0.001), mientras que no se observaron diferencias en animales SPR. Por otra parte, los niveles de ROS aumentaron en ratones SP (C: 100%; SP: 150±20%*) (*p<0.001), mientras que este aumento fue revertido por las dietas SPM y SPR. La actividad de caspasa 3 aumentó en animales SP (C: 100%, SP: 157±9*), mientras que disminuyó significativamente en animales SPM (73.4±10.4*) y SPR (70.6±6.3*) (*p<0.05). Los Resultados obtenidos indican que una dieta SP disminuye los niveles de GSH, lo cual provocaría un aumento en los niveles de ROS y un incremento en la apoptosis celular. Además, la realimentación con dieta completa restaura los niveles de GSH, provocando un descenso en los niveles de ROS y en la apoptosis celular. Por otra parte, si bien el suministro de Met no sería suficiente para revertir la caída en los niveles de GSH en animales SP, estaría restableciendo los niveles de ROS por una vía independiente de GSH y disminuyendo la apoptosis celular.

0269 (487) DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN LA CORTEZA CEREBRAL DE RATAS DIABÉTICAS: EFECTO DEL TRATAMIENTO CON L-ARGININA. M d C Ortiz¹, S Lores Arnaiz², M Majowicz³, M F Albertoni Borghese³, N A Vidal³, J Bustamante²

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica; ²Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Fisicoquímica; ³Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Biología Celular <mortiz@ffyb.uba.ar>

La diabetes constituye una patología que afecta diferentes órganos, inclusive el cerebro, y está asociada con una deficiencia de óxido nítrico (NO). El propósito de este trabajo fue evaluar la función mitocondrial y la producción de NO en la corteza cerebral de ratas controles (C), diabéticas (D) y diabéticas tratadas con L-arginina (L-arg). La diabetes se indujo por estreptozotocina (70mg/kg). La L-arg se administró por 4 días en el agua de bebida (622 mg/kg/día). Se determinaron los niveles de lipoperoxidación (LP) en homogenatos. En mitocondrias aisladas se midió el consumo de oxígeno en presencia de malato-glutamato. Se evaluó el potencial de membrana con DIOC6 usando citometría de flujo y la producción de NO en partículas submitocondriales mediante espectrofotometría. Se observó un aumento de la LP en

D en comparación con C (1.6 ± 0.3 nmol/mg de proteína vs 0.64 ± 0.07 , respectivamente). El aumento se revirtió por el tratamiento con L-arg. El consumo de oxígeno en estado 4 aumentó en D en comparación con C, (8.0 ± 1.0 ng-atomO/min.mg de proteína vs 5.2 ± 0.5 respectivamente); mientras que se observó una disminución en el estado 3 en D (22 ± 3.4) en comparación con C (36 ± 4.2). El tratamiento con L-arg reestableció el consumo de oxígeno en estado 4. El descenso en el estado 3 no revirtió por este tratamiento. La producción de NO en D disminuyó en comparación con C (1.3 ± 0.1 vs 2.4 ± 0.2 respectivamente). Esto se revirtió por el tratamiento con L-arg. El potencial mitocondrial disminuyó un 20% en las diabéticas mientras que el tratamiento con L-arg elevó la polarización en un 14%. Podemos concluir que en este modelo de diabetes existe un aumento del estrés oxidativo asociado a una disfunción mitocondrial y descenso en la producción de NO. El tratamiento con L-arg disminuyó los niveles de LP e indujo una recuperación parcial de la función respiratoria en estado 4, y mantuvo la polarización mitocondrial y los niveles de NO.

0270 (499) INFLUENCIA DE LA OBESIDAD SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO Y MINERAL EN RATAS EN CRECIMIENTO ALIMENTADAS CON DIETA NORMOCÁLCICA. M Gonzales Chaves ^{1 2 3}, A Weisstaub ⁴, E Hernández ^{1 2 3}, G Pellegrini ^{1 2 3}, C Marotte ^{1 2 3}, M L Pita Martín de Portela ⁵, S Zeni ^{1 2 3}

¹Sección de Osteopatías Médicas Hospital de Clínicas José de San Martín; ²Cát. de Bioquímica Gral. y Bucal, Fac. de Odontología - UBA; ³CONICET; ⁴Facultad de Farmacia y bioquímica, UBA; ⁵Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <macagch@yahoo.com.ar>

El desarrollo de osteoporosis y obesidad presentarían mecanismos comunes. Durante el crecimiento, la obesidad afectaría al metabolismo óseo y mineral aunque se cubran los requerimientos de calcio formando hueso con funciones biomecánicas alteradas. **Objetivo:** comparar, durante el crecimiento, el impacto de una dieta normocálcica (0.5%) sobre la masa ósea en un modelo experimental en ratas macho normales y genéticamente obesas. Se aparearon ratas adultas, Wistar (W) y IIM beta. A la preñez se alimentaron con dietas normocálcicas según AIN 1993. Las crías (n = 11 por grupo) desde el destete se alimentaron "ad libitum" con la misma dieta hasta 50 días de edad (Tf), registrándose consumo de alimento y peso corporal (PC). A Tf se determinó: % de lípidos corporales totales (Soxhlet), contenido mineral óseo de esqueleto total (CMO) y densidad mineral (DMO) en tibia proximal (tp) y columna (c) por DXA, con software especial para pequeños animales bajo anestesia leve. A continuación se les extrajo sangre por punción cardíaca determinándose: FAO y FAL por colorimetría y BGP por ELISA. Resultados (X±DS):

	W	IIM beta	p
PC final (g)	192.1 ± 18.6	226.5 ± 41.7	<0.001
Consumo total de dieta (g)	416.7 ± 28.1	504.7 ± 103.3	0.013
% de lípidos corporales	10.0 ± 1.7	11.8 ± 3.3	ns
% de agua corporal	65.0 ± 3.1	60.5 ± 1.9	0.001
CMO (mg/cm ²)	1.299 ± 0.227	2.909 ± 0.789	<0.0001
DMOc(mg/cm ²)	187.2 ± 14.7	207.8 ± 13.7	0.0046
DMO tp(mg/cm ²)	177.0 ± 11.9	209.6 ± 16.2	<0.0001
FAO (UI/L)	67.8 ± 10.0	193.1 ± 38.9	<0.0001
FAL (UI/L)	320.6 ± 127.8	774.8 ± 175.7	<0.0001
BGP (UI/L)	824.7 ± 105.6	375.1 ± 46.2	<0.0001

Las IIM beta presentaron: mayor consumo de dieta, PC, nivel de FAO, CMO y DMO en tp y c, pero menores niveles de BGP que las W. **Conclusiones:** El mayor consumo de Ca podría ser el responsable del mayor CMO en las ratas obesas; los mayores valores del marcador de formación de diferenciación osteoblástica (FAO) y los menores del de mineralización (BGP) sugirieron una alteración en dicho proceso. UBACYT (2008-10) B 091.

0271 (625) EFECTO DE LA CASTRACION EN EL SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE EN PULMÓN DE RATA. N N Gomez ¹, V N Caballero ¹, V Nollac ¹, V S Biaggio ², M V Perez Chaca ¹, M Fornes ³, M S Gimenez ²

¹Laboratorio de Biología Molecular UNSL; ²Laboratorio de Biología Molecular UNSL, CONICET-IMIBIO SL; ³IHEM CONICET <ngomez@unsl.edu.ar>

Hay fuertes evidencias que indican que el estrés oxidativo juega un rol clave en las patofisiologías pulmonares. Por otro lado, la presencia de receptores específicos para andrógenos en el pulmón sugiere que las hormonas sexuales juegan un rol fisiológico en la función pulmonar. El presente estudio fue realizado para determinar si la castración produce cambios en la capacidad antioxidante del pulmón de rata macho adulta. Para ello se utilizaron ratas Wistar macho de (200 ± 20g), separadas en dos lotes: un lote Control (Co) y un lote castrado (Ca), ambos grupos se sacrificaron a los 60 días. Se extrajo suero y los pulmones se dividieron en 2 partes. A partir de uno de los lóbulos de cada pulmón se determinó la lipoperoxidación cuantificando las sustancias reactivas al Acido tiobarbitúrico (TBAR'S). Para determinar las enzimas del sistema de defensa antioxidante se partió de otro lóbulo del que se extrajo el RNA total usando Trizol y las alícuotas se amplificaron por PCR, usando β actina como gen control. Otro lóbulo se utilizó para histología usando como fijador Bouin y se realizaron para ello cortes de 12 micras. Tanto en suero como en pulmón de Ca aumentaron significativamente los TBAR'S (p< 0.01) y las enz. SOD2 y CAT del sistema de defensa antioxidante aumentaron significativamente (p< 0.01) en pulmón de Ca. Lo que se ve reflejado claramente en los cambios morfológicos observados en el pulmón de animales castrados donde se ve una marcada infiltración de neutrófilos y eosinófilos en el espacio alveolar junto a algunos macrófagos (cel. del polvo) y en algunas regiones una importante proliferación del tej. conectivo. Estos Resultados nos sugieren que la castración estaría produciendo un estado pro-inflamatorio que produce una activación del sistema de defensa antioxidante. El desbalance entre el sistema pro y anti-oxidante conduce a un cuadro inflamatorio en el estroma pulmonar.

NEFROLOGIA 01

0272 (10) SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA) EN EL DESARROLLO DEL DAÑO RENAL INDUCIDO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (IR). S M Molinas ^{1 2}, C Cortés-González ^{3 4}, Y González-Bobadilla ^{3 4}, L Monasterolo ^{1 5}, C Cruz ^{3 4}, M M Elías ^{1 2}, N Bobadilla ^{3 4}, L Trumper ^{1 6}

¹Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario; ²Instituto de Fisiología Experimental-CONICET; ³Unidad de Fisiología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; ⁴Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México; ⁵CONICET; ⁶Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR) <sara_molinas@yahoo.com.ar>

En trabajos previos reportamos que 40 min de isquemia renal seguidos de 24 h de reperusión provocaron una marcada disfunción renal y daño tisular, asociados a aumento en la actividad mieloperoxidasa (MPO) y en los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL1 β e IL6. El SRAA es activado en varias situaciones de daño renal, sin embargo, su rol en el desarrollo de la insuficiencia renal aguda isquémica todavía no es claro. Nuestros objetivos fueron estudiar: el efecto de IR sobre la aldosterona (ald) en suero y el efecto del antagonista de receptores AT1 de angiotensinall, losartán (L), sobre el daño renal inducido por IR. Se sometió a ratas Wistar macho adultas (n=6

por grupo) a operación simulada (C) o a 40 min de isquemia renal unilateral seguidos de 24 h de reperfusión (IR). Otros grupos recibieron L (8 ó 80 mg/kg/día, ip) durante 3 días previos a IR (IRL8 ó IRL80) o a operación simulada (CL8 ó CL80). Se midió ald sérica por RIA y se encontró un aumento en IR que fue totalmente inhibido en IRL80. Ald(pg/ml):C=373±48; IR=1679±196*; IRL8=791±63*^o; IRL80=354±33^{of}. Mediante técnicas de clearance, los riñones postisquémicos IRL80 presentaron una mejoría de su función que resultó mayor a la observada en IRL8. VFG(ml/min.g riñón): C=1.3±0.2; IR=0.04±0.007*; IRL8=0.1±0.01*; IRL80=0.5±0.02*^{of}. *p<0.05 vs C, ^op<0.05 vs IR, ^fp<0.05 vs IRL8. L80 resultó más efectiva en prevenir la congestión capilar y la formación de cilindros intratubulares. L8 no evitó el aumento de MPO (estimación de infiltración de neutrófilos) y de los ARNm de TNF α , IL1 α e IL6 (medido por RT-PCR) inducidos por IR en corteza y médula, mientras que L80 evitó estos aumentos. CL8 y CL80 no difirieron de C en ninguno de los parámetros estudiados. Estos Resultados sugieren un rol fisiopatológico de la activación del SRAA ante un daño por IR renal. Los efectos protectores de la dosis mayor de L se podrían asociar a sus propiedades antiinflamatorias y al bloqueo del aumento de ald.

0273 (190) REGULACIÓN DE VOLUMEN CELULAR EN CÉLULAS DE TÚBULO COLECTOR: ROL DE LA AQP2 (ACUAPORINA 2) Y EL TRPV4 (TRANSIENT RECEPTOR POTENCIAL VANILLOID 4). L C Galizia ¹, P Flamenco ¹, V Rivarola ¹, C Capurro ¹, P Ford ¹

¹Laboratorio de Biomembranas, Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires <lgalizia@gmail.com>

La mayoría de las células responden a la hipotonía primero aumentando su volumen y luego iniciando mecanismos que le permitan restablecer el volumen original. Este mecanismo llamado "regulatory volume decrease" (RVD) depende de la activación de permeabilidades iónicas que revierten el gradiente osmótico y la dirección del flujo de agua. Sin embargo los mecanismos implicados en sensar el cambio de osmolaridad y/o de volumen para iniciar el RVD no están completamente comprendidos. Nosotros describimos por primera vez que la AQP2 es fundamental para el RVD en células renales. Recientemente demostramos que AQP2 actuaría facilitando la activación de una vía de entrada de calcio necesaria para activar los transportadores involucrados en el RVD (Galizia et al, 2008 *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F582-F590). El TRPV4 ha sido descrito como un canal catiónico permeable a calcio y activado por volumen. Investigar la participación del mismo en la entrada de calcio, estimulada por AQP2 en respuesta a hipotonía, es el objetivo de este trabajo. Utilizando microscopía de fluorescencia estudiamos los cambios en la concentración de calcio y en el volumen celular en respuesta a hipotonía en 2 líneas celulares de túbulo colector de rata WT-RCCD1 (no expresan AQP2) y AQP2-RCCD1 (transfectadas con AQP2). Encontramos que utilizando un inhibidor de los canales TRPV (rojo de rutenio) se pierde el aumento intracelular de calcio característico de la respuesta a hipotonía de las células AQP2-RCCD1 y en consecuencia la RVD es incompleta. Por otra parte experimentos de RT-PCR y Western Blot mostraron expresión de TRPV4 en los 2 tipos celulares. Utilizando un activador específico del TRPV4 (4 α -forbol 12,13-didecanoato) comprobamos su funcionalidad. Concluimos que el TRPV4 se expresa y es funcional en los 2 tipos celulares sin embargo sólo se activaría en respuesta a hipotonía cuando AQP2 esta presente en la membrana

0274 (393) EXPRESIÓN RENAL Y EXCRECIÓN URINARIA DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS "OAT5" EN RATAS CON INSUFICIENCIA RENAL AGUDA ISQUÉMICA (IRAI). G Di Giusto ¹, A M Torres ²

¹Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.; ²Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. CONICET. <giseladg@hotmail.com>

Oat5 es una proteína presente en membrana apical del túbulo proximal que intercambia aniones orgánicos por dicarboxilatos. En este trabajo se evaluó la expresión y la excreción urinaria de Oat5 en ratas con IRAi. El modelo de IRAi se realizó en ratas Wistar macho adultas mediante la oclusión de ambos pedículos renales durante 0 (Grupo Sham), 5 (Grupo I5R60) o 60 (Grupo I60R60) minutos. Los estudios se realizaron luego de 60 minutos de reperfusión. Se determinaron los niveles plasmáticos de creatinina (Crp). Se evaluó la expresión renal de Oat5 por inmunohistoquímica y Western blotting (en homogenados, H y en membranas apicales, MA). En orina se analizó la abundancia de Oat5 y la actividad de fosfatasa alcalina (FAo) expresándose ambos Resultados en relación a los niveles urinarios de creatinina. Se realizaron estudios histológicos. Se usó el test de ANOVA y Newman-Keuls (a) P < 0.05 vs Sham, (b) P < 0.05 vs I5R60.

	Sham (n = 6)	I5R60 (n = 4)	I60R60 (n = 4)
Peso renal (g)	2.17 ± 0.08	2.17 ± 0.02	3.08 ± 0.14 ^{a,b}
Creatinemia (g/L)	4.96 ± 0.29	5.50 ± 0.65	7.01 ± 0.18 ^{a,b}
Oat5 H (%)	100 ± 2	97 ± 8	65 ± 2 ^{a,b}
Oat5 MA (%)	100 ± 9	97 ± 5	55 ± 3 ^{a,b}
Oat5 orina (%)	100 ± 6	138 ± 6 ^a	161 ± 12 ^a
FAo (mU/mg Creat)	359 ± 53	312 ± 11	847 ± 163 ^{a,b}

En el grupo I60R60 se observaron alteraciones en todas las variables estudiadas, presentando Oat5 una disminución de su expresión tanto en H como en MA y un aumento de su excreción urinaria. Los estudios de inmunohistoquímica corroboraron los Resultados obtenidos mediante Western blotting en H y MA. El análisis histológico evidenció dilatación severa en la mayoría de los túbulos, achatamiento del epitelio tubular y vacuolización citoplasmática. Por el contrario, en el grupo I5R60, sólo se observó un aumento de la excreción urinaria de Oat5 y moderada dilatación en algunos túbulos. Estos datos evidencian modificaciones en la expresión renal de Oat5 dependientes de la severidad de esta patología y sugieren que Oat5 podría ser un marcador urinario temprano de IRAi.

0275 (421) NIVELES RENALES DE HORMONAS SEXUALES Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNA REGULADORA DE ESTEROIDOGÉNESIS AGUDA (STAR) EN UN MODELO DE DIABETES EXPERIMENTAL TEMPRANA. M A Pagotto^{1,2}, M L Roldán², G Rogic³, R M Pagotto³, S Molinas^{1,2}, L Trumper^{2,4}, M M Elías^{1,2}, O P Pignataro^{3,5}, L A Monasterolo^{2,6}

¹IFISE-CONICET; ²Farmacología. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; ³IBYME-CONICET; ⁴CIUNR; ⁵Dpto Química Biológica-FCEN-UBA; ⁶CONICET. <melina.pagotto@gmail.com>

En los últimos años se han acumulado evidencias que señalan un importante rol para las hormonas sexuales en la fisiopatología de las complicaciones renales en la diabetes. La progresión de nefropatía se asocia con una alteración en la expresión renal de receptores estrogénicos y un desbalance en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales. El objetivo del trabajo fue evaluar, en un estadio temprano de diabetes, a) la expresión de ARNm de la proteína StAR, responsable del transporte de colesterol a la membrana interna mitocondrial y regulatoria de la esteroidogénesis y b) las concentraciones renales de testosterona (T) y progesterona (P4). Ratas Wistar macho adultas recibieron estreptozotocina i.v. (50 mg/kg) (STZ) o vehículo (C). Luego de 7 días, se extrajeron los riñones y se separaron corteza y médula. Se estudió la expresión de ARNm de StAR mediante RT-PCR utilizando GAPDH como control interno. Se extrajeron esteroides de tejido renal y se determinaron los niveles de T y P4 por RIA. Los Resultados son promedio ± SEM de 4-5 observaciones. *p<0.05. Se observó una significativa disminución en la expresión de ARNm de StAR (unidades arbitrarias) en corteza (C= 0.127 ± 0.001; STZ= 0.068 ± 0.010*) y en médula (C= 0.590 ± 0.100; STZ= 0.170 ± 0.060*) de riñones diabéticos. Los niveles medulares de T (C= 4.28±1.7; STZ= 0.59 ± 0.25*ng/

mg tej) y P4 ($C = 28.7 \pm 6.2$; $STZ = 12.1 \pm 2.9^*$ pg/mg tej) disminuyeron significativamente con el tratamiento. Estos Resultados demuestran una disminución del contenido renal de hormonas sexuales, tanto para T como para P4, en una fase temprana de diabetes. Si bien este hallazgo podría interpretarse como consecuencia de las alteraciones descritas en los niveles hormonales en plasma, la disminución en la expresión de ARNm de StAR, más acentuada a nivel medular, apoya la hipótesis de un decremento en la síntesis local de esteroides. Estas evidencias sugieren un probable rol de nefroesteroides en la fisiopatología de la enfermedad renal diabética.

0276 (445) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA TRANSPORTADORA (TSPO) DE 18 KDA EN LA RECUPERACIÓN RENAL POST-IRA ISQUÉMICA. M L Roldán¹, M A Pagotto^{1,2}, S Molinas^{1,2}, L Trumper^{3,4}, L A Monasterolo^{3,5}

¹Farmacología. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.; ²IFISE-CONICET; ³Farmacología. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; ⁴CIUNR.; ⁵CONICET <rolदानlorena@gmail.com>

TSPO, anteriormente denominada receptor periférico a benzodiazepinas, se ha asociado a distintas funciones: esteroidogénesis, actividad de canales de calcio, respuesta inmune, regulación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y de la apoptosis. En estudios anteriores demostramos un aumento en la expresión renal de TSPO luego de daño por isquemia-reperusión en rata. En estudios realizados en cerdo se han reportado Resultados similares, donde además en base a la evolución de su distribución histológica y a su asociación con la expresión del factor inhibidor de leucemia se sugiere un rol regenerativo para TSPO (J Am Coll Surg 2006; 203:353). La inducción de HSP70 también se ha asociado a recuperación luego de isquemia-reperusión renal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de TSPO y de HSP70 en un modelo utilizado en nuestro laboratorio de prevención del daño renal por isquemia-reperusión con el antagonista AT1 losartán (L). Se sometió a ratas Wistar macho adultas a 40 min de isquemia renal unilateral seguidos de 24 h de reperusión (IR). A otro grupo se le administró L (80 mg/kg/día, i.p.) durante 3 días previos a IR (IRL). Los controles se sometieron a operación simulada (C) y un grupo C recibió L. En corteza renal, por RT-PCR se evaluó expresión de ARNm de TSPO, coamplificando GAPDH como control interno; y por Western blot la expresión de la proteína HSP70. Los Resultados (unidades arbitrarias) son promedio \pm SEM de 4-5 observaciones. * $p < 0.05$ vs. C; # $p < 0.05$ vs. IR. La expresión de ARNm de TSPO ($C = 0.66 \pm 0.01$; $IR = 0.75 \pm 0.01^*$; $IRL = 0.82 \pm 0.01^* \#$) y de la proteína HSP70 ($C = 0.09 \pm 0.006$; $IR = 0.16 \pm 0.02^*$; $IRL = 0.23 \pm 0.002^* \#$) aumentaron en corteza renal sometida a IR. Este aumento fue aún mayor en IRL. El pretratamiento con L mejoró la función renal y disminuyó el grado de necrosis tubular observado en IR. Estas evidencias refuerzan la hipótesis de un rol para TSPO en los procesos de regeneración post-isquémica del túbulo proximal.

0277 (461) ROL DE LA AQUAPORINA 2 (AQP2) EN LA ADAPTACIÓN A LA ALCALOSIS EN CÉLULAS DE TUBULO COLECTOR RENAL. V Rivarola¹, P Flamenco¹, L Galizia¹, P Ford¹, C Capurro¹

¹Lab. Biomembranas, Depto de Fisiología y Biofísica, Facultad Medicina, Univ de Buenos Aires <vriarola@yahoo.com>

Previamente demostramos que en las células RCCD, modelo de túbulos colectores renales, el proceso de adaptación a la alcalosis conlleva una alteración del crecimiento asociada a un aumento del área y de la muerte celular. Paralelamente, nuestros estudios anteriores mostraron que la AQP2 incrementa la tasa de apoptosis inducida por estrés osmótico o cicloheximida. Nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la presencia de la AQP2 altera el proceso de adaptación a la alcalosis. Para ello se cultiva-

ron monocapas de células RCCD, WT o transfectadas con AQP2 durante diferentes tiempos de adaptación a la alcalosis (24 a 96 horas) y luego se evaluó el crecimiento (hemancitómetro), la muerte celular (morfoloía y degradación nuclear) y el ciclo celular (citometría de flujo). Observamos que las células AQP2 disminuyen su proliferación más rápido (24 vs 48hs) y en mayor medida que las WT (cantidad de células a las 96h [Á control $\times 10^5$]: $AQP2 = -4,06 \pm 0,17$ vs $WT = -1,53 \pm 0,26$, $n=19$, $p < 0.001$). Esta disminución se correlaciona con un aumento de la muerte celular en ambas líneas, pero la línea AQP2 presentaba una mayor tasa de apoptosis (% células muertas 96h: $AQP2 = 38 \pm 4$ vs $WT = 16.6 \pm 3.3$, $n=11$, $p < 0.01$). Paralelamente, se observó que la alcalosis llevaba a un aumento del % de ADN en estadio S/G2-M del ciclo celular. Este arresto en G2 se observaba a las 48h en la línea AQP2 y, en menor medida, a las 72h en la WT (% S/G2-M 72h [Á control]: $AQP2 = 21.5 \pm 2.1$ vs $WT = 9.6 \pm 2.5$, $n=11$, $p < 0.05$). Por lo tanto concluimos que, en las células RCCD, la disminución del crecimiento celular resultaría tanto de un desarrollo más lento del ciclo celular como del aumento de la apoptosis. Además, demostramos que la presencia de la AQP2 acelera y aumenta la magnitud de la respuesta a la alcalosis.

0278 (544) DOPAMINA (DA) Y EXPANSIÓN DE VOLUMEN: ROL DE LOS TRANSPORTADORES DE CATIONES ORGÁNICOS (OCT). L A Di Ciano¹, V De Luca Sarobe¹, G Levin², J Toledo¹, E E Arrizurieta¹, F R Ibarra¹

¹Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, Laboratorio de Nefrología Experimental; ²Hospital de Niños R Gutiérrez, CEDIE, CONICET <eldisi@yahoo.com.ar>

La expansión moderada de volumen aumenta la excreción de dopamina en orina (U_{DAV}) con un pico inicial y posterior descenso (SAIC 2006). Este patrón puede ser modulado inhibiendo las enzimas que participan en la síntesis y degradación de DA. En la secreción tubular de DA renal se postula la intervención de OCT. Para explorar esto estudiamos ratas Wistar de 250-350g PC expandidas de volumen, controles (Ctl) y tratadas con cimetidina (CIM) bloqueante de los OCT 60 mg/Kg en el agua de bebida durante 24hs. Luego de un período basal se las expandió por 2hs al 5% PC con solución salina normal (NaCl 0.9%). Se determinaron diuresis (V), natriuresis (U_{Na+V}), clearance de inulina (FG), U_{DAV} y contenido tisular renal de DA. En ratas CIM la V (ml/15 min/100gPC) basal fue similar a Ctl, pero con expansión disminuyó (30 min: 0.12 ± 0.02 vs 0.21 ± 0.02 , 60 min: 0.22 ± 0.03 vs 0.40 ± 0.06 y 120 min: 0.35 ± 0.04 vs 0.65 ± 0.1 , todos $p < 0.05$ vs Ctl). La U_{Na+V} mostró una tendencia a disminuir aunque no significativamente. La U_{DAV} (ng/15 min/100gPC), en Ctl mostró el pico inicial a los 15 min de 4.5 ± 0.5 a 12 ± 1.2 ($p < 0.05$) y luego descendió a 5.6 ± 1.3 . En CIM la U_{DAV} mostró poca variación. A los 15 min cambió de 3.0 ± 0.75 a 7.43 ± 1.30 ($p < 0.05$ vs Ctl) y a 60 min 8.90 ± 2.37 (NS vs Ctl). En tejido renal (pg/mg) Ctl aumentó de basal 4.25 ± 1.25 a 17.49 ± 2.5 (15 min, $p < 0.01$) y bajó en 60 y 120 min a 5.74 ± 2.0 . CIM no varió entre basal y 15 min (4.5 ± 1.0 , ambos, $p < 0.05$ vs Ctl) y aumentó a los 60 y 120 min a 29 ± 6 y 24 ± 5 respectivamente ($p < 0.01$ vs Ctl). El cociente dopac/DA (actividad de MAO) a los 15 min en Ctl fue de 0.52 ± 0.02 y en CIM 4.20 ± 0.6 . El FG con expansión aumentó en ambos grupos de 0.60 ± 0.05 a 0.77 ± 0.05 ml/min/100gPC, ($p < 0.05$). La l-dopa plasmática fue similar en Ctl y CIM. En la expansión moderada de volumen la CIM disminuye la U_{DAV} y la diuresis, facilita la acumulación tisular de DA y aumenta el cociente dopac/DA. Esto sugiere la participación de los OCT en la excreción urinaria de DA.

0279 (634) DOPAMINA ACTIVA LA QUINASA ERK 1/2 POR UN MECANISMO MEDIADO POR ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO. A B Acquier¹, L Brion¹, A Gorostizaga¹, C Paz¹, C F Mendez¹

¹Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA <acquierandrea@yahoo.com.ar>

En el túbulo proximal renal, la dopamina (DA) regula la actividad de la Na⁺,K⁺-ATPasa por un mecanismo en el que participan la proteína quinasa C y metabolitos hidroxilados del ácido araquidónico (AA). La quinasa de señales extracelulares tipo 1 y 2, ERK 1/2, (ERK) está involucrada en la regulación de la actividad de la fosfolipasa A₂ que controla la liberación de AA para su biotransformación. En este sistema, el metabolismo de DA genera especies reactivas del oxígeno (ROS), que podrían activar ERK. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si ERK participa de la vía de señalización activada por DA e investigar el tipo de receptor involucrado y la participación de ROS en el proceso. Se utilizaron células de túbulo proximal de la línea OK (opossum kidney) estimuladas con DA en presencia o ausencia del compuesto antioxidante N-acetilcisteína (NAC 1 mM), o de agonistas selectivos D₁, SKF-38393 (SKF, 300 nM) o D₂, PPHT (500 nM). La activación de ERK se determinó a través de la detección de la forma fosforilada de la quinasa (P-ERK) por Western blot, utilizando anticuerpos específicos contra P-ERK y ERK total. DA promovió la activación de ERK en forma dependiente de la concentración (0,1 a 10 iM) y del tiempo (entre 2,5 y 30 min) con un máximo a los 10 min de estimulación. La mínima concentración que produce máximos niveles de P-ERK (1 iM) produjo una activación de 5 veces con respecto al control a los 10 min. Ninguno de los agonistas selectivos promovió la fosforilación de ERK, sugiriendo que la acción de DA es dependiente de ambos tipos de receptores. NAC redujo parcialmente el efecto de la DA sobre ERK y también la fosforilación de ERK mediada por un dador de ROS. Nuestros Resultados sugieren que DA promueve la activación de ERK a través de la activación de receptores dopaminérgicos de tipo D₁ y D₂ en un proceso del que participan ROS.

NEFROLOGIA P1

0280 (199) HORMONAS SEXUALES Y SISTEMA KALIKREÍNA KININA (SKK) EN RATAS WISTAR ADULTAS. N L Corbera¹, P J Azurmendi^{1,2}, R S Martín^{1,2}, F R Ibarra¹, E M Oddo¹, E E Arriurieta^{1,2}

¹Nefrología Experimental, IIM Alfredo Lanari, UBA; ²CONICET <lanari@pinos.com>

Se acepta que la hipertensión resulta de alteraciones en la actividad de sistemas vasoactivos generados por factores ambientales o genéticos. Se considera actualmente que el SKK está involucrado en la regulación de la presión arterial. Apoyando esta hipótesis, trabajos efectuados en nuestro laboratorio, han demostrado que la gonadectomía (Gx) prepuberal ejerce un efecto hipotensor al tiempo que induce un aumento de la actividad de la kalikreína urinaria (KUa) en ratas SHR, observándose además una diferencia de género en relación al sistema. Para avanzar en el mejor conocimiento del comportamiento del SKK y observar el efecto del tiempo de Gx estudiamos los distintos componentes del sistema (síntesis, contenido tisular y excreción de kalikreína) en ratas Wistar Gx en la edad adulta. Se midió la síntesis por RT-PCR (KLK), el contenido (KR) en corteza renal y la KUa por método amidolítico. La KLK (relación kalikreína/beta actina) mostró un aumento en las ratas ovariectomizadas (oVx) respecto a las hembras (H), machos (M) y orquitectomizados (oRx) (1.05±0.1 vs 0.78±0.06; vs 0.65±0.04 y vs 0.77±0.04, respectivamente, p<0.05). El grupo M mostró el menor contenido de KR 6.1±0.74 respecto de oRx, H y oVx que alcanzaron 12.4±1.09; 15.7±1.74 y 20.9±1.88 nkat/g R (p<0.002, 0.05 y 0.01, respectivamente). La KUa (nkat/g R/día) mostró en las ratas H y oVx valores mas altos que los M y oRx (p<0.01 y 0.05, respectivamente). La KLK, KR y KUa se correlacionaron significativamente (r=0.917, p<0.05 y r=0.967, p<0.01), en todos los grupos. Las ratas Wistar, como mostraron las SHR en su oportunidad, exhiben un dimorfismo sexual respecto al SKK situándose las hembras en un nivel superior al de los machos. Del mismo modo, la respuesta a la Gx tardía produce un estímulo del SKK tanto en hembras como en machos. La KUa sería resultante de una mayor síntesis y almacenamiento tisular de kalikreína. Estos datos sugieren una participación de las hormonas sexuales en la regulación del SKK.

0281 (407) EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE OAT1 Y OAT3 EN RIÑONES DE RATAS TRATADAS CON CLORURO MERCÚRICO. G Di Giusto¹, A M Torres²

¹Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.; ²Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario. CONICET. <giseladg@hotmail.com>

En trabajos anteriores observamos disminución del clearance sistémico y de la excreción renal de p-aminohipurato (PAH) en ratas tratadas con dosis nefrotóxicas de cloruro mercúrico (HgCl₂). Oat1 y Oat3 son dos proteínas transportadoras de aniones orgánicos presentes en membrana basolateral de túbulo proximal. Ambas proteínas transportan antineoplásicos, diuréticos, antiinflamatorios, conjugados de tioles con mercurio, PAH, etc. En el presente trabajo se evaluaron la expresión y la función renal de Oat1 y Oat3 en ratas tratadas con HgCl₂. Se trabajó con ratas Wistar macho adultas controles (Ct, n = 4) y tratadas con HgCl₂ 5 mg/kg p.c., s.c., 18 hs antes (T, n = 4). Se determinó urea plasmática, abundancia de Oat1 y Oat3 mediante Western blotting en homogenados de corteza renal (H) y en vesículas de membrana basolateral (BLM) y parámetros cinéticos de captación de ³H-PAH (Km y Vmax) en BLM. Los Resultados se expresan como media ± SEM, (*) P <0.05: Uremia (g/L): Ct = 0.48 ± 0.06, T = 1.27 ± 0.09*; Oat1 en H (%): Ct = 100 ± 2, T = 145 ± 8*; Oat1 en MBL (%): Ct = 100 ± 2, T = 70 ± 4*; Oat3 en H (%): Ct = 100 ± 5, T = 68 ± 7*; Oat3 en MBL (%): Ct = 100 ± 3, T = 76 ± 4*; Vmax (nmol/15 s/ mg Prot.): Ct = 5.18 ± 0.85, T = 2.01 ± 0.38*; Km (uM): Ct = 236 ± 42, T = 199 ± 44. La disminución en la expresión de Oat1 y de Oat3 en MBL explicaría, al menos en parte, la menor captación renal de PAH, así como la disminución de su clearance sistémico y de su excreción renal. La modificación de la expresión renal de estas proteínas podría ser un mecanismo adaptativo destinado a proteger al riñón de la nefrotoxicidad del mercurio, ya que Oat1 y Oat3 participan en el ingreso del mismo a la célula renal. Futuros estudios ayudarán a determinar si la modulación de la expresión y función de ambos transportadores podría ser una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de esta nefropatía.

0282 (417) LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINA 2 INCREMENTA LA APOPTOSIS EN CÉLULAS DEL TÚBULO COLECTOR CORTICAL. P Flamenco¹, L Galizia¹, V Rivarola¹, J Fernández¹, P Ford¹, C Capurro¹

¹Lab. Biomembranas, Depto de Fisiología y Biofísica, Fac Medicina, Univ de Buenos Aires <mflamenco@fmed.uba.ar>

La principal característica de la apoptosis es la contracción celular, evento denominado AVD (*Apoptotic Volume Decrease*), debido a la salida de iones K⁺ y Cl⁻ seguida por el agua osmóticamente obligada. Pese a la importancia del AVD, los mecanismos involucrados en esta pérdida de agua han sido ignorados. El objetivo de este trabajo fue investigar el papel del canal de agua (acuaporina 2, AQP2) durante la apoptosis en células renales, así como la posible relación entre la expresión de AQP2 y la activación de mecanismos iónicos involucrados en la respuesta reguladora de volumen. Utilizamos como modelos dos líneas celulares de túbulo colector renal: WT-RCCD₁ la cual no expresa AQPs, y AQP2-RCCD₁ que expresa AQP2 en la membrana apical. La apoptosis fue inducida incubando a las células hasta 24 h con manitol o hasta 7 h con cicloheximida. La evaluación de la misma se realizó mediante diferentes técnicas (morfológica celular, degradación del ADN y actividad de caspasas) y la permeabilidad al agua (P_w x 10⁻⁴, cm.s⁻¹) fue medida por videomicroscopía de fluorescencia. Los Resultados muestran que, independientemente del estímulo, tres hechos distinguen a las células que expresan AQP2 de las WT: 1- la tasa de apoptosis está significativamente incrementada (59.7 ± 3.4 vs 33.3 ± 2.30 p<0.05); 2- El bloqueo de canales de K⁺ y Cl⁻ que participan de la

regulación de volumen en estas células inhibe la apoptosis en las células AQP2 ($54,60 \pm 2,30$ a $22,37 \pm 0,89$ $p < 0,001$) y 3- El P_i es drásticamente reducido durante el proceso de apoptosis solo en las células AQP2 ($126 \pm 9,30$ a $19,92 \pm 1,85$; $p < 0,001$) y esto ocurre previo a la degradación del ADN. Estos Resultados nos permiten proponer que la AQP2 actuaría como un sensor llevando a la activación coordinada de canales de K^+ y Cl^- reguladores de volumen, resultando en una rápida contracción celular y un rápido alcance de los niveles iónicos necesarios para activar la cascada enzimática apoptótica.

0283 (637) ANÁLISIS COMPLETO DE MUTACIONES PKD2 EN UNA POBLACIÓN DE POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE (ADPKD). P J Azurmendi ¹, Y Bacher ², Z Erlic ², A Fraga ¹, H P Neumann HPH ², R S Martin ³

¹Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA-CONICET; ²Department of Nephrology, University of Freiburg Medical Center, Freiburg im Breisgau, Germany; ³Centro Académico de Salud Universidad Austral <pabloazur@hotmail.com>

ADPKD es debida a mutaciones en dos genes, PKD1 y PKD2, que codifican para las proteínas PC1 y PC2. De 123 variantes genéticas descritas, 91 fueron calificadas como mutaciones, y sólo una de ellas es una sustitución (1532A>T). Nuestro objetivo es realizar un análisis completo de variantes de PKD2 en una población argentina y demostrar su patogenicidad. Se estudió el gen PKD2 en 48 individuos (edad 25 ± 1 años), provenientes de 43 familias. Se amplificaron por PCR los 15 exones y sus sitios consenso de splicing. Los productos de PCR se analizaron por dHPLC (cromatografía líquida de alta presión desnaturalizante), que discrimina entre homo y hetero-duplex y los perfiles diferentes fueron secuenciados. Se encontraron sólo 3 casos de perfiles y secuencias aberrantes, 2436insT y 1094+1delGTAA, que ya fueron descritas y que predicen proteínas truncadas y una sustitución de A por G en el nucleótido 1034, no descrita hasta el momento (1034A>G). Para determinar la patogenicidad de este cambio, se observó: 1) que el fenotipo de la enfermedad segregaba con el cambio 1034 A>G (aa 345 de Y a C) en la familia afectada, 2) el aminoácido Y es físico-químicamente muy diferente de C (score de Grantham de 192), 3) 345Y está conservado a lo largo de toda la escala evolutiva, y 4) el alelo 1034G no estuvo presente en 170 cromosomas de individuos sanos de nuestra población ni en 200 de la comunidad de Freiburg Im Breisgau. De acuerdo a la topología del canal PC2, el cambio descrito asienta en el loop S2, probable región sensora. Conclusión: 1034 A>G califica como mutación y es el segundo caso descrito de una sustitución causante de ADPKD. Por lo tanto, la prevalencia de PKD2 es del 8% en una población ADPKD joven de Argentina. Los datos enfatizan la necesidad de estudios de caracterización de las variantes genéticas para asignar su carácter patógeno en ADPKD y así aumentar la precisión de estudios diagnósticos y poblacionales.

0284 (104) ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL Y ÁCIDO LIPOICO: EFECTO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN RIÑÓN. M C Cimolai ¹, V Vanasco ¹, P Evelson ¹, S Alvarez ¹

¹Programa de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires <salvarez@ffyba.uba.ar>

La endotoxemia es un paradigma de inflamación aguda generalizada que cursa con aumentos masivos de óxido nítrico (NO) y citoquinas inflamatorias en fluidos biológicos, daño sistémico al endotelio vascular y respiración tisular inadecuada aunque la pO_2 sea normal. En trabajos previos hemos demostrado que existe una disfunción mitocondrial asociada al aumento de producción de óxido nítrico en corazón, hígado y diafragma en un modelo experimental de endotoxemia. El objetivo de este trabajo fue analizar el estrés oxidativo y disfunción bioenergética en riñón en ratas tratadas con

LPS (lipopolisacárido 026:B6) y evaluar la efectividad terapéutica del ácido lipoico (LA). Ratas hembra Sprague-Dowley (180 g) fueron inyectadas con LPS (10 mg/kg) y/o LA (100 mg/kg); luego de 6 hs se sacrificaron los animales y se les extrajeron los riñones. En los riñones de animales endotoxémicos: a) se observó una disminución del 20% ($p < 0,05$, control: 1610 ± 121 ng-atO/min. mg) en el consumo de oxígeno en cortes de tejido; b) no se observaron diferencias significativas (con respecto al control) en el daño oxidativo a lípidos; c) un aumento de 15% en la producción mitocondrial de NO ($p < 0,05$, control: $0,345 \pm 0,039$ nmolNO/min.mg.prot); d) actividad disminuida (15%-30%) de los complejos mitocondriales I, II y IV. El tratamiento con LA restituye la producción de NO a valores control, y revierte parcialmente la disminución observada en la actividad de los complejos respiratorios en animales endotoxémicos. Los datos presentados sugieren que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial estarían asociados a la disfunción orgánica (renal) en procesos sépticos, y que el LA es una estrategia terapéutica a ser considerada en síndromes inflamatorios (como la endotoxemia).

0285 (529) INDUCCIÓN DE LA VÍA MITOCONDRIAL DE APOPTOSIS ASOCIADA A LA DISMINUCIÓN DE NHE1 EN NEFROPATÍA OBSTRUCTIVA NEONATAL. EFECTO DE LOSARTAN. V Bocanegra ^{1,2}, W Manucha ^{1,2}, A Vincenti ³, M Fornés ³, P Vallés ^{1,2}

¹Fisiopatología; ²Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo; ³CONICET <mvbocanegra@fcm.uncu.edu.ar>

Introducción: El Sistema Renina Angiotensina (RAS) interviene en la progresión de la injuria renal por obstrucción ureteral unilateral (UOU). La injuria mecánica resultante de la UOU induce apoptosis e incluye incremento de presión intraluminal con consecuente dilatación de la luz tubular y deformación celular. NHE_1 es vital para la regulación del volumen celular. **Objetivos:** Evaluar la participación de NHE_1 en la regulación de apoptosis en UOU neonatal y la modificación inducida por la inhibición de receptores AT_1 y AT_2 de Angiotensina II. **Materiales y Métodos:** Ratas de 48 hs de vida sometidas a OUU (O) u operación simulada (C) por 14 días recibieron inhibidor AT_1 , losartan, 10mg/kg/d (CL/OL), o inhibidor AT_2 , PD123319 (CP/OP) o vehículo (CH/OH). Se realizó TUNEL, microscopía electrónica, western blot (NHE_1 y NHE_3 , Bax, Bcl2, Procaspasa3 y Caspasa3) y actividad de Caspasa 3. **Resultados:** TUNEL: incremento de apoptosis (cel/mm²) en células epiteliales de túbulo colectores corticales (CCD) en OH vs CH, $p < 0,001$. Persistencia de apoptosis en CCD de OH vs OL: $23 \pm 1,22$ vs $20 \pm 0,81$, corroborada por microscopía electrónica. PD123319: sin cambios significativos. WB: Descenso de NHE_1 en membrana de corteza OH vs CH: $33,4 \pm 6,81$, n:4, $p < 0,001$. La inhibición de NHE_1 por dosis crecientes de EIPA indujo apoptosis y actividad de caspasa 3 incrementada. Persistió la disminución de NHE_1 en OL: $27 \pm 6,71$, n:4. NHE_3 no mostró diferencias significativas entre grupos. El incremento en el ratio Bax/Bcl2, asociado a una disminución en la expresión de procaspasa 3 y aumento de expresión y actividad de caspasa 3; permitió demostrar activación de la vía mitocondrial de apoptosis en corteza de OH y OL. **Conclusión:** Nuestros Resultados demuestran que la ausencia de reversión del proceso de apoptosis por vía mitocondrial luego de la administración de Losartan incluye descenso de la expresión de NHE_1 en UOU neonatal. Sugerimos evitar la administración de losartan en nefropatía obstructiva neonatal temprana.

0286 (560) EFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL TEMPOL EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN AGUDA POR SOBRECARGA SALINA ASOCIADO A MAYOR NATRIURESIS Y DIURESIS. S L Della Penna ¹, M I Rosón ¹, G C Cao ², S Gorzalczy ³, J E Toblli ², B E Fernández ¹

¹Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán; ³Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <silvanadellapenna@gmail.com>

Hemos descripto que una sobrecarga aguda de sodio provoca hiperfiltración glomerular, mayor reabsorción tubular de sodio y expresión de marcadores pro-inflamatorios (Kidney Int 70:1439-46,2006). Considerando que modificaciones en la velocidad de flujo o la distensión de la célula epitelial tubular renal generan estrés oxidativo y que el anión superóxido es capaz de incrementar el transporte epitelial de sodio, estudiamos si el tempol, mimético de la superóxido dismutasa es capaz de prevenir dicha respuesta. Se utilizaron ratas SD (300-350g) anestesiadas e infundidas durante 2 hs (veloc: 0,04 ml/min): grupos C (solución fisiológica), Na (NaCl 1,0M) y Na+Temp (NaCl 1,0M+tempol 50 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 100\text{g peso}^{-1}$). Se determinaron presión arterial directa, parámetros de función renal y la expresión de Angiotensina II (Ang II), factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), RANTES, NF- κ B, y factor de crecimiento transformante b1 (TGF- β 1) por inmunohistoquímica. El tempol incrementó el flujo urinario ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, C: 20,6 \pm 0,9, Na: 301,7 \pm 12,7 y Na+Temp 430,9 \pm 33,7, $p<0.001$ vs Na) y la excreción urinaria de sodio ($\mu\text{Eq}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, C: 1,5 \pm 0,2, Na: 97,5 \pm 4,8 y Na+Temp: 146,6 \pm 11,5, $p<0.001$ vs Na). La presión arterial media no se modificó. El tempol inhibió en forma generalizada en todos los segmentos tubulares, la mayor expresión de Ang II, HIF-1 α , NF- κ B y TGF- β 1 observados en el grupo Na, (% Ang II, en túbulo proximal, C: 9,8 \pm 0,5, Na: 26,9 \pm 1,7, Na+Temp 8,15 \pm 0,5, $p<0.001$ vs Na; en túbulo colector, C: 6,7 \pm 0,5, Na: 21,4 \pm 0,5, Na+Temp: 5,1 \pm 0,1 $p<0.001$ vs Na), e inhibió parcialmente la expresión de RANTES en túbulo colector (% en túbulo proximal, C: 6,7 \pm 0,8, Na: 15,9 \pm 1,6 y Na+Temp: 18,8 \pm 3,2; en túbulo colector, C: 0,8 \pm 0,1, Na: 15,7 \pm 1,92 y Na+Temp: 8,885 \pm 0,35, $p<0.01$ vs Na). Se concluye que el tempol inhibe la expresión de marcadores pro-inflamatorios producidos por una sobrecarga salina y esta respuesta podría estar además asociada a su efecto sobre la función renal como diurético y natriurético.

0287 (576) EL LOSARTÁN ALTERA EL MECANISMO DE CONCENTRACIÓN URINARIA ADEMÁS DE DISMINUIR LA RESPUESTA INFLAMATORIA RENAL EN UN MODELO AGUDO DE SOBRECARGA SALINA. S L Della Penna¹, M I Rosón², G Cao³, M Pandolfo⁴, J E Toblli³, B E Fernández¹

¹Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ²Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CONICET; ³Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán; ⁴Cátedra de Bioquímica Clínica, INFIBIOQ <silvanadellapenna@gmail.com>

Está demostrado que la Angiotensina II (ANG II) además de regular el balance hidrosalino se comporta como una verdadera citoquina. Hemos descripto que una sobrecarga aguda de sodio incrementa los niveles de Ang II renal y la expresión de marcadores pro-inflamatorios (Kidney Int 70:1439-46,2006; Hypert Res 31: 707-15, 2008). Nuestro objetivo fue estudiar si el antagonista AT1, losartán puede prevenir dicha respuesta. Se utilizaron ratas SD (300-350g) anestesiadas e infundidas durante 2 hs (veloc: 0,04 ml/min): grupos C (solución fisiológica), Na (NaCl 1,0M) y Na+Los (NaCl 1,0M+Losartán 10mg/kg). Se midió presión arterial directa, parámetros de función renal y la expresión de Ang II, factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), RANTES, NF- κ B, y TGF- β 1 por inmunohistoquímica. El losartán incrementó el flujo urinario ($\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, C: 20,6 \pm 0,9, Na:301,7 \pm 12,7 y Na+Los: 424,5 \pm 22,9, $p<0.001$ vs Na) en mayor grado (41% vs 25%) que la excreción de sodio ($\mu\text{Eq}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, C:1,5 \pm 0,2, Na: 97,5 \pm 4,8 y Na+Los: 121,6 \pm 7,0, $p<0.01$ vs Na), disminuyendo así la capacidad de concentración urinaria de sodio (mEq.L⁻¹, C: 60 \pm 3, Na: 347 \pm 15 y Na+Los: 294 \pm 6, $p<0.01$). La presión arterial media disminuyó leve pero significativamente en el grupo Na-Los con respecto a los grupos C y Na. El losartán disminuyó la mayor expresión de Ang II, HIF-1 α y NF- κ B en túbulo proximal (TP) y colector (TC) observada en el grupo Na (% Ang II, en TP, C: 9,8 \pm 0,5, Na: 26,9 \pm 1,7, Na+Los: 14,9 \pm 1,9, $p<0.001$ vs Na; en TC, C: 6,7 \pm 0,5, Na: 21,4 \pm 0,5, Na+Los: 8,9 \pm 1,2, $p<0.001$ vs Na), mientras que no tuvo efecto en otros segmentos tubulares y sobre la expresión de RANTES y TGF- β 1. Se concluye que en un modelo agudo de sobrecarga salina, la Ang II intrarrenal, a través de receptores AT1, estaría involucrada en los

cambios de la función renal ligados al transporte de agua más que al del sodio, por lo que el efecto del losartán sería afectando principalmente al mecanismo de concentración urinaria además de la acción anti-inflamatoria.

0288 (636) LA ORQUIECTOMÍA ATENUA EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR EL ALUMINIO (AL) EN RATAS WISTAR MACHOS. S T Mahieu¹, M d C Contini¹, N Millen¹, V Azogaray¹, M Gonzalez¹

¹Facultad Bioquímica. UNL <smahieu@fcb.unl.edu.ar>

En trabajos previos hemos demostrado que el Al induce estrés oxidativo en tejido renal de ratas machos, efecto no observado en ratas hembras intactas u ovariectomizadas. Solo en machos, el Al aumenta la excreción de agua y Na. Nuestro objetivo fue evaluar si las diferencias de género observadas podrían ser dependientes de la presencia de testosterona (T). Se trabajó con ratas macho intactas (M), orquiectomizadas (Orq) y orquiectomizadas con implantes de T por 3 meses (Orq+T). Se distribuyeron en 5 grupos (c/u n=6): CM (control), C+Orq, M+Al (0,62 mg Al/100g peso ip por 3 meses), Orq+Al, Orq+T+Al. Se efectuaron balances de agua y sodio, y se obtuvo la capacidad de concentración urinaria con DDAVP. Se determinó la actividad de enzimas de membranas plasmáticas (ATPasa Na/K, GGT) y parámetros vinculados al estrés oxidativo (LPO: lipoperoxidación, GSH: glutation, G-Px: glutation peroxidasa, GR: glutation reductasa y CAT: catalasa). No se observaron diferencias entre CM y C+Orq en los estudios realizados. El Al aumentó la actividad ATPasa Na/K (imol Pi/h. mg prot) en grupos con T: CM: 18,8 \pm 0,3; M+Al: 25,5 \pm 0,6*; Orq+Al: 18,2 \pm 1,09; Orq+T+Al: 20,56 \pm 0,70*, y la concentración sérica de Aldosterona. Una reducción en la capacidad para concentrar la orina se observó en los tres grupos con Al: CM: 2413 \pm 74; M+Al: 1876 \pm 63*; Orq+Al: 1709 \pm 60*; Orq+T+Al: 1757 \pm 68*, así como un aumento en la excreción de agua y Na. El Al incrementó la LPO con reducción del contenido de GSH, de la actividad de G-Px y CAT tanto en M+Al como en Orq+Al+T. La Orq disminuyó la LPO, con aumento de GSH y de las actividades de GPx y de CAT. Los datos indican que la remoción de los testículos reduce la susceptibilidad del riñón al daño oxidativo inducido por el Al, si bien la T no estaría directamente involucrada en las alteraciones ocasionadas por el cation en las excreciones de agua y sodio, ni en la capacidad para concentrar la orina.

NEUROCIENCIAS 01

0289 (69) LOBULO PREFRONTAL: VARIACIONES CON LA EDAD DE LA LONGITUD DE SEGMENTOS RADIALES TRAZADOS EN IMÁGENES PARASAGITALES DE RESONANCIA MAGNÉTICA. A B Merlo¹, E Gómez¹, A Albanese¹, J Miño¹, A Ingratta¹, T Mascitti¹, E Albanese¹

¹Facultad de Medicina. Universidad del Salvador <amerlo@salvador.edu.ar>

La bibliografía muestra disminución del volumen cerebral con el avance de la edad. Las variaciones en el lóbulo prefrontal son particularmente interesantes por las funciones relacionadas con él. **Objetivo:** determinar por rango de edad la longitud de segmentos radiales trazados en imágenes parasagitales de resonancia magnética del lóbulo prefrontal de ambos hemisferios. Se procesaron por el programa Scion Image for Windows imágenes parasagitales de resonancia magnética de 38 casos femeninos de 41 a 84 años sin enfermedades neurológicas o psiquiátricas. Se trazaron y midieron en la región prefrontal de cada hemisferio 7 segmentos que se extendían entre el extremo anterior del cuerpo caloso y el borde del cerebro, formando entre sí ángulos de 30 grados que cubrían toda la superficie de la imagen prefrontal. De dorsal a ventral fueron numerados de 1 a 7. Se determinaron por hemisferio los coeficientes de correlación de Pearson (r) y su significación estadística entre edad (41-84 años) y longitud de cada segmento. En ambos hemisferios los r son negativos. Son

estadísticamente significativos todos los del hemisferio derecho y los correspondientes a los segmentos 1 y 4 del izquierdo. La suma (media \pm ES) de los 7 segmentos del hemisferio derecho es para los grupos de 41-60 años y 61-84 años 23.69 ± 0.25 cm y 21.65 ± 0.30 cm y para el izquierdo 22.53 ± 0.34 y 21.15 ± 0.23 cm. Entre los grupos de 41-60 y 61-84 años la suma de segmentos homolaterales presenta, en ambos hemisferios, diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$ ANOVA). **CONCLUSIÓN:** La longitud de segmentos radiales trazados sobre imágenes del lóbulo prefrontal muestra disminuciones significativas con el avance de la edad. Los efectos más relevantes se observan en el hemisferio derecho.

0290 (108) DISTRIBUCIÓN DE DEPÓSITOS DE β -AMILOIDE EN SUJETOS CON DIFERENTES NIVELES COGNITIVOS. RELACIÓN CON LOS NUEVOS METODOLOGÍAS DE CONTRASTE UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DEL AMILOIDE CON NEUROIMÁGENES. M A Riudavets¹, S Resnick², O Pletnikova³, R O'Brien⁴, G Sevlever⁵, J Troncoso⁴

¹Departamento de Neuropatología, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI); ²Laboratory of Personality and Cognition, National Institute of Aging, Baltimore, USA.; ³Division of Neuropathology, Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA.; ⁴Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA.; ⁵Departamento de Neuropatología y Departamento de Docencia e Investigación, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI), Buenos Aires, Argentina. <mriudavets@fleni.org.ar>

Introducción: El estudio de un paciente con demencia tipo Alzheimer se basa en tests cognitivos, en neuroimágenes y en el estudio neuropatológico del SNC. Los tests aportan el probable diagnóstico y pueden clasificar los pacientes de acuerdo al nivel cognitivo. Por otro lado las neuroimágenes en los últimos tiempos han ido sumando la utilización de sustancias de contraste muy específicas para el β -Amiloide (i.e. PIB); estos estudios con contraste han mostrado diversos patrones de depósito en diferentes zonas del cerebro en sujetos con diversos estadios cognitivos. **Objetivos:** Nuestro principal objetivo es brindar una base desde la histopatología de la distribución de tales depósitos en función de los cambios cognitivos. **Diseño:** Se realizó tinción con Tioflavina, e inmunomarcación para β -Amiloide en diferentes áreas de 29 cerebros de sujetos que tuvieron diversos niveles cognitivos (CDR=0, CDR=0.5 y CDR=1) provenientes del BLSA*. Se estudiaron imágenes histológicas con analizador de imágenes. Los tests estadísticos fueron: Kruskal-Wallis, Cohen y Spearman. **Resultados:** La diferencia en la cantidad de placas neuríticas entre los casos de demencia y los controles fue significativa, no así los depósitos difusos. La cantidad de placas neuríticas en la corteza frontal, temporal, entorrinal e hipocampo no tuvo diferencias significativas entre los casos de demencia, y la cantidad de placas neuríticas presentes en tales áreas demostraron tener mejor correlación con el status cognitivo. **Conclusiones:** Los hallazgos neuropatológicos con tioflavina son similares a los descriptos por los estudios de neuroimágenes. Se confirma histopatológicamente la idea de que los sujetos con cambios cognitivos mínimos se hallan entre los sujetos con demencia y Controles. *BLSA: Baltimore Longitudinal Study of Aging

0291 (607) REGULACIÓN AUTONÓMICA DEL RITMO SINUSAL EN LA EXPOSICIÓN A DISTINTOS ESTÍMULOS MUSICALES. D E Vigo^{1,2}, N Dome³, A Alvarez Delvenne³, N Braidot³, D P Cardinali^{1,2}

¹Laboratorio de Neurociencias, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ²CONICET; ³Brain Decision Braidot Center <dvigo@fmed.uba.ar>

Introducción: La actividad del sistema nervioso autónomo en respuesta a estímulos musicales calmos se relaciona, en general, con una activación del sistema nervioso parasimpático. Si bien estos estímulos pueden determinar distintas preferencias concientes, se desconoce si también se pueden presentar distintos patrones de respuesta autonómica. **Objetivo:** Analizar la actividad autonómica cardíaca en respuesta a distintos estímulos musicales calmos. **Metodologías:** Se analizaron 28 voluntarios sanos. Cada sujeto fue expuesto en forma aleatoria y consecutiva durante tres minutos y medio a un período de silencio y a tres melodías, una clásica, otra de relajación y una balada. Se registró la duración del intervalo RR mediante un Holter Cardíaco Holtech HCAA 348.1 (Servicios Computados S.A., Buenos Aires). Se evaluó la función autonómica mediante el cálculo de indicadores lineales y no lineales de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC): frecuencia cardíaca media (RRm); VFC global (SDNN); VFC de baja frecuencia, (LF, LF%); VFC de alta frecuencia (HF, HF%), VFC no lineal (ás, Sampen). Se buscaron diferencias entre los distintos estímulos mediante un análisis ANOVA de medidas repetidas seguido de un test post hoc de Bonferroni. **Resultados:** La respuesta autonómica cardíaca fue significativamente distinta en relación a la melodía de relajación, observándose un menor HF% ($p < 0.004$), mayor as ($p < 0.006$) y menor Sampen ($p < 0.002$). **Conclusión:** El patrón de VFC observado en relación a la melodía de relajación es consistente con la una alta sincronización cardiopulmonar, similar a la observada durante estados de meditación. A su vez, esto puede tener relevancia clínica, en tanto los estados de meditación modulan la respuesta fisiológica al estrés y se asocian con una mejoría de parámetros fisiológicos en patologías como el síndrome metabólico.

0292 (126) MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN NORADRENERGICA POR ENDOTELINAS EXOGENAS EN EL BULBO OLFATORIO DE RATAS DOCA-SAL. I Abramoff¹, M A Batistone¹, S Nabhen¹, G Perfume¹, S Hope¹, M J Guil¹, L Bianciotti¹, M Vatta¹

¹Catedra de Fisiología, IQUIMEFA <tabramoff@ffybu.uba.ar>

En trabajos previos demostramos que las endotelinas (ETs) modulan la transmisión noradrenérgica en el bulbo olfatorio (BO) de ratas normotensas. Sobre esta base, el objetivo del presente trabajo fue dilucidar los efectos de las ETs aplicadas exógenamente en el BO derecho e izquierdo (BOD y BOI) en ratas hipertensas DOCA-Sal. Se estudió la actividad de tirosina hidroxilasa (TH) y la expresión de esta enzima por Western blot. Los Resultados se expresan como % con respecto al control, el estadístico usado fue ANOVA de dos factores con efectos simples y test Student Newman Keuls. Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0,05$. Los Resultados muestran que en BOD de ratas DOCA-Sal, la actividad y expresión de TH se incrementó un 40% y un 145% ($p < 0,001$ $n = 8$) respectivamente. En el BOI la actividad de TH se encuentra aumentada en animales DOCA-sal en un 25% ($p < 0,001$ $n = 8$) sin observarse modificaciones en la expresión. Cuando BOD y BOI se incubaron en presencia de 10 nM de ET1 y ET3 se observó que en animales normotensos hay un aumento del 25% en la actividad de TH mientras que en los DOCA-sal el tratamiento disminuye la actividad de TH en el BOD un 31% ($p < 0,001$ $n = 8$). Los datos obtenidos hasta el presente muestran que en BO de ratas DOCA-Sal la actividad y expresión de TH está modificada. Además las ETs aplicadas exógenamente presentan comportamiento diferente en animales normotensos respecto a DOCA-Sal, siendo estos últimos diferentes en BOD respecto a BOI. El significado fisiológico y/o patológico de esta diferencia de comportamiento es desconocido.

0293 (32) EFECTO DE LOS ESTEROIDES SINTÉTICOS SOBRE LA UNIÓN DE MUSCIMOL A SINAPTOSOMAS.. M Rey¹, J Barutta¹, A S Veleiro², A A Ghini², G Burton², H Coirini³

¹INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL; ²DEP. QCA.ORG. UMYNFOR-FCEN-UBA; ³IBYME-DEP. BIOQ.HUM.-FMED-UBA <marianarey83@hotmail.com>

Ciertos esteroides producidos en el sistema nervioso central, tales como el 3 α -hidroxi-5 α -pregnano-20-ona (Alo) y su isómero

5 β (Preg), modulan al receptor GABAérgico. La administración de estos compuestos naturales no es útil para tratamientos prolongados debido a su rápida bio-transformación. El desarrollo de análogos sintéticos estables, con similar conformación y efecto sobre el receptor GABA_A, podrían resolver este problema. Estudios previos usando esteroides sintéticos con puentes de oxígeno indicaron que el 6,19-oxidopregnenone (Ns1) compite por el sitio de unión presente en el canal. El objetivo de este trabajo fue evaluar la interacción de este y el 1 α ,11 α -epoxyprogesterona (Ns2) y 1 β ,11 α -epoxy-5 α -pregnane (Ns3) sobre la unión de ³H-muscimol (MUS) al receptor GABA_A. Estos estudios fueron desarrollados con ensayos de competencia usando sinaptosomas purificados de homogenatos de corteza y cerebelo de rata. Los cambios en la unión de MUS (10nM) fueron evaluados con el agregado de concentraciones crecientes (25-1000 nM) de Alo, Preg, Ns1, Ns2 y Ns3. Las incubaciones se realizaron a 4°C por 1h y la unión no específica se determinó empleando 10mM GABA. La fracción unida fue separada por una filtración rápida a través de un filtro de fibra de vidrio usando un cosechador automático. El desplazamiento observado con Ns1 (conformación tipo Preg) y Ns3 (conformación tipo Alo), fue similar a Alo. Por otro lado Ns2 (conformación tipo Preg) se comportó como este último. Las IC₅₀ obtenidas fueron: Alo=22 \pm 2nM; Preg=118 \pm 40nM; Ns1=32 \pm 3nM; Ns2=58 \pm 5nM; Ns3=43 \pm 5nM. La capacidad de Ns1 de competir por la unión a MUS, aun cuando su conformación se asemeja Preg y el efecto previamente descrito sobre el canal de cloro, lo hacen considerar como un buen candidato para uso farmacológico. Estudios futuros 'in vitro' e 'in vivo' serán necesarios para validar a alguno de estos esteroides sintéticos como posibles drogas terapéuticas (PICT-727, PIP5349).

0294 (51) LA PROGESTERONA (PROG) ESTIMULA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS PROGENITORES DE OLIGODENDROCITOS (OPC) EN LA MÉDULA ESPINAL LESIONADA (SCI). F Labombarda^{1,2}, S Gonzalez^{1,2}, A Lima^{1,2}, P Roig^{1,2}, R Guennoun³, M Schumacher³, A De Nicola^{1,2}

¹LABORATORIO DE BIOQUÍMICA NEUROENDOCRINA, IBYME; ²DEP BIOQUÍMICA HUMANA, FAC MED, UBA; ³UMR 788 INSERM <flabombarda@hotmail.com>

La PROG es reconocida por sus acciones mielinizantes luego de la injuria del SNC. La injuria produce desmielinización por muerte de oligodendrocitos (OL) y ruptura de mielina. La remielinización requiere de la proliferación y diferenciación de los OPC en OL, sin embargo este proceso es limitado luego de la injuria. Para estudiar las acciones remielinizantes del esteroide, administramos PROG (16mg/kg/día) a ratas con completa SCI durante 21 días. Para determinar si las células que se dividieron a los 2 y 3 días después de la lesión, se diferenciaron en OL maduros (células CC1+), se administró bromodeoxyuridina (BrdU, 200mg/kg ip) durante 48 y 72 hs post-lesión. Los animales fueron sacrificados 18 días después de la última inyección de BrdU y procesados para estudiar la colocalización de CC1 y BrdU por microscopía confocal. Se contó el número de células CC1+ y CC1+/BrdU+ (OL diferenciados) en un área fija (50.000 μ m²) de la sustancia blanca por debajo del nivel de la lesión. El número de OL disminuyó en el grupo SCI (39.67 \pm 7.17 vs CTL: 75.09 \pm 8.78 p<0.01, ANOVA), mientras que la PROG lo restauró (78.60 \pm 7.13 vs SCI, p<0.001, ANOVA). El 45% de las células CC1+ en el grupo SCI+PROG fueron también BrdU+, indicando la presencia de nuevos OL diferenciados. Por lo tanto la PROG restauró el número de OL promoviendo la diferenciación de células que se dividieron a los 2 y 3 días luego de la injuria. En el grupo CTL y SCI solo el 6-11 % de las células CC1 fueron CC1+/BrdU+, indicando un pobre diferenciación. Esto nos permite concluir que la PROG estimula la remielinización en la médula espinal lesionada mediante la diferenciación del linaje oligodendroglial, abriendo nuevas perspectivas terapéuticas para el tratamiento de la desmielinización

0295(242) EFECTOS DE TETRAHIDROPROGESTERONA (THP) EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENFERMEDAD DE MOTONEURONA. M C Gonzalez Deniselle^{1,2}, M Meyer¹, L I Garay^{1,2}, G Gargiulo Monachelli¹, S L Gonzalez^{1,2}, P Roig¹, R Guennon³, M Schumacher³, A F De Nicola^{1,2}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; ²Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; ³INSERM U488, Kremlin-Bicêtre, Francia <mcongza@dna.uba.ar>

La progesterona (PROG) actúa a través de receptores clásicos, de membrana, o por transformación en su derivado reducido tetrahidroprogesterona (THP). Previamente, demostramos efectos neuroprotectores de PROG en la médula espinal del Wobbler (Wr), modelo murino de esclerosis lateral amiotrófica. El objetivo fue analizar si PROG y THP modulan idénticos parámetros. Para ello, un grupo de Wr y controles permaneció libre de tratamiento y otro grupo recibió PROG (20 mg por pellet s.c.) por 18 días o THP por 5 días (4 mg/kg s.c.). Se estudió la actividad de NADPH-diaforasa/óxido nítrico sintasa (NOS), la expresión del ARNm para la subunidad alfa₃ de la enzima Na⁺, K⁺ ATPasa, esencial en la neurotransmisión y la expresión del factor derivado del cerebro (BDNF) y su receptor Trk B. El número de células con actividad NADPH-diaforasa / área aumentó 2.4 veces en Wr en relación a control (19.89 \pm 2.8 vs 8.4 \pm 1.4, p<0.01); mientras que ambos esteroides redujeron significativamente este parámetro en Wr (Wr PROG: 13.21 \pm 0.8 vs Wr, p<0.05; Wr THP: 9.77 \pm 1.2 vs Wr, p<0.01). El ARNm para alfa₃-Na⁺, K⁺ ATPasa disminuyó significativamente en Wr vs control (0.08 \pm 0.01 vs 0.12 \pm 0.01 granos /área, p<0.001). PROG y THP incrementaron este parámetro en Wr (Wr PROG: 0.14 \pm 0.01 vs Wr, p<0.001; Wr THP: 0.14 \pm 0.002 vs Wr, p<0.001). La hipoxpresión de BDNF en Wr no fue modificada por PROG o THP en los tiempos estudiados, aunque se observó una reducción significativa de la expresión de su receptor Trk-B en Wr vs control (0.05 \pm 0.003 vs 0.09 \pm 0.003, p<0.001) y una regulación positiva de este parámetro por PROG y THP (Wr PROG: 0.11 \pm 0.004 vs Wr, p<0.001; Wr THP: 0.09 \pm 0.005 vs Wr, p<0.001). Conclusión: Los efectos neuroprotectores de PROG podrían estar mediados en parte por su transformación a THP, un esteroide agonista gabaérgico y antagonista glutamatérgico.

0296 (659) LA ACIL-COA SINTETASA 4 (ACS4) Y LA ACIL-COA TIOESTERASA MITOCONDRIAL (ACOT2), GENERADORAS DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO INTRAMITOCONDRIAL, COMO POSIBLES REGULADORAS DE LA SÍNTESIS DE NEUROESTEROIDES EN ASTROCITOS DE CEREBELO. J G Mild¹, M J Pérez², A Lago¹, J M Pasquini², E F Soto³, E J Podestá¹, P M Maloberti¹

¹IIMHNO, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; ²IIMHNO, Departamento de Química Biológica Patológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.; ³IIMHNO, Departamento de Química Biológica Patológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <jesymild@hotmail.com>

El mecanismo molecular de la neuroesteroidogénesis a partir del colesterol no ha sido completamente descrito. Trabajos previos demostraron que cultivos primarios de astrocitos de cerebelo expresan las enzimas esteroideogénicas P450scc y 3 α -HSD y la proteína STAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein). Hemos descrito previamente, en células esteroideogénicas, una nueva vía de liberación de ácido araquidónico intramitocondrial en la cual participan ACS4 y Acot2. El ácido araquidónico y sus productos lipoxigenados intervienen en la regulación de STAR y la esteroideogénesis. El objetivo de este trabajo es estudiar la expresión y regulación de esta vía en células neuroesteroidogénicas. Se realizaron cultivos primarios de astrocitos de cerebelo de rata

postnatal P2. Se observó por inmunocitoquímica que ACS4 y Acot2 se expresan en astrocitos, utilizando como marcador del tipo celular la proteína ácida fibrilar glial. Los astrocitos fueron incubados con 8Br-AMPC (1mM) y la expresión de ACS4 y Acot 2 se analizó por Western blot y RT-PCR semicuantitativa. Se observó un incremento en los niveles de la proteína ACS4 a las 6 horas de estimulación ($6,73\pm 0,22$, $12,38\pm 0,33$, control vs 8Br-AMPC, unidades arbitrarias $p<0,05$). Por RT-PCR se observó un aumento del mensajero de ACS4 de un 50 % a las 6 horas y de un 200 % a las 12 horas respectivamente respecto del control. Se observó por Western blot un aumento en la expresión de Acot2 a las 6 horas de estimulación (200 % respecto del control). Por otro lado, se observó que la incubación con $17\text{-}\beta$ estradiol (10^{-9} M, durante 24 horas) regula la expresión de ambas enzimas. En concordancia con estudios que indican que los estrógenos estimulan la neuroesteroi-dogénesis y que el AMPc induce la expresión de StAR y la síntesis de esteroides en astrocitos, aquí demostramos que estos agentes también inducen la expresión de las enzimas generadoras de ácido araquidónico intramitocondrial, necesario para la regulación de StAR y la esteroidogénesis.

NEUROCIENCIAS 02

0297 (127) LA PERDIDA DE HETEROCIGOSIDAD EN 1P-19Q INDUCE UN CAMBIO GLOBAL EN LA EXPRESION GÉNICA DE TUMORES OLIGODENDROGLIALES. H Martinetto¹, R Ferrer-Luna², M Mata², L M Núñez¹, E Arias¹, J Calvar¹, M Riudavets³, N Arakaki¹, B Celda², G Sevlever¹

¹FLENI; ²Universitat de Valencia (UVEG), Valencia, España; ³Departamento de Neuropatología, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI) <hmartinetto@fleni.org.ar>

Introducción: Los tumores oligodendrogiales con pérdida de heterocigosidad (LOH) en 1p-19q muestran mayor sensibilidad a quimioterapia, siendo esta determinación un elemento clave para el diagnóstico y pronóstico de estos tumores. **Objetivo:** Analizar el perfil molecular de tumores oligodendrogiales y evaluar la posibilidad de desarrollar un método de clasificación complementario al análisis histopatológico. **Diseño:** Se determinó el perfil de expresión de 19 Oligodendrogliomas (OD) y 10 Oligoastrocitomas (OA) por técnica de microarrays. También se analizaron otras alteraciones genómicas como amplificación de EGFR, delección de CDKN2A/ARF, LOH en 10q y mutaciones en p53. **Resultados:** Los tumores con LOH en 1p-19q sobreexpresaron genes relacionados con neurogénesis. El grupo con 1p-19q intacto se caracterizó por sobreexpresar genes implicados en respuesta inmune, inflamación y proliferación. Este grupo puede subdividirse en dos subgrupos: uno sin mayores alteraciones genómicas (excepto mutaciones de p53) y con predominio de genes de respuesta inmune, y otro con alteraciones genómicas importantes y mayor expresión de genes proliferativos y de respuesta inmune. Este último subgrupo es el de peor evolución clínica. **Conclusión:** La LOH en 1p-19q produce un cambio global en la expresión génica llevando a un estado de mayor diferenciación, restringiendo la migración y proliferación celular. Los tumores con 1p-19q intacto exhiben características moleculares opuestas que explican su comportamiento más agresivo.

0298 (30) ESTUDIO COMPORTAMENTAL Y DE EXPRESIÓN DE MINERALOCORTICOIDE (MR) Y GLUCOCORTICOIDE (GR) EN RATAS WISTAR Y WKY FRENTE A DISTINTAS SITUACIONES DE ESTRÉS. P M Cassano¹, M Rios¹, P Argibay¹

¹Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires <paola.cassano@hospitalitaliano.org.ar>

Las ratas Wistar Kyoto (WKY) son uno de los modelos más aceptados para el estudio de la depresión. La prueba de natación

forzada (FST), es la prueba comportamental utilizada para el estudio de síntomas de esta enfermedad, basada en la observación de la movilidad de los animales cuando son forzados a nadar. El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), involucrado en la respuesta a estrés, estaría alterado en pacientes depresivos, predisponiendo a sufrir depresión debido a una falla en el sistema de retroalimentación negativa. Dicha regulación está dada por dos receptores de glucocorticoides, MR y GR, una disminución de estos receptores esta asociada a una hiperactividad del eje HPA asociado a la enfermedad depresiva. Nuestro objetivo fue estudiar las consecuencias en el FST y expresión de MR y GR frente a distintos tipos de estrés en ratas Wistar y WKY. Se sometieron ratas Wistar y WKY a distintas situaciones de estrés y se estudió el comportamiento de las mismas en el FST, se estudiaron los niveles de expresión de MR y GR por real time PCR. Existen diferencias innatas en la movilidad de las ratas Wistar con respecto a las Kyoto (prueba de t, $p<0,05$). Luego del estrés no hay diferencias para las Wistar con respecto a su movilidad anterior (prueba de t para datos pareados) pero sí existen diferencias significativas para las WKY (prueba de t para datos pareados, $p<0,05$). Los niveles de MR no fueron afectados por el estrés (ANOVA), pero sí los niveles de GR (ANOVA, $p<0,0001$), cuya expresión disminuye tanto para Wistar como para WKY luego de los diferentes tipos de estrés (Tukey test, $p<0,05$). Estos Resultados demuestran la participación del GR en la respuesta a estrés tanto en ratas Wistar como en WKY, a pesar de que las primeras, no presentan cambios a nivel comportamental en el FST. Por lo cual concluimos que posiblemente, la cepa WKY presenta diferencias motoras con respecto a las Wistar que no se correlacionan con cambios de expresión de los receptores estudiados.

0299 (505) PREGNENOLONA-S IMPIDE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS NOVEDOSOS CUANDO SE LA ADMINISTRA EN NUCLEO SEPTAL LATERAL DEL CEREBRO DE RATAS MACHO. F Nanfaro¹, V S Bazzocchini^{1,2}, S M Casas^{1,2}, A S Vega Orozco¹, F A Giuliani¹, J Gonzales¹, R J Cabreza^{1,2}, R Yunes^{1,2}

¹LINCE IMBECU CONICET. Area de Farmacología F.C. Medicas U.N.Cuyo; ²Centro de Investigaciones Superiores, Universidad de Mendoza <federiconanfaro@gmail.com>

La pregnenolona (Preg) y su forma sulfatada (PregS) son neuroesteroides (NE) moduladores de la actividad neuronal. Nuestro objetivo fue estudiar dichos NE en relación a la memoria para objetos en el núcleo septal lateral (NSL). Se utilizaron ratas machos divididos en cuatro grupos: 1) Control; 2) PregS 1,2 μ M; 3) AP7 1 μ g/ μ L; 4) Preg 1,2 μ M + AP7 1 μ g/ μ L. La administración de drogas (1 μ L) se realizó vía cánula implantada en NSL 30 minutos antes de realizar el ensayo. Posteriormente se dejó explorar al animal por 30 minutos una caja con dos objetos idénticos. Al día siguiente se colocó al animal en la caja con un objeto conocido (A1) y otro desconocido (B1). Se cuantificó el tiempo de exploración de ambos objetos y se utilizó el índice de exploración expresado en segundos ($d1=B1-A1$) como medida de discriminación entre el objeto novedoso y familiar. Los Resultados fueron analizados estadísticamente considerando significativo un valor de $p<0,05$. Nuestros Resultados muestran que PregS al igual que AP7 ejercen efectos moduladores en NSL impidiendo la discriminación del objeto novedoso ($0,75\pm 0,47$; $p<0,05$; $0,4\pm 1,12$; $p<0,05$ respectivamente). La administración de Preg 30 minutos antes de AP7 impidió el efecto amnésico inducido por AP7 ($5,55\pm 1,41$; $p>0,05$). Los Resultados con AP7 nos permiten sugerir la necesidad de un tono glutamatérgico basal en NSL para el reconocimiento de objetos novedosos. En apariencia, dicho tono glutamatérgico podría estar modulado positivamente por Preg. Por su parte, y dado que PregS inhibe el reconocimiento del objeto novedoso, es posible sugerir un mecanismo modulador dependiente de la sulfatación del NE y al mismo tiempo ver nuevas proyecciones de los NE sobre los mecanismos de aprendizaje y memoria.

0300 (116) PROGESTERONA REDUCE LA PATOLOGÍA AXONAL EN LA MEDULA ESPINAL DE RATONES CON ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE). L Garay^{1,2}, M C González Deniselle^{1,2}, A Lima^{1,2}, P Roig^{1,2}, A F De Nicola^{1,2}

¹Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; ²Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA. <lgaray@dna.uba.ar>

La EAE, modelo animal de esclerosis múltiple, presenta diversas alteraciones neuropatológicas que incluyen desmielinización, infiltración celular, astrocitosis, alteración axonal y disfunción neuronal. En trabajos previos, demostramos que la progesterona (PROG) redujo la severidad clínica, infiltración y desmielinización en la medula espinal (ME) de animales con EAE. Dado que el daño axonal acompaña las alteraciones clínicas, el objetivo de este trabajo fue dilucidar las acciones de PROG en la patología axonal de EAE. Para ello se trató un grupo de animales con un pellet de 100 mg de PROG (EAE+PROG) mientras que otro grupo permaneció sin tratamiento (EAE) y se analizaron los siguientes parámetros en la ME: a) la densidad de axones en cortes semifinos teñidos con azul de toluidina del funículo ventral, b) el número de axones + para la proteína precursora β amiloide (APP) como índice de degeneración axonal; y c) la expresión del ARNm para GAP 43 como medida del crecimiento axonal aberrante. Resultados: los animales tratados con la hormona mostraron un aumento en el N° de axones/área: grupo Control (CTRL): 191,8 \pm 4, EAE: 108,9 \pm 5,4; (p<0.001 vs. CTRL) y EAE+PROG: 152,9 \pm 5,9; (p<0.01 vs. EAE). Con respecto al N° de axones APP+, el grupo CTRL no presentó marca inmune, el grupo EAE mostró gran cantidad de axones dañados distribuidos en la sustancia blanca: EAE: 40,84 \pm 6,31, valor que disminuyó significativamente con el tratamiento de PROG: EAE+PROG: 18,81 \pm 2,29; p<0.004. Finalmente, la expresión del ARNm para GAP43 aumentó en los EAE con respecto al CTRL, viéndose una disminución significativa luego del tratamiento hormonal: CTRL: 0,025 \pm 0,003 vs. EAE: 0,0837 \pm 0,012; p<0.05; EAE+PROG: 0,043 \pm 0,009; p<0.05 vs. EAE. Conclusión: La PROG contribuyó al reestablecimiento de la densidad axonal y a la preservación de los axones, que conjuntamente con sus acciones promielinizantes (JSBMB, 2008) podrían contrarrestar las anomalías de la neurotransmisión halladas en la EAE.

0301 (122) REACTIVACIÓN DEL CICLO CELULAR EN ESTADIOS TEMPRANOS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. M A Riudavets¹, S Resnick², R O'Brien³, H Martinetto⁴, E Arias⁴, L Nuñez⁴, N Arakaki⁴, A L Taratuto⁴, G Sevlever^{5,6}, J Troncoso^{3,7}

¹Departamento de Neuropatología, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI); ²Laboratory of Personality and Cognition, National Institute of Aging, Baltimore, Maryland, USA.; ³Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA.; ⁴Departamento de Neuropatología, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI), Buenos Aires, Argentina.; ⁵Departamento de Neuropatología, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI), Buenos Aires, Argentina.; ⁶Departamento de Docencia e Investigación, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI); ⁷Division of Neuropathology, Department of Pathology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA <mrriudavets@fleni.org.ar>

Introducción: La re-entrada de las neuronas en el Ciclo Celular (CC) ha sido descrita como un evento en sujetos con Cambios Cognitivos Mínimos (MCI) y Enfermedad de Alzheimer (EA). **Objetivos:** El presente estudio está enfocado en lo que sucede a ese respecto aun antes, es decir, cuando los sujetos muestran neuropatológicamente lesiones características de EA, pero sin

alteraciones cognitivas, un estadio conocido como Enfermedad de Alzheimer asintomática (ASYMAD). **Diseño:** En tejido de autopsia realizamos inmunomarcación para comparar la expresión de ciertas proteínas del CC (Ciclina D1/2 y Ciclina B1) en Neuronas y Oligodendrocitos de la lámina V del Cíngulo Anterior (ACG) en ASYMAD, con EA, MCI, y Controles. El número de los elementos positivos fue evaluado con **Metodologías** estereológicas; y el estudio estadístico se realizó utilizando Chi-cuadrado y test exacto de Fisher. Resultados: Se observó un incremento significativo en la expresión neuronal de Ciclina D1/2 en ASYMAD comparada con OC, MCI y EA; y, en el caso de Ciclina B1, en MCI comparada con OC, ASYMAD y EA. La expresión en Oligodendrocitos se observó significativamente incrementada para ambas ciclinas en ASYMAD comparada con OC, MCI, y EA. **Conclusiones:** Creemos que la sobre-expresión de la Ciclina D1/2 en Neuronas de ASYMAD, y B1 en MCI refleja la reactivación del Ciclo Celular en estadios tempranos de la Enfermedad de Alzheimer, respetando la expresión en etapas sucesivas; podría estar relacionada con la injuria neuronal; extiende los hallazgos a un área del Cerebro y en un estadio inexplorado; y podría contribuir a la hipertrofia nuclear presente en esos estadios.

0302 (299) AGREGACIÓN DE PROTEÍNAS UBIQUITINADAS EN NEURONAS DE NEOESTRIADO POR HIPOXIA-ISQUEMIA.

V R Boti¹, M S Kruse¹, J Barutta¹, G E Saraceno², F Capani², H Coirini^{1,2}

¹INSTITUTO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL; ²Departamento de Bioquímica Humana FMED-UBA <u2girl_79@hotmail.com>

Una hipoxia-isquemia (HI) induce alteraciones estructurales en las neuronas que llevan a la muerte celular. Estos cambios han sido vinculados con agregación proteica y ubiquitinación. En estudios previos hemos observado acumulación de ubiquitina en neuronas del neocórtex mediante inmunocitoquímica y un aumento de Ub-P por western blot (WB) a 60 días de inducida la HI. El objetivo de este trabajo fue determinar si dichos cambios podrían manifestarse a corto plazo, empleando dos modelos de HI. Se obtuvieron ratas preñadas cuyos fetos a término fueron extraídos por cesárea e inmediatamente sometidos a una HI (baño térmico a 37°C) o bien utilizados como controles. A los 30 días postnatales fueron sacrificados y sus cerebros homogeneizados para ensayos de WB o fijados para estudios de inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo contra Ub-P. Alternativamente se empleó un modelo de cultivo organotípico utilizando neocórtex de ratas de 7 días de edad sometidos o no a una hipoxia (cámara anaeróbica saturada con N₂). A los 30 días de inducida la HI se observó un aumento en el número de células reactivas a Ub-P por inmunocitoquímica respecto al control y mayor expresión de Ub-P por WB. Resultados similares fueron observados en los cultivos organotípicos 24hs después de inducir la hipoxia con respecto al control. Estos Resultados demuestran que las neuronas del neocórtex son altamente sensibles y ubiquitinadas luego de una HI manifestando alteraciones estructurales que son evidentes tempranamente.

0303 (551) COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE UN TRATAMIENTO NO FARMACOLÓGICO (GRATIFICACIÓN) Y UN ANTIDEPRESIVO DE EFICACIA CONOCIDA (CLORIMIPRAMINA) EN LA RECUPERACIÓN DE LOS EFECTOS DELETÉREOS INDUCIDOS POR ESTRÉS CRÓNICO ALEATORIO EN RATAS MACHO ADULTAS. A S González Jatuff¹, D Adaro¹, A García¹, M Torrecilla¹, E L Rodríguez Echandiá²

¹IMBECU (CONICET-UNCuyo) Fac Cs Médicas - MENDOZA; ²Facultad de Ciencias Médicas- UNCuyo <ajatuff@fcm.uncu.edu.ar>

El estrés crónico aleatorio (SCA) es un modelo animal de depresión. La eficacia de los tratamientos antidepresivos en la etapa de recuperación es menos conocida que los aplicados simul-

táneamente; los datos sobre tratamientos no farmacológicos son también escasos. El presente trabajo evalúa parámetros motores, motivacionales, pro-conflictivos e intraestrés en ratas tratadas con tratamientos farmacológicos y no farmacológicos post SCA. **Metodología:** Ratas macho (2 meses) expuestas a distintos estresores (SCA, 14 días), y asignadas a uno de los siguientes tratamientos (13 días): 1) CIM (Clorimipramina, 3 mg/kg), en agua de bebida. 2) GRA (Gratificación), exposición diaria a estímulos gratificantes. 3) RE (Recuperación espontánea), sin tratamiento. En los días 11, 12 y 13 cada animal fue observado en: a) Hole board (HB), con medición de actividad motora. b) Brazo en cruz (BC). c) Natación forzada (NF). Al mes siguiente los animales fueron expuestos a estrés agudo sonoro durante el tercer minuto de una nueva observación en HB. Durante todo el tratamiento, y la semana siguiente se evaluó la preferencia por sucaryl (3/oo). Resultados: **Tempranos:** CIM: En NF, mayor frecuencia de saltos ($p < 0.01$) con respecto a RE. En BC, mejor desempeño. En HB, tendencia a menor Freezing y mayor Rearing (vs GRA, $p < 0.01$). GRA: Disminución del freezing (HB), y disminución de bolos fecales (BC). Sin variación en NF. **Tardíos:** El grupo RE mostró déficit posterior al estímulo sonoro, contrarrestado en los grupos tratados. GRA mostró mejores efectos sobre actividad motora, mientras que CIM, sobre la exploración. Test de preferencia: RE cercana al 50 %. CIM la incrementó y la mantuvo. **Conclusiones:** 1) Ambos tratamientos presentaron ventajas sobre RE, siendo CIM más eficaz que GRA. 2) CIM fue el único tratamiento que restauró la preferencia por sabores dulces, y la mantuvo. 3) Los efectos deletéreos de SCA persistieron en RE al mes siguiente, atenuada en los grupos tratados.

0304 (647) LA INTOXICACIÓN CRÓNICA CON PLOMO PRODUCE ALTERACIONES PERMANENTES EN LA MEMORIA ESPACIAL CONJUNTAMENTE CON ALTERACIONES SEROTONINÉRGICAS EN LA RATA ADULTA. P M Vargas¹, M K Cruz¹, R J Cabrera², L N Fracchia¹

¹Cátedra de Metodología de la Investigación - Facultad de Medicina de la UNT; ²LINCE-IMBECU-CONICET <pavargas@uolsinectis.com.ar>

Las alteraciones de la función cerebral inducidas por la intoxicación con plomo involucran entre otras a la neurotransmisión GABAérgica, dopaminérgica y serotoninérgica, siendo esta última de gran interés como uno de los principales mecanismos que median aprendizaje y memoria. Los objetivos del trabajo fueron evaluar la memoria espacial en relación con la dinámica de captación y liberación de serotonina de áreas cerebrales ricas en terminales serotoninérgicas de ratas que recibieron ingesta crónica de plomo. Se trabajó con ratas Wistar machos ($n=8$ /grupo) intoxicadas desde el destete y durante tres meses con 100 y 500 ppm de AcPb en el agua de bebida. Los controles recibieron agua potable. Se evaluó memoria espacial en el Laberinto Acuático de Morris y la funcionalidad serotoninérgica con la técnica de captación y liberación de ³H-serotonina (³H-5HT) de cortes de 200 μ m de áreas cerebrales ricas en proyecciones serotoninérgicas. Los Resultados se expresaron como la media \pm SEM y se analizaron estadísticamente por test de "t" y ANOVA1/Mann Whitney, considerando significativo $p = 0,05$. Se observó un aumento significativo del tiempo en los ensayos de recuperación de los animales tratados respecto de los controles a los 7 días del entrenamiento (100 ppm 96 ± 19 vs 29 ± 10 seg; $p < 0.01$) y (500 ppm 92 ± 17 vs 29 ± 10 seg; $p < 0.01$). No se observaron cambios en el índice de captación de serotonina en las dosis utilizadas; sin embargo una significativa disminución en la liberación de ³H-5HT fue observada en los animales intoxicados respecto de los controles (100 ppm 39.6 ± 3.65 vs 59.9 ± 7.7 ; $p < 0.03$) y (500 ppm 26.37 ± 3.93 vs 59.9 ± 7.7 ; $p < 0.001$). Concluimos que la intoxicación crónica con plomo a las dosis estudiadas produce alteraciones permanentes en la dinámica de liberación de serotonina de áreas cerebrales específicas involucradas en aprendizaje y memoria, lo que podría explicar en parte las alteraciones conductuales observadas en los animales intoxicados.

NEUROCIENCIAS O3

0305 (48) METABOLIZACIÓN DE 2-ARAQUIDONOILGLICEROL Y ARAQUIDONOILETANOLAMIDA POR MONOACILGLICÉRIDO LIPASA Y AMIDO HIDROLASA DE ACIDO GRASO EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. V L Gaveglio¹, N M Giusto¹, S J Pasquaré¹

¹INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS DE BAHÍA BLANCA <vgaveglio@criba.edu.ar>

Los ligandos, 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y araquidonoiletanolamida (AEA), son moléculas lipofílicas que actúan como neuroprotectores en enfermedades neurodegenerativas. El 2-AG es degradado enzimáticamente por la monoacilglicérido lipasa (MAGL) y la AEA por la ácido graso amido hidrolasa (FAAH). El objetivo de este trabajo fue caracterizar la actividad de MAGL y FAAH 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. Todas las preparaciones de membranas fueron obtenidas por centrifugación diferencial según los protocolos adecuados para cada caso. Las actividades de MAGL y FAAH se ensayaron empleando como sustratos 2-araquidonoil [³H]glicerol y araquidonoil [³H]etanolamina, respectivamente. La reacción enzimática se frenó con el agregado de cloroformo:metanol (1:1). Los productos [³H]glicerol y [³H]etanolamina fueron cuantificados a partir de la fase acuosa y los sustratos sin reaccionar fueron separados por cromatografía en capa fina y a partir de allí cuantificados. En sinaptosomas de corteza cerebral el 70% de 2-AG y el 7% de AEA fueron transformados por MAGL y FAAH, respectivamente. A concentraciones similares de sustratos, en sinaptosomas la actividad MAGL fue 8 veces mayor que la de FAAH. Llevando la concentración de AEA de 7 μ M a 17 μ M la actividad de FAAH aumenta aproximadamente 2 veces. Los estudios en fracción de membrana y soluble de cerebelo y cerebro mostraron una actividad de MAGL ligeramente menor en la fracción soluble. La actividad de FAAH solo se encontró en fracción de membrana y representa el 2,5% de la actividad MAGL de la misma fracción. Los Resultados hallados indican un activo metabolismo de 2-AG mediado por MAGL y una menor transformación de AEA por FAAH en SNC.

0306 (74) EFECTOS ANALGÉSICOS DE PROGESTERONA EN UN MODELO ANIMAL DE DOLOR NEUROPÁTICO DE ORIGEN CENTRAL. M F Coronel¹, F Labombarda^{1,2}, M J Villar³, A F De Nicola^{1,2}, S L Gonzalez^{1,2}

¹IBYME - CONICET; ²Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ³Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral <coronel@dna.uba.ar>

El dolor neuropático constituye un desafío terapéutico. En el presente trabajo evaluamos el efecto de progesterona (PG), esteroide neuroactivo, en un modelo de dolor neuropático, estudiando la conducta nociceptiva y la expresión de moléculas involucradas en la neurotransmisión del dolor. Ratas macho Sprague Dawley fueron empleadas como control (C; $n=7$) o sometidas a hemisección de su médula espinal (T13) y recibieron inyecciones diarias de vehículo (Hx; $n=10$) o PG (Hx+PG; 16 mg/kg sc; $n=10$). El desarrollo de alodinia mecánica y térmica se evaluó con los tests de von Frey y Choi. Los niveles de expresión de las subunidades NR1, NR2A y NR2B del receptor NMDA (NMDAR), la isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKCg), la pre-pro-dinorfina (ppD) y el receptor kappa opioide (KOR) se estudiaron mediante RT-PCR en tiempo real en la médula espinal dorsal caudal a la injuria (Resultados expresados como incrementos relativos al grupo C). A los 30 días, las ratas Hx presentaron alodinia mecánica y térmica y un incremento significativo en la expresión de todas las subunidades del NMDAR (NR1: 1.303 ± 0.069 ; NR2A: 1.667 ± 0.194 ; NR2B: 2.052 ± 0.200), PKCg (2.425 ± 0.180) y ppD (2.059 ± 0.350) ($p < 0.05$ vs C en todos los casos). No se modificó la expresión del KOR (1.017 ± 0.114 ; $p > 0.05$).

vs C). En el grupo Hx+PG se previno el desarrollo de alodinia mecánica y térmica, y los niveles de los ARNm de las subunidades del NMDAR (NR1: 0.824 ± 0.126 ; NR2A: 1.12 ± 0.11 ; NR2B: 0.987 ± 0.163) y de PKC γ fueron similares a los de animales controles ($p < 0.05$ vs Hx, $p > 0.05$ vs C). Los niveles de expresión de ppD se mantuvieron elevados ($p > 0.05$ vs Hx, $p < 0.05$ vs C) y se incrementó un 30% la expresión del KOR ($p < 0.05$ vs Hx, $p < 0.05$ vs C). PG, a través de la regulación de la expresión de los receptores NMDA y kappa opioide, podría ser de utilidad en la modulación del dolor neuropático de origen central (M808, UBACYT).

0307 (85) ALTERACIONES EN P-AKT Y PROTEÍNAS APOPTÓTICAS, EN CEREBRO EMBRIONARIO PROVENIENTE DE MADRES CON DIABETES EXPERIMENTAL. J

Barutta ¹, M S Kruse ¹, M Rey ¹, V Boti ^{1,2}, H Coirini ^{1,2}

¹INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL; ²DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA HUMANA FMED-UBA <barutta@dna.uba.ar>

Alteraciones en las vías de señalización intracelular en animales sometidos a un estado hiperglucémico, durante el período gestacional, han sido demostradas en saco vitelino, vena umbilical y tejido embrionario total, describiéndose una reducción en la activación de la proteína Akt y un incremento de la activación de las proteínas pro-apoptóticas JNK1/2 y Bax. La diabetes gestacional es una patología obstétrica cuyos efectos sobre la descendencia pueden ser de gravedad, sin embargo los efectos sobre el sistema nervioso central no han sido todavía suficientemente estudiados. El objetivo del presente trabajo consistió en determinar, en cerebro embrionario de madres diabéticas (CED), posibles alteraciones en vías de señalización intracelular y proteínas proapoptóticas. Se obtuvieron ratas preñadas (60 días), controles (vehículo) y diabéticas (por inyección intra-venosa de estreptozotocina 40mg/kg al día 1 de preñez). Al día gestacional 19 se realizaron cesáreas para la extracción de los fetos. Los cerebros de ambos grupos, fueron homogeneizados y sometidos a ensayos de western blot utilizando anticuerpos contra p-Akt, Bax y Caspasa-3. La inmunomarcación para p-Akt y Bax descendió en forma estadísticamente significativa en CED respecto de los controles ($p < 0,05$). La proteína Caspasa-3 también disminuyó aunque no significativamente. Se evaluó además la expresión de GFAP para determinar una posible reacción astrogliar, sin observarse cambios. Como conclusión, al igual que sucede en el saco vitelino o la vena umbilical en edades gestacionales más tempranas, la diabetes gestacional produjo una disminución de la p-Akt. Sin embargo, la proteína Bax también se encontró reducida, pudiendo ser este el resultado de la existencia de múltiples alteraciones en las vías de señalización que conducen a un proceso defectuoso de muerte celular programada. (PIP5349 - UBACYT-M020).

0308 (146) EFECTOS DE LA ENDOTELINA 1 (ET1) SOBRE LA DINAMICA DEL CALCIO INTRACELULAR EN EL NUCLEO SUPRAOPTICO (SON) DE RATA. G Perfume ¹, J Filosa ², L Bianciotti ¹, J Stern ², M Vatta ¹

¹Cátedras de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET) y Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA; ²Department of Physiology, Medical College of Georgia <guadalupeperfume@yahoo.com.ar>

Previamente observamos que la ET1 regula diversos pasos de la transmisión noradrenérgica en el hipotálamo anterior (HA), involucrando procesos Ca²⁺ dependientes. Sin embargo, dichos mecanismos todavía no están aclarados. Para determinar el papel de las ETs en la dinámica del Ca²⁺ intracelular, se utilizó la técnica de imágenes de Ca²⁺ por microscopía confocal en tiempo real y los experimentos se realizaron en el SON, un núcleo del HA relacionado con la regulación de la función neuroendócrina y cardiovascular. La ET1 100 nM produjo en aproximadamente el 60 % de las neuronas (N) y astrocitos (A) analizados, un pico de Ca²⁺ a los 116.0 ± 6.5 y 124.7 ± 7.2 seg, respectivamente. La am-

plitud media del pico fue de 1.9 ± 0.1 F/F0 (unidades de proporción) en N y 1.9 ± 0.2 F/F0 en A. En las restantes N y A analizadas, se observó que el pico de Ca²⁺ inducido por la aplicación de ET1 fue más tardío, tanto en N: 158.5 ± 30.2 seg como en A: 196.8 ± 15.6 seg y siendo su amplitud mayor (N: 2.4 ± 0.1 F/F0; A: 2.9 ± 0.2 F/F0). Para caracterizar los mecanismos intracelulares que subyacen el pico de Ca²⁺, dichos efectos fueron evaluados en diferentes condiciones. Se deplecionó el Ca²⁺ de los depósitos intracelulares con tapsigargina 1 mM 30 minutos antes y hasta el final del experimento. En estas condiciones, el pico y la amplitud de Ca²⁺ evocadas por ET1 fueron totalmente suprimidas. Además, los experimentos se realizaron en medio libre Ca²⁺ y el pico de Ca²⁺ inducido por ET-1 fue de 222.1 ± 67.2 seg en N y 225.3 ± 20.1 seg en A, mientras que la amplitud del mismo fue en N: 2.1 ± 0.1 F/F0 y A: 2.1 ± 0.4 F/F0, similar a la observada en condiciones normales. Se concluye que en N y A del SON, la ET1 induce la liberación de Ca²⁺ desde los depósitos intracelulares, mostrando dos tipos de respuesta con diferente latencia y magnitudes. (ANPCyT, CONICET y UBA: VM y BL; American Heart Association 0640092N: SJ)

0309 (158) DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO A FENOTIPO NEURAL: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA. A J Cardozo ¹, P F Argibay ¹

¹INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS Y MEDICINA EXPERIMENTAL - HOSPITAL ITALIANO DE BUENOS AIRES <johana.cardozo@hospitalitaliano.org.ar>

El sistema nervioso (SN) tiene capacidad de reparación limitada ya que la neurogénesis adulta se limita a ciertas regiones del cerebro. Ésto genera interés en utilizar células madre (CM) para reparar daños del SN. Trabajos recientes demostraron la diferenciación in vitro de células madre de tejido adiposo (ASCs) a fenotipo neural con factores involucrados en la neurogénesis embrionaria y adulta. Basado en esto, podría existir un paralelismo funcional entre neurogénesis y diferenciación de ASCs a fenotipo neural. **Objetivo:** Evaluar cambios en la expresión de Oct4, Sox2 y la cascada de Sonic Hedgehog (Shh) antes y luego de la diferenciación de hASCs a fenotipo neural. Se aisló y cultivó la fracción estromal-vascular de muestras de tejido adiposo humano. En el pasaje 5, se indujo la diferenciación a fenotipo neural y la misma se evaluó por cambios morfológicos e inmunocitoquímica. Se extrajo el ARN de las células antes y luego de la diferenciación para evaluar la expresión de diferentes genes (Ptc, Smo, Gli1, Gli2, Gli3, Oct4 y Sox2) utilizando PCR en tiempo real. En este trabajo se demostró que las hASCs tienen activa la cascada de Shh a través de la expresión de 5 genes y que su expresión disminuyó significativamente luego de la diferenciación, concordando con la participación de dicha cascada en la proliferación de CM y con el hecho que la proliferación disminuye durante la diferenciación. Además se encontró expresión de Oct4 en hASCs, la cual disminuyó significativamente post-inducción. Y, por último, la expresión de Sox2 aumentó significativamente luego de la diferenciación, apoyando el hecho de que las hASCs inducidas consolidaron su identidad neural, ya que este factor se ve aumentado en células progenitoras neurales. Estos Resultados pueden contribuir a la elucidación de los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neural de CM de tejidos adultos no neurales como posible alternativa a utilizar en la reparación del SN en enfermedades neurodegenerativas.

0310 (400) ALTERATION IN NGF MATURATION AND DEGRADATION IN SUBJECTS WITH MILD COGNITIVE IMPAIRMENT AND ALZHEIMER'S DISEASE. M A Bruno ¹, H Coirini ², E Mufson ³, A C Cuello ⁴

¹Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo; ²ByME-CONICET; ³Department of Neurological Sciences, Rush University Medical Center, Chicago, IL USA; ⁴ Department of Pharmacology and Therapeutics, Anatomy and Cell Biology, Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada <martinbruno_investigacion@uccuyo.edu.ar>

The basal forebrain cholinergic neurons (BFCN) are relevant to higher CNS functions such as learning and memory and its deficit are consistently recognized features of Alzheimer's disease (AD). Importantly, nerve growth factor (NGF) is the most important trophic factor for BFCN and alterations in NGF and its high-affinity receptor (TrkA) have been observed in early and late-stages of AD. In this regard, increased levels of the precursor form of NGF (proNGF) (Peng et al., 2004, Fahnstock et al., 2001) and loss of cortical TrkA (Counts & Mufson., 2005) have been found in subjects with Mild Cognitive Impairment (MCI) and AD. We have found in rodents the involvement of a protease cascade responsible for both the maturation of proNGF to mature NGF and for the degradation of NGF, due to the coordinated release and the action of plasmin and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) (Bruno & Cuello, 2006) Thus, it is plausible that alterations of this cascade in the CNS might cause or contribute to the remarkable vulnerability of BFCN in AD. In AD brains we observed a marked compromise of the protease system leading to alteration in the NGF maturation/degradation pathway, as compared with NCI age-matched controls. To further investigate if this alteration in the NGF maturation/degradation process is altered also in MCI brains, MMP-9 level and activity were analyzed in which proNGF accumulation were previously described. Accordingly, an up-regulation in the Frontal and Parietal cortex proMMP-9 and MMP-9 levels and activity were observed in MCI and AD compared with NCI age-matched controls. Moreover, Frontal cortex MMP-9 levels correlate with MMSE and Global Cognitive Score. Treating cognition as a categorical variable, both MMP-9 and proMMP-9 were significantly higher in MCI and AD than NCI. These alterations would explain the failure of NGF support and progressive atrophy of the BFCN associated with learning and memory decline observed at preclinical and early stages of AD.

0311 (662) EFECTOS DEL FACTOR GLIAL S100B SOBRE NEURONAS Y ASTROCITOS QUE EXPRESAN EL RECEPTOR RAGE: SU PAPEL EN LA COMUNICACIÓN NEUROGLIAL EN LA INJURIA CEREBRAL. A Villarreal¹, R X Aviles Reyes¹, M F Angelo¹, A Reines², A J Ramos¹

¹Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof Eduardo De Robertis, Facultad de; ²ININFA - CONICET <avillarreal.med@gmail.com>

En una situación de injuria cerebral, el factor S100B es secretado desde la glía, ejerciendo efectos sobre neuronas y astrocitos. S100B interactúa con el receptor multiligando RAGE, cuya expresión se induce en el cerebro en la zona de la injuria. La interacción RAGE-S100B parece ser capaz de inducir tanto la sobrevida neuronal y la proliferación de astrocitos, como la muerte neuronal dependiendo de la dosis. La señalización downstream de RAGE finalizaría en la activación de NFκB, aunque se desconoce si los efectos de S100B serían NFκB dependientes. En este trabajo estudiamos los efectos de S100B sobre neuronas y astrocitos y la activación del factor de transcripción NFκB. Consideramos que el nivel de activación de S100B-RAGE-NFκB determina la sobrevida neuronal. Cultivos primarios de neuronas corticales y astrocitos fueron tratados con distintas dosis de S100B recombinante (rS100B). Se estudio la expresión de RAGE y translocación de NFκB por inmunocitoquímica y Western Blot. Para analizar la activación de NFκB, se utilizó además un plásmido reportero NFκB -GFP. Las neuronas respondieron a S100B con el perfil de muerte/sobrevida descripto. Estos efectos son potenciados por una exposición previa a excitotoxicidad por glutamato, que además aumenta los niveles de expresión de RAGE. En astrocitos se observa un efecto mitótico e hipertrófico de rS100B, el cual es inhibido por sulfasalazina (bloqueante de NFκB). La activación de NFκB en astrocitos por rS100B dependió de la dosis y del tiempo de exposición. Solo en neuronas se vio un aumento de la expresión de RAGE con la exposición a rS100B. En células COS-7 que expresan RAGE o RAGEDcyt se mostró que los efectos de rS100B son dependientes de la porción citoplasmática de RAGE. Nuestros Resultados indicarían que la presencia de RAGE en neuronas y astrocitos los volvería sen-

sibles a S100B y así se produciría una activación local de NFκB en la zona de la lesión determinaría la reacción astrogliar y sobrevida neuronal.

NEUROCIENCIAS 04

0312 (8) LA EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO AUMENTA LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN EL HIPOCAMPO DE RATONES DIABÉTICOS TIPO 1. J Beauquis¹, P Roig¹, A F De Nicola^{2,3}, F Saravia^{2,3}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET; ²Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET; ³Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA <beauquis@dna.uba.ar>

La diabetes mellitus afecta múltiples sistemas entre los que se encuentra el sistema nervioso central, siendo el hipocampo una de las estructuras más vulnerables. La neurogénesis en el giro dentado (GD) del hipocampo es necesaria para procesos cognitivos. Previamente, en ratones diabéticos tipo 1 por estreptozotocina (STZ), encontramos neurogénesis disminuida en el GD y reversión con un tratamiento antidepressivo. En modelos animales de envejecimiento y depresión es posible aumentar la neurogénesis y mejorar el desempeño cognitivo mediante la exposición a un ambiente enriquecido (AE). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la exposición a un AE sobre la neurogénesis en el GD de ratones diabéticos por STZ. Ratones C57Bl/6 controles o diabéticos se alojaron en jaulas estándar (SC) o en un AE por 10 días que consistió en jaulas más grandes, con n mayor de animales por jaula, material para nidos, túneles, juguetes y casas plásticas. Se estudió la neurogénesis mediante una inyección de bromodeoxiuridina (BrdU) previa al inicio del AE y se realizó inmunohistoquímica para estudiar supervivencia celular (BrdU), diferenciación neuronal (BrdU, Tuj1, doublecortin-DCX) y longitud de procesos DCX+. Los animales diabéticos en SC mostraron una supervivencia celular disminuida en el GD y el AE produjo un marcado aumento (CTL-SC 1076±71.44; CTL-AE 1254±130.0; DIAB-SC 579.2±100.5, P<0.05 vs CTL-SC; DIAB-AE 1194±186.9, P<0.05 vs DIAB-SC; células BrdU+). La diferenciación neuronal fue menor en los animales diabéticos en SC y la exposición al AE la aumentó al valor de los controles. La longitud dendrítica en las neuronas DCX+ de animales diabéticos fue menor y el AE la elevó al nivel control. La exposición a un AE por 10 días resultó un potente estímulo aumentando la neurogénesis y la longitud dendrítica en el hipocampo de ratones diabéticos tipo 1. Los estudios explorando los mediadores moleculares y las alteraciones cognitivas potencialmente asociadas están en curso.

0313 (20) SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA REGULACIÓN DE OCITOCINA Y TNF PLASMÁTICOS EN INFECCIÓN. A De Laurentiis¹, J Fernández Solari¹, J P Prestifilippo¹, C E Mohn¹, V Rettori¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos Facultad de Medicina UBA <andredelaurentiis@yahoo.com>

La ocitocina (OT) es una neurohormona involucrada en numerosos procesos fisiológicos y es secretada en respuesta a estímulos nocivos como el estrés y la infección. Ha sido demostrado que los cannabinoides producen alteraciones neuroendócrinas en el eje hipotálamo hipofisario, indicando que los endocannabinoides (EC) son moléculas de importancia en el control neuroendócrino de la homeostasis y la reproducción, así como también en la respuesta al estrés e infección. Los EC son liberados en el núcleo supraóptico hipotalámico por las neuronas magnocelulares, más aún, los receptores de EC tipo CB1 han sido localizados en estas neuronas, sugiriendo la participación del sistema EC en la regulación de la secreción de OT. En estudios previos in vitro demostramos por primera vez que el EC anandamida (AEA) inhibe la secreción neurohipofisaria de OT por un mecanismo que involucra al óxido nítrico. Si bien, la administración central de AEA (50ng/5µl, icv, 1 hora)

no modificó significativamente los niveles plasmáticos de OT ni de TNF α , el objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación del sistema EC en la secreción de OT en un modelo de infección en rata macho adulta cepa Sprague Dawley (n=6-8 rata/grupo). El lipopolisacárido bacteriano (LPS, ip, 5mg/kg, 1hora) aumentó significativamente los niveles plasmáticos de OT (RIA) (C: 87.2 \pm 7.9; LPS: 140.0 \pm 18.3; pg/ml, p<0.05) y de TNF α (ELISA) (C: 0.24 \pm 0.13; LPS: 18.32 \pm 1.65, p<0.01). Ambos efectos estimulatorios son revertidos parcialmente (p<0.05) cuando simultáneamente con el LPS es administrado centralmente un antagonista de los receptores cannabinoides tipo CB1 (AM251, icv, 500ng/5 μ l) y también (p<0.01) cuando AM251 es administrado junto con un antagonista del receptor tipo CB2 (AM630, icv, 500ng/5 μ l). Nuestros Resultados indican que el sistema endocannabinoide sería el mediador del aumento en la secreción de OT y TNF α producidos durante la infección.

0314 (66) VALORES LINEALES EN FUNCIÓN DE LA EDAD RELACIONADOS CON LOS LÓBULOS FRONTAL Y PARIETOOCIPITAL, EL CUERPO CALLOSO Y LOS VENTRÍCULOS LATERALES EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA. A B Merlo ¹, E Albanese ¹, J Miño ¹, E Gómez ¹, A Ingratta ¹, T Mascitti ¹, A Albanese ¹

¹Facultad de Medicina, Universidad del Salvador; <amerlo@salvador.edu.ar>

La bibliografía muestra variaciones de volúmenes cerebrales con el avance de la edad. En trabajos anteriores demostramos también variaciones significativas uni y bidimensionales. **Objetivo:** cuantificar en imágenes parasagitales de resonancia magnética (IPRM) de cada hemisferio probables variaciones con el avance de la edad de longitudes relacionadas con el cuerpo calloso, los lóbulos frontal y parietooccipital, el ventrículo lateral y el hemisferio. En IPRM de cada hemisferio de 38 sujetos femeninos de 41 a 84 años con el programa Scion Image for Windows se trazó la recta h que pasa por los puntos más distantes del borde ventral del cuerpo calloso. Se marcaron los puntos A en la intersección de h con el borde rostral del cerebro, B y C con el borde dorsal y ventral del genu respectivamente, D y E con el borde ventral y dorsal del splenio respectivamente y F con el borde caudal del cerebro. Se midieron los segmentos limitados por puntos consecutivos cuya suma corresponde al valor de AF. Los valores (MEDIA \pm ES en cm) en el hemisferio derecho en los grupos de 41-60 y de 61-85 años son: AB 3.30 \pm 0.06 y 3.02 \pm 0.06, BC+DE 2.16 \pm 0.08 y 1.81 \pm 0.07, CD 5.49 \pm 0.11 y 5.95 \pm 0.10 y EF 4.50 \pm 0.10 y 4.47 \pm 0.11 y en el izquierdo son: AB 3.20 \pm 0.07 y 2.89 \pm 0.06, BC+DE 2.16 \pm 0.08 y 1.94 \pm 0.06, CD 5.71 \pm 0.06 y 5.92 \pm 0.08 y EF 4.55 \pm 0.11 y 4.62 \pm 0.13. Con el avance de la edad, en ambos hemisferios, disminuyen significativamente (ANOVA) BC+DE y AB e incrementa la CD. Los segmentos EF y AF no varían significativamente. Los coeficientes de correlación de Pearson entre dichos valores y la edad son compatibles con estos Resultados. **Conclusión:** Con el avance de la edad en ambos hemisferios las longitudes relacionadas con el cuerpo calloso y el lóbulo frontal disminuyen, la relacionada con el ventrículo lateral incrementa y no varía significativamente la relacionada con el lóbulo parietooccipital ni la relacionada con todo el hemisferio.

0315 (283) GLIOSIS REACTIVA Y ALTERACIONES NEURONALES TEMPRANAS EN UN MODELO DE APNEA DEL SUEÑO POR HIPOXIA INTERMITENTE: EVIDENCIAS DE UN DAÑO PRIMARIO AGUDO INDUCIDO POR LA HIPOXIA. R AvilésReyes ¹, M F Angelo ¹, A Villareal ¹, A J Ramos ¹

¹Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof De Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires <raviles@fmed.uba.ar>

La Apnea del Sueño (AS) es un grave problema para la salud pública por su alta prevalencia, morbilidad y mortalidad. La AS produce eventos repetitivos de cese de la respiración durante el sueño induciendo hipoxia intermitente (HI). Existe controversia so-

bre el origen de las alteraciones cognitivas que ocurren en estos pacientes, ya que algunos autores proponen que serían secundarias a la somnolencia diurna y la hipertensión que aparecen en la AS. Para estudiar si existe un daño primario cerebral inducido por la HI que sería responsable de las alteraciones cognitivas, analizamos los efectos de la HI en la corteza cerebral parietal e hipocampo que ocurren luego de 1, 3, 5, 10 días de exposición a HI. Ratas cepa Wistar se sometieron a HI en una cámara de hipoxia donde se alternó la condición hipoxica (90% N₂; 10% O₂) con normoxia (21%O₂; 79% N₂), con ciclos de 6 min durante la fase del sueño de las ratas. Luego se sacrificaron los animales y se realizó inmunocitoquímica y morfometría con marcadores gliales, neuronales y proteínas asociadas a la respuesta hipoxica. Los astrocitos hipocámpales y corticales respondieron a la HI con hipertrofia e hiperplasia típica de una gliosis reactiva que comienza en HI-1 (1 día de HI) y alcanza un plateau hacia HI-10. La expresión de S100B, factor glial soluble involucrado en la sobrevida neuronal, también se incrementó tempranamente mostrando dos picos en HI-3 y HI-10. La marcación para HIF-1 α , factor de transcripción asociado a la hipoxia, y de MDR-1 (un gen controlado por HIF-1 α) se incrementaron, demostrando la inducción de esta cascada clásica de hipoxia. En HI-3 se observaron alteraciones en los núcleos neuronales, activación de caspasas y reducción en la arborización dendrítica. Nuestros Resultados demuestran que la HI induce una respuesta de gliosis reactiva que precede a las alteraciones neuronales observadas en dos áreas cerebrales estrechamente relacionadas a las alteraciones cognitivas observadas en pacientes con AS.

0316 (321) LESIÓN EXPERIMENTAL DE LA MÉDULA ESPINAL SACRA EN LA RATA Y CORRELATO CLÍNICO-ELECTROFISIOLÓGICO. F Mannara ¹, S Figurelli ², P Pennisi ³, E Segura ¹, A Yorio ^{4 5}

¹IBYME, CONICET; ²Hospital J.A. Fernández (GCABA); ³CEDIE (CONICET); ⁴IBYME(CONICET); ⁵Hospital JA Fernández (GCABA) <fmannara@hotmail.com>

Introducción: En el marco de un proyecto destinado a investigar los efectos del tratamiento con factor insulino sémil tipo 1 (IGF-1) sobre la lesión espinal, el presente trabajo propone una metodología clínico-electrofisiológica en un modelo experimental de lesión en ratas de escasa morbimortalidad. **Objetivo:** Validar una metodología electrofisiológica para evaluar lesiones espinales en el nivel sacro. Diseño: Comparar la respuesta en los músculos de la cola a la estimulación del nervio caudal. Para ello se consignaron 2 grupos de ratas Sprague-Dawley: Controles y con lesión de médula espinal (transección de médula espinal correspondiente a metámera S1). Se verificó el nivel lesionado mediante evaluación clínica, neurofisiológica, histológica e inmunohistoquímica. Resultados: En los animales lesionados se observó a partir de la 3ra semana espasticidad progresiva a nivel de la cola. La estimulación y registro a nivel de la cola mostró diferencias significativas en las ondas M y F respecto a los controles. En la médula espinal de los animales lesionados se observó disminución del número de neuronas, degeneración neuronal, astrogliosis y cambios en marcadores histológicos (GFAP, Neu, S100). **Conclusiones:** Los cambios electroneurofisiológicos producidos por lesión espinal se asocian a modificaciones relevantes para la función y potencial regeneración funcional espinal. Las correlaciones clínicas, electroneurofisiológicas, histológicas y bioquímicas observadas pueden ser de utilidad para la evaluación de procedimientos terapéuticos en la lesión espinal.

0317 (455) MECANISMO DE PROTECCIÓN ENDÓGENA FRENTE AL DAÑO ISQUÉMICO RETINIANO: POSTCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO. D C Fernandez ¹, M Bordone ¹, H J Aldana Marcos ², R E Rosenstein ¹

¹Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; ²Laboratorio de Histología Facultad de Medicina Universidad de Morón <diegofil@yahoo.com.ar>

El postcondicionamiento isquémico (PostC) es un mecanismo de inducción de tolerancia isquémica que consiste en la aplicación de episodios breves de isquemia/reperfusión (Isq/Rep) luego del inicio de la reperfusión que sigue a un insulto isquémico prolongado. Se ha demostrado que el PostC reduce el área de infarto causada por una isquemia cerebral focal. El daño isquémico es un componente central de diversas enfermedades retinianas (trombosis de la vena central, retinopatía diabética, retinopatía por hipertensión arterial, entre otras) que constituyen causas frecuentes de ceguera irreversible. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto protector del PostC en un modelo de isquemia retiniana. La aplicación de 7 pulsos de Isq/Rep (1 min/1 min) luego de 5 min de una isquemia retiniana prolongada (45 min) provocó una reducción significativa del daño isquémico a nivel funcional (onda b del electroretinograma escotópico: Isq = 92 ± 42 mV, Isq + PostC = 258 ± 45 mV, $P < 0.01$) e histológico. El efecto protector del PostC varió en función del número de pulsos de Isq/Rep y provocó una protección duradera. La protección electroretinográfica fue significativa ($P < 0.01$) aún cuando el PostC se aplicó luego de 60 min de la isquemia. La inyección i.p. de cicloheximida (CHX, 0.4 mg/Kg) 1 min antes (pero no 6 h después) bloqueó el efecto protector del PostC tanto funcional ($P < 0.01$) como histológico. Asimismo, la inyección i.p. de aminoguanidina (AG, 100 mg/Kg), un inhibidor selectivo de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), bloqueó completamente ($P < 0.01$) el efecto protector del PostC sobre la función electroretinográfica (Isq + PostC + CHX 1 min = 66 ± 5 mV; Isq + PostC + CHX 6 h = 264 ± 15 mV; Isq + PostC + AG = 138 ± 21 mV). Esta es la primera demostración de que el PostC retiniano provee una protección robusta frente al daño funcional y morfológico causado por una isquemia prolongada, probablemente a través de un mecanismo dependiente de iNOS.

0318 (17) PAPEL DE LA HISTAMINA EN LA MODULACIÓN LATERALIZADA DE LA AMÍGDALA BASOLATERAL EN LA EXPLORACIÓN DE UN AMBIENTE CONFLICTIVO EN LA RATA. E O Alvarez Toro¹, A M Banzan¹

¹Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo <ealvarez@fcm.uncu.edu.ar>

Resultados previos de este laboratorio mostraron que los circuitos histaminérgicos de la amígdala basolateral (ABL) en la rata modulan lateralizadamente la exploración de ambientes novedosos neutros. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si estos mecanismos se expresan de la misma forma cuando el animal es expuesto a un ambiente conflictivo. Para ello, se trabajó con ratas macho adultas las que se implantaron bilateralmente con cánulas de microinyección en la ABL. Se aplicaron los siguientes tratamientos: [1] Salina (Sal) y Lidocaina (Lid): (a) animales con 2 μ g de Lid en la ABL izquierda y Sal en la ABL derecha (n=16); (b) Lid en ABL derecha y Sal en la izquierda (n=15); (c) Sal en ambas ABL como control (n=11). [2] Lid en ABL izquierda e histamina (HA) en la ABL derecha: (d) HA 9 nmol (n=10); (e) HA 45 nmol (n=13); (f) HA 90 nmol. [3] Lid en la ABL derecha e HA en la izquierda: (g) HA 9 nmol (n=13); (h) HA 45 nmol (n=10); (i) HA 90 nmol (n=13). 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 el laberinto en cruz elevado asimétrico durante 5 min. Los Resultados mostraron que la inactivación selectiva de la ABL izquierda o derecha modifica la exploración de los brazos (56.7 ± 6.2 seg Vs 5.7 ± 2.7 seg, brazo UP, grupo "b" Vs "c", $p < 0.01$). La estimulación con HA en la ABL derecha o izquierda con la ABL contralateral inactivada con Lid, reveló lateralización de la exploración en los brazos más conflictivos (33.9 ± 5.3 seg Vs 41.5 ± 5.3 seg, brazo UP, grupo "h" Vs "e", $p < 0.05$). Todos Resultados confirman la participación de HA y sugieren la lateralización de los circuitos neurales de la ABL para modular la exploración de ambientes conflictivos.

NEUROCIENCIAS P1

0319(419) ALLOPREGNANOLONA "IN VIVO" MODIFICA LA ACTIVIDAD DE LA 3 β -HSD EN HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL Y OVARIO DEPENDIENDO DEL CICLO ESTRAL. S M Casas^{1,2}, F Giuliani¹, R Yunes^{1,2}, R Cabrera^{1,2}, M Laconi¹

¹LINCE - IMBECU - CONICET, Área de Farmacología - FCM - Universidad Nacional de Cuyo; ²Centro de Investigaciones Superiores - Universidad de Mendoza <casas_sebastian@hotmail.com>

Allopregnanolona (Allo) es un neuroesteroide sintetizado por las células gliales y neuronales a partir de progesterona. En trabajos previos demostramos que Allo fue capaz de inhibir la apoptosis en el cuerpo lúteo de rata conjuntamente con la inhibición de la secreción de LH. Con el objetivo de estudiar si la actividad esteroidogénica hipotalámica es modulada por Allo, en forma semejante o no con la esteroidogénesis ovárica, es que administramos Allo intracerebroventricularmente (icv) y evaluamos la actividad de 3 β -HSD en ambos tejidos, en relación con las fluctuaciones endógenas de estrógenos (E2) y progesterona (P) del estro (E) y diestro 1 (D1) en la rata. Los animales fueron implantados en el 3^{er} ventrículo y 7 días posteriores se les seleccionó mediante frotis vaginal en E o D1. Posteriormente se les administró icv Allo 6 μ M o líquido cefalorraquídeo (LCR) como control. 30 minutos posteriores a la inyección fueron sacrificados por decapitación. El hipotálamo medio basal (HMB) y ovarios fueron removidos para evaluar la actividad enzimática por espectrofotometría. Los Resultados fueron expresados como la media \pm SEM (n=8/grupo) en mU/mg proteínas y analizados estadísticamente respecto del control por "t" Test. ($p < 0.05$ fue considerado significativo). Allo indujo una significativa disminución de la actividad enzimática en HMB durante el E (0.62 ± 0.13 vs 1.23 ± 0.2 $p < 0.03$) sin observar modificaciones en D1 (1.23 ± 0.45 vs 1.51 ± 0.36). En contraste con esto, la actividad aumentó significativamente en ovario tanto en E (19.0 ± 2.5 vs 11.0 ± 1.3 , $P < 0.0001$) como en D1 (Allo 8.0 ± 2.9 vs 3.0 ± 1.0 , $P < 0.03$). Concluimos que la administración central de un neuroesteroide derivado de progesterona modula en forma tejido dependiente la actividad 3 β -HSD, lo cual propone un nuevo mecanismo de acción de los neurosteroides como activos moduladores centrales y periféricos de mecanismos relacionados con la fisiología reproductiva en la rata hembra.

0320 (13) AMITRIPTILINA REVIERTE LA HIPERSECRECIÓN DE CORTICOSTERONA EN RESPUESTA AL ESTRÉS CRÓNICO EN RATAS ADULTAS QUE FUERON SEPARADAS TEMPRANAMENTE DE LA MADRE. E M Cotella¹, I Mestres Lascano¹, G M Levin², M M Suárez¹

¹Cátedra de Fisiología Animal, Fac. Cs. Ex. Fís y Nat, Universidad Nacional de Córdoba; ²Centro de Investigaciones Endocrinológicas C E D I E - C O N I C E T, Hospital de Niños R. Gutiérrez, Buenos Aires <evelincotella@gmail.com>

Las experiencias tempranas de la vida son determinantes para el desarrollo de las funciones cerebrales. En ratas los efectos de la separación materna temprana pueden evidenciarse en la etapa adulta, en alteraciones en la secreción de corticosterona frente a distintos estresores. Los cambios relacionados al estrés crónico en la señalización del eje HPA y del sistema límbico, pueden ser revertidos con el tratamiento con antidepresivos. En el presente trabajo se analizaron los niveles de corticosterona plasmática en ratas separadas de la madre (SM) y sometidas a un modelo de estrés crónico y variado (ECV) en la etapa adulta, esperando revertir los cambios en la secreción de corticosterona mediante la administración del antidepresivo Amitriptilina (AMI). Ratas Wistar macho fueron sometidas a SM 4,5 horas diarias durante 21 días y a ECV de adultas, 5 estresores diferentes du-

rante 24 días, durante el ECV se suministró oralmente AMI: 5mg/Kg y luego se evaluaron los niveles de corticosterona (C) plasmática mediante RIA. El ECV produjo un aumento en los niveles de C en los animales criados con la madre, aunque no significativo estadísticamente y no se evidenció efecto de AMI en estos animales. Cuando se aplicaron ambos protocolos conjuntamente, SM y ECV, se observó un aumento de C ($p < 0,05$) y el tratamiento con el antidepressivo AMI produjo una disminución en los valores de la hormona ($p < 0,05$), comparados con el control (vehículo). Por otro lado, si bien AMI disminuyó la C en los animales SM, estos no alcanzaron la significación estadística. En conclusión, la Amitriptilina revierte el aumento de la concentración de corticosterona en animales sometidos conjuntamente a separación materna y estrés crónico en la etapa adulta.

0321 (21) EFECTO DE LA SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA Y EL ESTRÉS CRÓNICO VARIABLE SOBRE LOS RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHO Y HEMBRA. G M Renard¹, M M Suárez¹

¹Cátedra de Fisiología Animal - FCFEYN - UNC <geormrenard@yahoo.com.ar>

El Hipocampo es una estructura nerviosa vulnerable al estrés, con una alta plasticidad y expresa altos niveles de receptores de glucocorticoides (GR) y mineralocorticoides (MR). Durante la exposición al estrés se activa el eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal (HPA), culminando con la liberación de corticosterona en ratas. Al aumentar la concentración de glucocorticoides circulantes, los MR se saturan por su alta afinidad y los glucocorticoides inician la retroalimentación negativa del eje HPA uniéndose a los GR en el Hipocampo. En el presente trabajo se estudió la expresión inmunohistoquímica de GR en el Hipocampo Dorsal de ratas macho y hembra con separación materna temprana y estrés crónico variable en etapa adulta. 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. A los 48 días de edad fueron sometidos a estrés crónico variable (5 estresores diferentes durante 24 días). El estrés crónico variable produjo un aumento del número de neuronas inmunoreactivas a GR (ir-GR) en las zonas CA2 F(1,24)=52,82 $p < 0,0001$ y CA3 F(1,24)=62,15 $p < 0,0001$ del Hipocampo de ratas machos. Con respecto a los animales sometidos a separación materna temprana y estrés crónico variable en etapa adulta observamos que, tanto en machos como en hembras, hay un aumento en el número de neuronas ir-GR en las zonas CA1 F(1,24)=73,23 $p < 0,0001$, CA2 F(1,24)=52,82 $p < 0,0001$ y CA3 F(1,24)=62,15 $p < 0,0001$ del Hipocampo. En cuanto a las diferencias entre machos y hembras observamos menor número de neuronas ir-GR en la zona CA1 de hembras separadas de la madre y sometidas a estrés crónico de adulto F(1,24)=28,53 $p < 0,0001$ y en la zona CA3 de hembras sometidas a estrés crónico variable F(1,24)=20,54 $p < 0,0001$, comparadas con los machos con igual tratamiento. En conclusión, este receptor GR se expresa en mayor nivel en situaciones de estrés físico y emocional en ambos sexos, siendo menor en hembras.

0322 (62) ROL DE LA MELATONINA SOBRE LA RESACA ALCOHÓLICA EXPERIMENTAL EN EL RATÓN: UNA HIPÓTESIS ESTROGÉNICA. A G Karadayian¹, L Vignolo¹, M A Ramos Lobo¹, M N Gobeto¹, P Scacchi Bernasconi¹, R A Cutrera¹

¹Facultad de Medicina UBA <analía11@hotmail.com>

En humanos, la resaca alcohólica tiene lugar luego de una ingesta copiosa de alcohol, presentando síntomas desagradables tales como dolores de cabeza, náuseas, diarrea, fatiga y temblores y alteraciones tanto cognitivas como visuales. En animales de experimentación, se observan también, fluctuaciones en la temperatura corporal, patrones de actividad, percepción del dolor y en comportamientos simil ansiedad. Además, es conocida la acción de la melatonina (MT) como agente neuroprotector y

antioxidante. El objetivo del presente trabajo fue estudiar precisamente el efecto de la MT sobre la resaca alcohólica evaluando la coordinación neuromuscular en el ratón. Para ello, se trabajó con ratones adultos de la cepa Swiss: machos intactos y hembras en tres condiciones, intactas, ovariectomizadas (OVX) y OVX con reemplazo estrogénico (10 ug/kg BW beta-estradiol s.c, durante dos meses). Luego, todos los grupos recibieron: MT en el agua de bebida (25 ug/ml) o agua durante siete días. El día posterior, los animales fueron a su vez subdivididos en dos grupos (6 en total): inyección i.p. de alcohol (OH) (3,8mg/kg BW) o salina. Seis horas posteriores a las inyecciones (alcoholemia=0) se evaluó el desempeño neuromuscular mediante la prueba de la cuerda tirante "tight rope". En machos y hembras intactas que habían recibido OH, se observó un peor desempeño en la coordinación neuromuscular ($p < 0,01$). La MT revirtió este efecto deletéreo pero sólo en los machos ($p < 0,01$). En los animales OVX, que además habían recibido OH, la MT se comportó de manera diferente, mejorando el desempeño neuromuscular. El reemplazo estrogénico, por su parte, en el grupo OH empeoró significativamente la acción de la MT ($p < 0,05$). Los presentes Resultados sugieren que la melatonina contrarrestó los efectos deletéreos de la resaca alcohólica, solo en ausencia de estrógenos. Se propone una acción bloqueante de los efectos benéficos de la melatonina por parte de los estrógenos.

0323 (88) LA MELATONINA ESTABILIZA LOS PARÁMETROS CIRCADIANOS DE LA ACTIVIDAD DE RUEDA ANTE LA ADMINISTRACIÓN DE EFVIRENZ. P A Scacchi Bernasconi¹, A G Karadayian², R Á Cutrera², D P Cardinali¹

¹Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires; ²Laboratorio de Biología y Ritmos. de Medicina, Universidad de Buenos Aires <scacchiba@yahoo.com.ar>

El efavirenz (EFZ) es el principal antirretroviral utilizado en pacientes HIV/SIDA y se asocia con mayor incidencia de trastornos del sueño. Hemos demostrado previamente que EFZ altera parámetros cronobiológicos de la actividad de rueda en hámsteres (SAIC 2006) interfiriendo con los efectos de una dosis única de melatonina (MT) sobre el ritmo de actividad locomotora (SAIC 2007). El objetivo de este estudio fue comprobar si la MT administrada en agua de bebida crónicamente es capaz de impedir los efectos cronobiológicos del EFZ. Se utilizaron hámsteres dorados en jaulas en oscuridad continua, equipadas con una rueda y un sistema de telemetría durante las 24 h. La mitad de los animales recibió MT (25 ug/ml de agua de bebida) durante 7 días previos al tratamiento. En el día del experimento se los subdividió según recibieron una dosis de 1 ml de EFZ (50 mg/ml en 0,5% metilcelulosa por sonda esofágica) o su vehículo (VEH), a 5 horas del comienzo de la actividad. Los grupos fueron: VEH-H2O, VEH-MT, EFZ-H2O, EFZ-MT. Se analizaron: cambio de fase (min), cambio de período (min/día) amplitud y media (% del pretratamiento). En todos los casos, se utilizó ANOVA de dos vías para el análisis estadístico. Se detectó un adelantamiento de fase en el grupo EFZ-H2O (-9.8±7.4) comparado con los otros grupos (VEH-H2O, 7,6±5,4; VEH-MT, 3,6±5,5; EFZ-MT, 4,6±3,4; $p < 0,041$, EFZxMT $p < 0,023$). Los cambios del período de los animales que recibieron MT (1,4±0.2) fueron mayores que los tratados sólo con H2O (-2,1±0,2; MT $p < 0,033$). El grupo MT-H2O mostró una disminución de la amplitud (0,84±0,08) y la media (0,083±0,7) en relación con los otros grupos (amplitud: VEH-H2O, 1,18±0,07; VEH-MT, 0,86±0,85; EFZ-MT, 1,02±1,1; $p < 0,005$, EFZxMT $p < 0,01$; media: VEH-H2O, 1,26±0,09; VEH-MT, 0,91±0,86; EFZ-MT, 1,12±0,12, $p < 0,026$, EFZxMT $p < 0,007$). Los presentes Resultados indican MT impide los cambios producidos por el EFZ sobre los parámetros circadianos.

0324 (124) CARACTERIZACION MOLECULAR DE GLIOMAS POR ALTERACIONES EN LA VIA EGFR/AKT. L M Núñez¹, A Muggeri¹, N Arakaki¹, M Riudavets², E Arias¹, A Taratuto¹, G Sevlever¹, B Diez¹, H Martinetto¹

¹FLENI; ²Departamento de Neuropatología, Fundación de Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI) <nunezli@yahoo.com.ar>

Introducción: Las alteraciones de la vía EGFR/AKT en gliomas están extensamente documentadas, pero no si existe diferencia significativa entre los diferentes gliomas. Objetivo: Evaluar alteraciones de esta vía en tres grupos de gliomas. Diseño: Se analizaron 52 Oligodendrogliomas (OD), 26 Oligoastro-citomas (OA) y 18 Glioblastomas (GBM). La pérdida de heterocigosidad (LOH) 1p-19q, por PCR en tiempo real cuantificando microsatélites. En 10q se analizaron marcadores cercanos a los genes PTEN y DMBT1. EGFR y CDKN2A/ARF se analizaron por PCR multiplex en tiempo real. **Resultados:** Como esperábamos, las alteraciones en EGFR/AKT fueron más frecuentes en GBM, con diferencias significativas comparadas con OD. Considerando número de copias de EGFR y delección de marcadores específicos en 10q, encontramos diferencias no reportadas. La amplificación de EGFR se observó en 67% de GBM y en 6% de OD. Los OD con amplificación de EGFR evidenciaron trisomía, mientras que 92% de GBM con amplificación, poseían más de tres copias del gen ($p < 0,002$). En 10q se observaron alteraciones en 83% de GBM y en 29% de OD. Además, 93% de GBM con alteración de 10q poseía delección total, mientras que 69% de OD mostró delección parcial ($p < 0,002$). Éstas fueron más frecuentes en DMBT1 (0,01). OA mostraron siempre perfil intermedio entre OD y GBM. **Conclusión:** El análisis molecular en gliomas está focalizado en 1p-19q como herramienta pronóstica. Existe cierta evidencia que alteraciones de EGFR, CDKN2A/ARF y 10q podrían ser útiles para diagnóstico y tratamiento. Nuestro estudio sugiere que la combinación y análisis detallado de estos marcadores ayude a una caracterización más exacta de estos tumores.

0325 (196) COMPARACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MET-ENCEFALINA PLASMÁTICA EN PACIENTES CON CEFALEA EPISÓDICA Y CRÓNICA, SIN Y CON ABUSO DE ANALGÉSICOS. M d L Figuerola ^{1,2}, J Leston ², O Bruera ², M Barontini ¹, J Ferreiro ²

¹CEDIE, CONICET; ²Servicio de Neurología, Hospital de Clínicas José de San Martín <mfiguerola@intramed.net>

Los pacientes con cefaleas frecuentes usan habitualmente analgésicos, tanto antiinflamatorios no esteroides (AINE's) como opioides, ergotamina y triptanes, que pueden transformar el dolor en una cefalea crónica diaria (CCD). En estos pacientes, la ineficacia de las drogas preventivas podría deberse a la falta de respuesta de los sistemas antinociceptivos endógenos. Estudiamos los niveles plasmáticos de met-encefalina (ME) en mujeres portadoras de cefalea crónica diaria secundaria al abuso de fármacos a fin de evaluar su compromiso en la patogenia de este problema y confrontarlas con cefaleas primarias y controles. El protocolo fue evaluado por un comité de ética independiente y pacientes y controles firmaron un consentimiento informado. Las pacientes (con edades comprendidas entre 22 y 56 años), fueron agrupadas en: migraña sin aura episódica ($n=6$), cefalea tipo tensión crónica (CTTC) ($n=6$) y CCD ($n=21$) el que a su vez se dividió según el fármaco usado en: triptanes (T) ($n=6$), combinación de ergotamina, cafeína y AINE (E) ($n=7$) y AINE's ($n=7$), y controles ($n=6$). Las muestras para determinación de ME plasmática por RIE con anticuerpo específico se tomaron entre las 8 y 9 AM y fuera del momento de dolor. Los Resultados fueron analizados por ANOVA seguido por test de Tuckey y expresados en mmol/ml, $X \pm SEM$. Los niveles de ME en las pacientes con CCD (T: 0.31 ± 0.04 ; E: 0.29 ± 0.01 ; AINE's 0.31 ± 0.01) fueron significativamente superiores ($p < 0.01$) a los valores controles (0.23 ± 0.01) y a los de aquellas con migraña sin aura episódica (0.25 ± 0.01) ($p < 0.05$). Sin embargo no hubo diferencias con las portadoras de CTTC (0.34 ± 0.01) pero sí entre estas últimas y los controles ($p < 0.001$). Estos Resultados indicarían una conducta similar de la ME en los pacientes con dolor crónico independientemente del consumo de analgésicos, diferente a un dolor episódico como el de la migraña aquí valorada y a los controles.

0326 (219) RESPUESTA TEMPORAL A PROGESTERONA EN LA DEGENERACION DE LA MEDULA ESPINAL DEL RATON MUTANTE WOBBLER (WR). M Meyer ¹, M C Gonzalez Deniselle ^{1,2}, L I Garay ^{1,2}, G Gargiulo Monachelli ¹, A Lima ¹, A F De Nicola ^{1,2}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; ²Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA <mariameyer@dna.uba.ar>

En el Wr una mutación del gen *vsp54* produce degeneración de motoneuronas espinales y astrogliosis. Para evaluar temporalmente estos cambios y la respuesta a la progesterona (PROG), un grupo de Wobblers (genotipificados para el fenotipo wr/wr) y controles recibieron un pellet de PROG (20 mg, 18 días previos al sacrificio) a distintas edades: 1-3 meses (inicial), 5-8 (sintomático) y 12-13 (tardío). Se analizaron los siguientes parámetros: no. de neuronas vacuolizadas (paraptosis), expresión de colinaacetiltransferasa (ChaT, enzima de neurotransmisión colinérgica), y dos proteínas astrocitarias: proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP, índice de respuesta a la degeneración) y glutamina sintetasa (GS, protege contra la toxicidad glutamatergica) mediante inmunocitoquímica. Las motoneuronas vacuoladas, ausentes en controles \pm PROG, se detectaron en Wr a los 1-3 meses de vida ($12.5 \pm 1.3 / \text{mm}^2$), descendiendo a los 5-8 meses ($p < 0.05$) y a los 12-13 meses ($p < 0.01$). PROG disminuyó las motoneuronas vacuoladas a los 1-3: 7.6 ± 1.3 , 5-8: 3.5 ± 1.4 y 12-13 meses: 2.9 ± 1 ($p < 0.001$ vs. Wr de similares periodos). La inmunoreacción para ChaT se redujo en los tres periodos del Wr y fue repuesta al recibir PROG ($p < 0.01$). La astrogliosis GFAP+ se evidenció a 1-3 meses (389 ± 56 astrocitos GFAP+/mm²) y permaneció elevada sin cambios temporales; la PROG la disminuyó significativamente en todos los estadios (1-3 meses: 119 ± 1.7 ; 5-8 meses: 117 ± 10 ; 12 meses: 98 ± 12 , $p < 0.001$ o menor vs. Wr no tratados). En contraste, la GS de astrocitos disminuyó en Wr de 1-3 meses (336 ± 78 astrocitos / mm²), 5-8 meses (418 ± 81) y 12-13 meses (191 ± 45 , todos $p < 0.01$ vs control 536 ± 27). PROG restauró GS en todos los periodos respecto a Wr no tratados (651 ± 72 , 617 ± 76 y 535 ± 86 , $p < 0.001$). Los Resultados demuestran la eficacia de PROG para prevenir las alteraciones de motoneuronas y astrocitos del Wr, reforzando sus posibilidades terapéuticas en todos los estadios de las enfermedades de motoneurona.

0327 (296) FACILITACIÓN PRESINÁPTICA INDUCIDA POR AGONISTAS DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA A2A EN TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS. A G Palma ¹, M L Orta ¹, M I Veggetti ¹, S Muchnik ¹, A Losavio ¹

¹Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari <idimneurofisio@gmail.com>

La adenosina modula la liberación de acetilcolina (ACh) de las terminales nerviosas motoras al activar los receptores (R) de adenosina A₁ inhibitorios y A_{2A} excitatorios. Anteriormente hemos demostrado que la inhibición presináptica se produce por un mecanismo multimodal, actuando sobre los canales de calcio voltaje dependiente (CCVD) involucrados en la secreción de ACh y sobre la maquinaria de liberación en un paso independiente al influjo de Ca²⁺. Nuestro objetivo es aclarar el/los sitios de acción vinculados a la activación de R A_{2A} cuando hemidiafragmas de ratones CF1 son incubados con el agonista A_{2A} CGS 21680C (CGS, 50 nM). CGS incrementa la frecuencia (f) de MEPPs y la amplitud (a) de EPPs un 48.3 ± 7.3 % ($n=9$, $p < 0.05$) y un 59.3 ± 15.6 % ($n=8$, $p < 0.05$) con respecto a los controles, respectivamente. Para evaluar si la facilitación presináptica se debe al incremento del influjo de Ca²⁺ a través de los CCVD, estudiamos el efecto de CGS en presencia de Cd²⁺ (antagonista universal de los CCVD). Cd²⁺ redujo la fMEPPs al 50.0 ± 5.3 % ($n=3$, $p < 0.05$) y la aEPPs al 19.1 ± 3.8 % ($n=3$, $p < 0.05$) de los valores controles, pero no previno la facilitación de estos parámetros inducido por CGS (Cd²⁺ + CGS: fMEPPs aumentó un 125.1 ± 34.8 %, $n=3$ y $p < 0.05$ y la aEPPs un 120.7 ± 23.7 %, $n=3$ y $p < 0.05$, con res-

pecto a Ca^{2+}). Luego estudiamos el efecto de CGS sobre la respuesta hipertónica (RH), la cual produce un incremento de fMEPPs por un mecanismo independiente a la entrada de Ca^{2+} a la terminal nerviosa. CGS aumentó el pico y el área bajo la curva de la RH al $134.2 \pm 7.9\%$ y $165.0 \pm 10.4\%$ respectivamente de los valores controles ($n=3$, $p < 0.05$). Estos Resultados sugieren que, en unión neuromuscular de mamífero, la activación de los R de adenosina A_{2A} induce facilitación presináptica a través de un mecanismo que involucra al proceso exocitótico en un paso independiente de la entrada de Ca^{2+} por los CCVD presinápticos.

0328 (306) EL ESTRÉS OXIDATIVO PUEDE PRODUCIR ALTERACIONES EXTRANEUROLÓGICAS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA. G E Rodríguez¹, M C Gonzalez Deniselle^{2,3}, G M Gargiulo Monachelli^{1,2,3}, L I Garay^{2,3}, M Meyer², A F De Nicola^{2,3}, R E P Sica³

¹Hospital JM Ramos Mejía; ²Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET); ³Facultad de Medicina UBA <gisell926@gmail.com>

La etiología de la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es desconocida. El mecanismo más aceptado es un desbalance en el estrés oxidativo. Esto se demuestra por vacuolización mitocondrial en neuronas motoras y por el aumento de marcadores en el sistema nervioso central. La elevación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un indicador de procesos de peroxidación lipídica. **Objetivo:** determinar si el aumento del estrés oxidativo afecta otras estructuras además del sistema nervioso. Se obtuvo suero de 4 pacientes con ELA y 3 controles sanos. Para el análisis de TBARS, se usó el ensayo espectrofotométrico que determina la concentración de malondialdehído (MDA) por el kit de Cayman Chemical. Se realizaron biopsias de piel de 4 pacientes con ELA definida según criterios en El Escorial y de 2 controles sanos. Las biopsias fueron observadas y fotografiadas al microscopio electrónico. Se analizaron las características mitocondriales utilizando un analizador de imágenes computarizado (OPTIMAS 6.02). Se evidenció un aumento estadísticamente significativo en los niveles de MDA séricos en enfermos con ELA ($2.298 \mu M \pm 0.318$) en relación a los controles sanos ($1.673 \mu M \pm 0.228$) ($p < 0.03$). Se estudiaron 59 mitocondrias en los enfermos con ELA y 25 en los controles en las células del estrato espinoso de la epidermis. Se encontraron mitocondrias patológicas que se caracterizaron por presentar vacuolas en su interior o disrupción de membranas. Se demostró un 35.59% de mitocondrias patológicas en el grupo ELA a diferencia de un 16% en el grupo control ($p = 0.07$). No se observaron mitocondrias con disrupción de membranas en el grupo control. Se demostró un aumento significativo del MDA sérico en pacientes con ELA, asociado a la tendencia a una mayor alteración de las mitocondrias de la piel. En consecuencia, el aumento de procesos de peroxidación lipídica en esta enfermedad podría relacionarse al compromiso observado a nivel de tejidos extraneurales.

0329 (310) NIVELES SÉRICOS DE PROGESTERONA Y CORTISOL EN PACIENTES CON ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA). G M Gargiulo Monachelli^{1,2,3}, G E Rodríguez², M Meyer¹, R E P Sica³, A F De Nicola^{1,3}, M C Gonzalez Deniselle^{1,3}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)-CONICET; ²Hospital JM Ramos Mejía; ³Facultad de Medicina UBA <gisella.marianag@gmail.com>

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa e incurable. Los factores de mal pronóstico descriptos son: 1) mayor edad, 2) mayor tiempo al diagnóstico y 3) forma de inicio bulbar. La

progesterona (PROG) demostró propiedades neuroprotectoras y antioxidantes en modelos animales de ELA. El objetivo fue estudiar los niveles séricos de PROG y cortisol en pacientes con ELA y controles, y su relación con factores pronósticos. Se seleccionaron pacientes ($n = 13$) con ELA definida o probable y sujetos control ($n=8$), y se determinó PROG y cortisol séricos por radioinmunoensayo. Se estudiaron 7 mujeres / 6 hombres con ELA y 2 / 6 controles. Las mujeres estaban en período posmenopáusico. No se observaron diferencias en la edad entre los grupos (ELA: $51,62 \pm 3,07$ años y controles: $52,38 \pm 4,33$). Los niveles séricos de PROG en pacientes fueron: $0,43 \pm 0,08$ ng/ml y en controles $0,35 \pm 0,03$ ($p = 0,42$), y los niveles de cortisol: $13,13 \pm 1,35$ ig/dl y en controles $8,03 \pm 0,76$ ($p = 0,01$). No se observaron diferencias significativas entre valores de PROG o cortisol según la forma de inicio (bulbar o miembros), el género, el tiempo al diagnóstico o el tiempo de evolución de la enfermedad. Se demostraron niveles superiores de PROG en ELA < 55 años, con menos de 24 meses de evolución, sin variación en controles (ANOVA 2 vías, $p = 0,031$). El cortisol no presentó diferencias por edad en ninguno de los grupos. En conclusión, se demostró una elevación significativa de PROG y cortisol séricos en pacientes con ELA en relación a controles. Sólo se observó una variación por edad en la PROG sérica, siendo mayor en pacientes < 55 años, considerados de mejor pronóstico. La elevación de PROG podría atribuirse a un intento restaurador dado sus efectos neuroprotectores o evitadores del estrés, aunque cortisol no presentó diferencias por edad. Sugerimos que la PROG sérica podría tener un rol en el pronóstico de la ELA.

0330 (319) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA INTERNALIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR NEURONAL DE NORADRENALINA (NET) POR LAS ENDOTELINAS (ETS) EN HIPOTÁLAMO POSTERIOR (HP). S Hope¹, T Abramoff¹, A Rossi¹, L Bianciotti², M Vatta¹

¹FFyB, UBA, Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET); ²FFyB, UBA, Cátedra de Fisiopatología <shope12000@yahoo.com.ar>

En estudios previos demostramos que las ETs regulaban, a corto plazo, la captación neuronal de noradrenalina (NA) en diferentes regiones del hipotálamo a través de la modificación de la cinética e internalización de la NET (Hope et al., Int. Neurochem., 2008). Este último proceso es uno de los mecanismos más importantes que regula la disponibilidad de la NA en el espacio sináptico, siendo su regulación compleja y poco conocida. Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo fue determinar los mecanismos intracelulares involucrados en el proceso de internalización de la NET producidos por la ET1 y ET3 en el HP de rata normotensa. Los experimentos se realizaron en el HP de ratas Sprague Dawley, usando el binding de [³H]Nisoxetina como marcador de internalización. Los Resultados se analizaron mediante el ANOVA y el test de Student Newman Keuls. Los Resultados muestran que el aumento de la internalización inducida por la ETs se bloqueó en presencia de inhibidores de la óxido nítrico sintasa neuronal y la PKG (7NI y KT5823, respectivamente). Por su parte el H89 y el GF109203x (inhibidores de la PKA y PKC, respectivamente) modificaron el incremento de la internalización producida por la ET1 y ET3. Ninguno de los inhibidores utilizados anteriormente modificó el binding de nisoxetina. El inhibidor de la CaMK-II, el KN62, aumenta per se la internalización de la NET, pero no bloquea los efectos producidos por la ET3 y si la de la ET1. Estos Resultados permiten concluir que en el HP el incremento de la internalización producido por la ET1 y ET3 involucra múltiples vías lo que concuerda con Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio no solo sobre el proceso de captación neuronal, sino que también sobre la actividad y expresión de tirosina hidroxilasa y la liberación neuronal de NA.

0331 (327) INMUNOREACTIVIDAD DE LA DCX (DOBLECORTINA), EN EL HIPOCAMPO DE PACIENTES CON EPILEPSIA TEMPORAL Y ESCLEROSIS HIPOCAMPAL OPERADOS (CIRUGÍA DE LA EPILEPSIA REFRACTARIA). L D'Alessio¹, H Konopka^{2,3}, E M López⁴, D Consalvo^{2,3}, M Kauffman^{2,3}, S Oddo^{2,3}, S Kochen^{2,3}, J J López-Costa⁴

¹Facultad de Medicina, Hospital Ramos Mejía, CEFYBO-CONICET; ²Centro de Epilepsia del Hospital Ramos Mejía; ³CEFYBO-CONICET.; ⁴Facultad de Medicina, UBA. Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof. E de Robertis <luladalessio@gmail.com>

Introducción La Doblecortina (DCX), es una fosfoproteína asociada a los microtúbulos, involucrada en el desarrollo neuronal. En el cerebro adulto la expresión neuronal de DCX ha sido vinculada a neurogénesis, elongación de las neuritas y sinaptogénesis y se la considera un marcador de neurogénesis adulta. En la epilepsia el rol de la neurogénesis es controversial, y sólo algunos reportes con Resultados controvertidos, determinaron la expresión de la DCX en tejido epiléptico. **Objetivos** El objetivo de este estudio fue determinar la inmunoreactividad de la DCX en hipocampos de pacientes con esclerosis hipocámpal y epilepsia temporal refractaria operados, y en controles post-mortem. **Metodologías** Secciones de hipocampos obtenidos de 6 pacientes con esclerosis hipocámpal y epilepsia temporal refractaria operados, fueron procesados con técnicas de Inmunofluorescencia e Inmunoperoxidasa para DCX. Material de archivo, proveniente de hipocampos normales post-mortem fueron procesados en simultáneo. Se determinó la intensidad de la reacción y la morfología de las neuronas reactivas para DCX (DCX IR), mediante análisis de imágenes computarizado. Resultados Se analizó la presencia de neuronas DCX-IR en el tejido hipocámpal estudiado (controles y epilépticos). La intensidad de la reactividad fue significativamente menor en el tejido epiléptico (transmitancia $72, 8 \pm 4 / 66, 7 \pm 1$; $p < 0.05$) que en los controles. En el hipocampo epiléptico se encontraron células con dendritas apicales DCX reactivas en tirabuzón en neuronas piramidales de CA1 y dendritas apicales arborizadas de mayor longitud junto con una dispersión en las células granulosas reactivas, en el giro dentado (GD). **Conclusiones** En este trabajo encontramos una menor intensidad de expresión de DCX en el tejido epiléptico, asociado a una reactividad mayor en el árbol dendrítico del hipocampo epiléptico. Hallazgos similares en modelos experimentales de epilepsia, han sido vinculados con inmadurez y reorganización sináptica.

0332 (390) MODULACIÓN ESTROGÉNICA DEL BALANCE HIDROSALINO. C Dalmasso¹, L M Vivas¹

¹Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC-CONICET) <carolinadalmasso@hotmail.com>

El objetivo de nuestro trabajo fue investigar el rol del estrógeno en la modulación del balance hidrosalino en un modelo de sed desencadenado por la activación endógena del sistema renina-angiotensina. Para ello estudiamos la ingesta de agua y sodio en un modelo de sed hipovolémica y apetito por el sodio, inducido por la administración sc. de furosemida y dieta baja en sodio (F/DBS). Nuestros Resultados indican que las hembras intactas en Estro (E) sin depletar consumen volúmenes significativamente mayores de agua y de sodio durante el test de ingesta, comparadas con las hembras intactas en Diestro (D), ovariectomizadas (OVX) y ovariectomizadas con reposición de estradiol (OVX+E₂). El tratamiento con F/DBS aumenta significativamente la ingesta de agua y sodio en los grupos D, OVX y OVX+E₂, comparados con sus controles respectivos excepto en el grupo E que ingiere volúmenes similares al control respectivo y significativamente menores a los otros grupos experimentales. Además los datos indican que la ovariectomía reduce la sed hipovolémica sin provocar cambios en el apetito por el sodio. Por otro lado a la hora de comenzado el test, no se observaron cambios en la osmolaridad y concentración de electrolitos plasmáticos en los distintos grupos experimentales. En cuanto a la excreción urinaria de sodio 3 horas

posterior a la inyección de F, nuestros Resultados muestran que tanto las hembras E como OVX+E₂ excretan mayores cantidades de sodio. En conclusión, podríamos decir que en condiciones basales el estrógeno aumentaría la ingesta de sodio y agua, a lo que se podría atribuir la mayor cantidad de sodio excretada posterior a la inyección de F. En cambio, en respuesta a la hipovolemia inducida farmacológicamente, el estrógeno endógeno inhibiría la ingesta de agua y sodio sin provocar alteraciones en la natremia y osmolaridad plasmática. Con respecto a la ovariectomía, este procedimiento inhibiría la sed en respuesta al estímulo hipovolémico. Subsidiado por ANPCyT y CONICET.

0333 (410) LA ADMINISTRACIÓN PERIFÉRICA DE LA TOXINA EPSILON DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS LESIONA EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATONES. A Cangelosi¹, P Geoghegan¹, W Morris², J Goldstein³, D Funes², M Fernandez-Miyakawa²

¹CNCBB, ANLIS Malbran; ²Instituto de Patobiología, INTA; ³Facultad de Medicina, UBA <mfmiyakawa@yahoo.com>

La toxina epsilon de *Clostridium perfringens* es responsable de enfermedades altamente mortales en diferentes especies animales y es considerada peligrosa en humanos. En este trabajo se estudiaron los efectos de la toxina epsilon en cerebros de ratones NIH. Grupos de 4 animales fueron inyectados diariamente con diferentes concentraciones no letales de la toxina epsilon endovenosa (0.5, 0.25, 0.125, 0.06 DL₅₀) o con solución salina como control, durante 1 día o 4 días. Luego de 24 horas de la última inyección, los animales fueron anestesiados y fijados por perfusión intracardiaca. Los cerebros fueron incluidos en parafina y procesados mediante técnicas de rutina. Diferentes áreas de los cerebros fueron analizadas mediante tinción de hematoxilina y eosina y por la técnica histofluorescente de degeneración neuronal Fluorojade. Se comparó las zonas del cerebro que mostraron señal positiva (neurodegeneración) con su correspondiente control. Se determinó que las áreas comprometidas incluyeron neuronas degeneradas (Fluorojade) en el estriado y en la corteza cerebral, mientras que se observó en el cerebelo a células de Purkinje hipertrofiadas y amorfas con núcleo desplazado. Los Resultados indican que la exposición a dosis subletales de la toxina epsilon puede causar lesiones a neuronas del sistema nervioso central. Estos cambios permanentes podrían generar alteraciones fisiológicas y comportamentales en los individuos expuestos.

0334 (426) ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA FRENTE A LA ADMINISTRACIÓN DE AGENTES PORFIRINOGÉNICOS. R G Sampayo^{1,2}, J V Lavandera², A Batlle², A M Buzaleh^{1,2}

¹DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES, UBA; ²CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE PORFIRINAS Y PORFIRIAS (CIPYP), CONICET <ro_sampayo@hotmail.com>

El análisis de los mecanismos de deficiencia de hemo y su impacto sobre hemoproteínas vitales es un tema de gran importancia en la patogénesis de muchos desórdenes. Una de las teorías para explicar la neuropatía en las Porfirias está ligada a la deficiencia de hemo, grupo prostético de la Óxido Nítrico Sintetasa (NOS). Existen 4 isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS), inducible (iNOS) y mitocondrial NOS (mtNOS). El objetivo fue estudiar la expresión de NOS frente a agentes porfirinogénicos; se evaluó si la NOS mitocondrial y citosólica responden de manera similar. Previamente observamos que la actividad de NOS en encéfalo varió según la fracción celular; la mayoría de las drogas redujeron la actividad en la fracción citosólica detectándose un efecto opuesto en la mitocondria. En este trabajo se midió la expresión por Western Blot de iNOS, nNOS y mtNOS en encéfalo e hígado de ratones tratados con anestésicos, alilisopropilacetamida (AIA), Veronal, etanol, griseofulvina (Gris). En encéfalo, la expresión de nNOS disminuyó por Enflurano agudo (90%) y crónico (45%), Veronal (60%) y etanol (85%) ($p < 0,05$,

n=4). El Isoflurano en forma aguda aumentó 40% ($p<0,05$, n=4) la expresión. No se produjeron diferencias significativas por AIA, Gris y ayuno. No se detectó inducción de iNOS con ninguno de los tratamientos. La expresión de mtNOS aumentó frente a Enflurano crónico (45%) y disminuyó por etanol (50%), Gris tópicamente (80%) y ayuno (75%) ($p<0,05$, n=4). Se realizó un estudio comparativo de la expresión de NOS en hígado. Las alteraciones en la actividad de NOS tendrían consecuencias sobre las funciones biológicas mediadas por óxido nítrico, afectando el Sistema Nervioso Central. La disminución en la expresión de nNOS y mtNOS podría deberse a la reducción del pool de hemo libre resultante de la acción de las drogas porfirinogénicas. Esto indicaría que además del estrés oxidativo ya observado en encéfalo frente a los agentes estudiados, se produce estrés nitrosativo.

0335 (589) EFECTOS DE LA TOXINA SHIGA 2 (STX2) SOBRE LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS EN CEREBRO DE RATA. M S Lucero¹, J Goldstein¹, C Ibarra¹, C Silberstein¹

¹Laboratorio de Fisiopatología, Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA <sole_lucero@yahoo.com.ar>

La *E. coli* productora de Stx es responsable del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es endémico con una mortalidad del 2-4%. Los niños pueden presentar edema, hemorragias, trombosis de pequeños vasos y daño a nivel del sistema nervioso central. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de las acuaporinas 1 y 4 (AQP1 y AQP4) en ratas tratadas con Stx2 por vías intraperitoneal (i.p.) e intracerebroventricular (i.c.v.). Las ratas S-D (28 días) tratadas por vía i.p. con sobrenadante filtrado de *E. coli* que expresa Stx2 (1 ml, 10^{-4} DC₅₀ en células Vero) presentaron edema hemorrágico en cerebro y murieron luego de 72-96 hs. Los cerebros fueron extraídos a 1, 2, y 3 días de tratamiento para analizar la expresión de AQP1 y AQP4 por western blot. En estos estudios se observó que las proteínas AQP1 y AQP4 normalizadas respecto a la expresión de α -actina, disminuyeron significativamente a partir del 1^{er} día de tratamiento ($p < 0,05$). Por otro lado, en ratas inyectadas vía i.c.v. con Stx2 purificada (24 pg/g peso de rata) se detectó por inmunofluorescencia un aumento de la expresión de AQP1 en astrocitos periventriculares del cuerpo calloso, órgano subfornical y en corteza profunda del cerebro, respecto del vehículo. También se observó una intensa expresión de la AQP4 en las membranas basolaterales de células ependimales periventriculares, en procesos astrocitarios de la zona subventricular y en elementos celulares que limitan la microvasculatura en estriado y corteza. Si bien el tratamiento con Stx2 disminuyó la expresión total de AQP1 en cerebro, la alta expresión de AQP1 localizada en células que rodean los vasos y cavidades del cerebro contribuiría a la formación del edema celular y vascular.

0336 (593) LA ADMINISTRACIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR DE LA TOXINA SHIGA 2 GATILLA LA EXPRESIÓN NEURONAL DE LA PROTEÍNA PROAPOPTÓICA BAX Y LA REACCIÓN ASTROCITARIA EN CEREBROS DE RATA. J Boccoli¹, C Tironi Farinati¹, C F Loidl², C Ibarra¹, J Goldstein¹

¹Lab. de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA; ²Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis", Fac. de Medicina, UBA <jgoldstein12000@yahoo.com>

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 en niños con SUH. Previamente demostramos que la administración intracerebroventricular (icv) de Stx2 causó neuronas apoptóticas y lesiones en diferentes tipos celulares observadas por microscopía electró-

nica y cambios en la expresión de neurotransmisores en cerebros de rata (Boccoli y col., *Brain Res* 2008, doi:10.1016/j.brainres.2008.07.05). El presente trabajo tiene como objetivo estudiar los cambios en la expresión de la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) en astrocitos y de Bax (marcador proapoptótico) en neuronas durante la administración vía icv de 6, 12 y 24 pg/g de Stx2/peso animal en cerebros de ratas. A los 8 días de tratamiento las ratas fueron anestesiadas, perfundidas y sus cerebros extraídos para estudios de inmunofluorescencia confocal. Se observó por microscopía confocal un aumento dosis dependiente en la expresión de GFAP en astrocitos y la inducción neuronal de Bax en el estriado ($p<0,01$), que coincidió con una disminución de sustancia blanca analizada por técnica de Nissl. Además Bax se inmunodetectó en neuronas de la corteza cerebral, en hipocampo, y en zonas subventriculares cercanas a la zona de microinfusión de la toxina. No se detectó inmunofluorescencia artefactual para estos marcadores en controles de la técnica. Concluimos que la administración icv de Stx2 gatilla el aumento en la expresión de GFAP en astrocitos, un marcador de reacción astrocitaria, que coincide con la expresión del marcador proapoptótico Bax en diferentes poblaciones neuronales del cerebro. En síntesis los Resultados presentados confirman que la Stx2 lesiona el SNC de rata.

NEUROCIENCIAS P2

0337 (334) PARTICIPACIÓN ADRENAL EN LA REGULACIÓN DE LA NEUROESTEROIDOGÉNESIS HIPOTALÁMICA: ROL DE LOS ESTRÓGENOS Y PROGESTERONA PERIFÉRICA. V S Bazzocchini^{1,2,3}, F Nanfaro^{1,2}, A Vega Orozco^{1,2}, S Casas^{1,2,3}, R Yunes^{1,2,3}, R Cabrera^{1,2,3}

¹LINCE-IMBECU-CONICET; ²Area de Farmacología, FCM, Universidad Nacional de Cuyo; ³Centro de Investigaciones Superiores, Universidad de Mendoza <dra_pachi@hotmail.com>

La actividad de la 3- α hidroxisteroide deshidrogenasa (3 α -HSD) permite la transformación de pregnenolona en progesterona en el SNC. Se ha demostrado que la actividad de esta enzima aumenta en hipotálamo en respuesta a la administración exógena de estradiol incrementando a su vez los receptores para progesterona. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las variaciones de la actividad enzimática de la 3 α -HSD en hipotálamo de rata hembra bajo diferentes condiciones hormonales sexuales endógenas, con y sin aporte de esteroides adrenales. Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Sprague-Dawley, divididas en 7 grupos: 1) hembras en proestro (n=5), 2) ovariectomizadas (OVX, n=5), 3) OVX a las que se les administró Estrógeno (E)(25mg/rata) y Progesterona (P)(1mg/rata) (n=5), 4) OVX y adrenalectomizadas (ADX) (n=5), 5) OVX+ADX+E (n=6), 6) OVX+ADX+P (n=5), 7) OVX+ADX+E+P (n=5). Los animales fueron sacrificados por decapitación, luego se les extrajo el hipotálamo medio basal para la determinación de la actividad enzimática por método espectrofotométrico. Los Resultados se expresaron como la media \pm SEM en mU/mg de proteínas y analizadas estadísticamente por test de Student. La caída de las hormonas esteroides posterior a la remoción adreno-gonadal inducen una disminución significativa en la actividad de la 3 α -HSD hipotalámica (OVX= 28.2 \pm 3.5 vs OVX + ADX= 8.7 \pm 2.7 $p<0.004$). El aporte exógeno de P así como de E+P produjo un aumento significativo de la actividad enzimática (OVX +ADX = 8.7 \pm 2.7 vs OVX+ADX+P= 71.9 \pm 9.4 $p<0.0006$; OVX+ADX vs OVX+ADX+E+P= 51.9 \pm 10.7 $p<0.008$); este reemplazo hormonal es altamente compensatorio superando al observado en un ciclo estral normal (OVX+ADX+E+P = 51.9 \pm 10.7 vs proestro= 10.8 \pm 1.9 $p<0.001$). Concluimos que el aporte esteroideo adrenal es altamente significativo para modular la neuroesteroidogénesis hipotalámica al mismo tiempo que incorpora un nuevo mecanismo neuromodulatorio adrenal no descrito anteriormente a nivel del SNC.

0338 (35) DIFERENCIAS SEXUALES EN LA EXPRESIÓN DE AVP, FOS Y GR EN HIPOTÁLAMO DE RATAS SEPARADAS DE LA MADRE Y SOMETIDAS A ESTRÉS CRÓNICO VARIABLE. G M Renard¹, M M Suárez¹

¹CÁTEDRA DE FISIOLÓGIA ANIMAL - FCFYFN - UNC <geormrenard@yahoo.com.ar>

La Arginina Vasopresina (AVP) responsable de la secreción de ACTH, es producida en el núcleo Medial Parvocelular del Paraventricular Hipotalámico (PaMP) y responde al estrés y a las concentraciones de glucocorticoides plasmáticos. Se estudió los efectos de la separación materna temprana y el estrés crónico variable sobre la expresión inmunohistoquímica de GR, AVP y Fos en dicho núcleo en ratas macho y hembra adultas. Se utilizaron ratas albinas, las cuales fueron separadas de su madre diariamente por 4.5 hs. durante las 3 primeras semanas de vida. A los 48 días de edad fueron sometidas a estrés crónico variable (5 estresores diferentes durante 24 días). Las hembras criadas con la madre (CM) presentan mayor número de neuronas vasopresinérgicas activas (ir-AVP-Fos) ($p < 0,001$) en el PaMP, con respecto a los machos CM. Además, las hembras separadas de la madre (SM) y sometidas a estrés crónico presentan mayor número de neuronas ir-AVP ($p < 0,001$) y mayor número de neuronas ir-AVP-Fos ($p < 0,001$) comparadas con los machos sometidos a los mismos tratamientos. Por otro lado, en las hembras SM y en las sujetas a estrés crónico observamos menor número de neuronas ir-AVP-Fos ($p < 0,05$) en el PaMP con respecto a las hembras control. En cambio, las hembras SM y conjuntamente estresadas en etapa adulta presentan un aumento del número de neuronas con ir-Fos-AVP ($p < 0,05$) con respecto a su control. En cuanto a los GR, las ratas macho y hembra separadas de la madre y sometidas a estrés crónico variable presentan menor número de neuronas ir-GR en el PaMP comparados con sus respectivos controles ($p < 0,001$). En conclusión, la actividad vasopresinérgica en el PaMP es mayor en las hembras en situaciones tanto basal como de estrés crónico y emocional, evidenciando un dimorfismo sexual en esa función. Además, sólo en hembras la actividad vasopresinérgica es modificada por las situaciones de separación y/o estrés; y estos protocolos experimentales provocaron la disminución de GR en ambos sexos.

0339 (76) DESARROLLO DE CELULAS NEURONALES A PARTIR DE CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS. D Fernandez Espinosa¹, G E Sevlever¹, V L Heyd¹

¹LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO CELULAR-FLENI <dfernandez@fleni.org.ar>

Introducción: Por su capacidad para auto renovarse y su pluripotencialidad las células madres embrionarias humanas (CMEH) son una gran promesa como reemplazo celular para enfermedades neurodegenerativas tales como el Parkinson. Es por ello que se necesita una correcta identificación de la fuente celular así como estrategias para su obtención. **Objetivos:** Establecer un protocolo de diferenciación para la obtención de una población enriquecida y homogénea de neurosetas y células neuronales dopaminérgicas a partir de células madres embrionarias (H9) en cultivo. **Metodologías:** 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% y tratados con diferentes factores de crecimiento como SHH, FGF8, AA, etc. **Resultados:** Las células H9 fueron cultivadas por un lapso de un mes y medio, observándose el desarrollo el paso de estas células por diferentes estadios, desde una célula indiferenciada, precursor neuronal a neurona madura. Además de los cambios morfológicos evidentes, se corroboró los diferentes fenotipos a través de inmunomarcación utilizando anticuerpos revelados con fluoresceína. Las células indiferenciadas fueron puestas en evi-

dencia con Oct 4, y fosfatasa alcalina, los precursores neuronales fueron nestina y PAX6 positivas las neurosetas y las neuronas maduras reaccionaron a marcadores de microtubulos (TUJ1), Tiroxina Hidroxilasa (TH.) **Conclusiones:** La diferenciación de las CMEH a neuronas maduras a través de la formación de cuerpos embrioides brinda una población de células potencialmente aptas para ser trasplantadas en modelos animales. Nuevos experimentos están en curso para evaluar este fenómeno

0340 (79) REGULACIÓN COLINÉRGICA DEL FENÓMENO APOPTÓTICO POR AUTOANTICUERPOS SÉRICOS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN EN FIBROBLASTOS HUMANOS. S L Reina¹, L Sterin-borda¹, E Borda¹

¹CÁTEDRA DE FARMACOLOGÍA. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA. UBA <slreina@yahoo.com>

Los fibroblastos son centinelas frente a señales peligrosas tempranas e inician eventos inmunológicos en procesos fisiológicos y patológicos sintetizando factores inmunomoduladores. Por su parte, la activación de los receptores muscarínicos colinérgicos (mAChR) modulan la apoptosis en diferentes tipos celulares. Hemos documentado que los anticuerpos (Ac) séricos de pacientes con Síndrome de Sjögren primario (SSp) activan a los mAChR M₃ de las glándulas exócrinas. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de los Ac dirigidos contra los mAChR M₃ en el fenómeno apoptótico (FA) en fibroblastos gingivales humanos normales (FGHN). Por cultivo celular primario y por transferencia terminal de deoxinucleótidos (TUNEL) estudiamos la fragmentación del ADN en FGHN. Se utilizó una inmunoglobulina G antipeptido M₃ (IgG-M₃), purificada por afinidad en presencia del péptido sintético correspondiente al 3er dominio extracelular del mAChR humano. Mediante curva dosis respuesta, observamos que la IgG-M₃ incrementó el FA en un 400% ± 45 (n=8) a una concentración máxima de 1x10⁻⁹M. La IgG normal (n=7) o la fracción no antipeptido (n=8) no mostraron efecto en el sistema estudiado. El FA en los FGHN con IgG-M₃ y pilocarpina, resultó tiempo dependiente (ef máx= 48 hs), e inhibido en un 75.6% ± 8.4 por el 4-DAMP (1x10⁻⁷M) y, por el péptido M₃ (1x10⁻⁷M) en un 83.6% ± 7.4, sin ser modificado por el péptido no relacionado. Los efectos apoptóticos inducidos por la IgG-M₃ fueron bloqueados en un 75% ± 7.6 por el inhibidor de la fosfolipasa C [U-73122 (5x10⁻⁶M)]; en un 50% ± 4.5 por el inhibidor de la proteína quinasa C [staurosporina (1x10⁻⁹)] y en un 40% ± 3.5 por el inhibidor de la calcio-calmodulina [TFP (5x10⁻⁶M)] y en un 98% ± 8.5 por el inhibidor de la óxido nítrico sintasa [L-NMMA (5x10⁻⁷M)]. Nuestros Resultados sugieren que los Ac IgG-M₃ presentes en el SSp, tienen la capacidad de incrementar el FA de FGHN, a través de la participación del sistema enzimático acoplado a los mAChR.

0341 (80) EVALUACIÓN DE MEMORIA DE TRABAJO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSON. E Tenca¹, V Heyd¹, D Cerquetti¹, G Sevlever¹

¹FLENI <etenca@fleni.org.ar>

Introducción la existencia del déficit cognitivo atribuido al estado de desamparo aprendido, en ratas nos permite observar dificultades en el funcionamiento de procesos de memoria. **Objetivo:** Evaluar el probable déficit de la memoria de trabajo, en ratas, lesionadas unilateralmente en la sustancia nigra (pars compacta) **Material y Metodologías:** 20 ratas SD, fueron divididas aleatoriamente en un grupo experimental (A) y de control, (B) Ambos fueron sometidos a una evaluación pre-lesional en el laberinto elevado de Olton de ocho brazos radiales, se realizaron, por vía estereotáctica lesión con 6-OHDA en la sustancia nigra en el grupo A y el grupo B; solamente Sol. Salina Se midió el tiempo de permanencia (T), errores (Er), éxitos (Ex), el número de omisiones (O), realizados por ensayo, en cuatro evaluaciones: Previa a la cirugía a los 14- 21 y 28 días posquirúrgicos. Todos los animales fueron evaluados mediante test de giro inducido **Resultados:** Los animales lesionados tuvieron un aumento de la permanencia en brazos en la prueba de

laberinto ($T > 5m$) un menor número de éxitos (8 ± 2 vs. 24 ± 3) y un número de omisiones de 23 ± 3 vs. 3 ± 1 ; promedio para las 4 mediciones **Conclusiones:** En los animales con pérdida de la vía dopaminérgica hay un uso ineficiente de estrategias cognitivas involucradas en el funcionamiento de la memoria de trabajo

0342 (178) EFECTO DE LA ALOPREGNENOLONA SOBRE LA ASTROGLIOSIS INDUCIDA POR HIPOXIA EN CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE ESTRIADO E HIPOCAMPO. M S Kruse¹, J Barutta¹, V Boti^{1,2}, M Rey¹, G Saraceno², F Capani², H Coirini^{1,2}

¹Laboratorio de Neurobiología IByME-CONICET; ²Laboratorio Neurobiología Dept. Bioquímica Humana FMED-UBA <kruse@dna.uba.ar>

Nuevas evidencias indican que los neuroesteroides actúan durante el desarrollo confiriendo neuroprotección al neonato ante episodios de asfixia. En este trabajo estudiamos posibles efectos protectores de alopregnenolona (Alo) ante una hipoxia utilizando cultivos organotípicos de estriado (St) e hipocampo (Hc). Los cultivos fueron obtenidos de cerebro de ratas Sprague Dawley de 3-5 días de vida, según el protocolo de Stoppini con modificaciones (Cereb cortex 13:11, 2003). Luego de 6 días, los cultivos fueron expuestos durante 24h a diferentes dosis de Alo (0,5nM; 50nM y 5µM) para ser entonces sujetos a hipoxia durante 1h usando una cámara anaeróbica (Billups-Rothenberg, Inc.). Los tejidos fueron luego mantenidos a 37°C con 5% O₂ -95% CO₂ por 24h. La viabilidad celular se evaluó determinando lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio. Se utilizó la técnica de NADPH diaforasa para evaluar la óxido nítrico sintasa, y la expresión de GFAP se realizó por técnicas de inmunocitoquímica (IC) y western blot (WB). Luego de 1h de hipoxia todos los cultivos presentaron un aumento LDH que fue mayor y significativo a las 24h post-hipoxia (St=140%, Hc=180% $p < 0.05$). No se observaron diferencias entre los cultivos que fueron pre-tratados con Alo o con vehículo. La hipoxia produjo un aumento en las neuronas positivas para NADPH en St (38%) pero no en Hc ($p < 0.05$). Ensayos de IC analizados con microscopía confocal mostraron un aumento de la señal de GFAP 24h después de la hipoxia. Mediante WB fueron confirmados estos Resultados (St=183%, Hc=186%; $p < 0.005$). El pretratamiento con Alo provocó una disminución de la señal de GFAP que fue dosis dependiente (50nM y 5µM) en ambos tejidos siendo significativo en el hipocampo ($p < 0.01$). Conclusión: Los cultivos organotípicos son un buen modelo para estudiar los efectos de hipoxia in vitro. 24h de pre-tratamiento con 5µM de Alo no modifica la viabilidad neuronal pero previene la astrogliosis provocada por hipoxia (PIP5349 UBACYT M020 y PICT727).

0343 (192) NEUROGÉNESIS AUMENTADA Y ALTERACIONES VASCULARES EN EL GIRO DENTADO DE RATAS GOTO-KAKIZAKI (GK), MODELO DE DIABETES ESPONTÁNEA TIPO 2 (T2D). F E Saravia^{1,2}, J Beauquis¹, J Coulaud³, P Roig¹, B Portha³, F Homo-Delarche³, A F De Nicola^{1,2}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (UBA-CONICET); ²Dpto de Bioquímica, Fac Medicina UBA; ³CNRS UMR 7059 Univ Paris-Diderot, Paris, Francia. <fsaravia@dna.uba.ar>

La diabetes se asocia con complicaciones del sistema nervioso central. Sus consecuencias metabólicas y vasculares se relacionan con alteraciones cognitivas, incremento del riesgo de demencia, depresión, Alzheimer. El hipocampo se ve especialmente afectado en esta patología, tanto en pacientes como en modelos animales. El giro dentado (GD) es una de las dos zonas neurogénicas del cerebro adulto: las nuevas neuronas se asocian a procesos de aprendizaje y memoria. Nuestro objetivo fue explorar la neurogénesis hipocámpal y la vascularización como componentes claves del microambiente neurogénico en el modelo espontáneo de T2D, la rata GK. Se administró bromodeoxyuridina (BrdU, 250mg/kg BW) a ratas GK y Wistar (W) macho de 4 meses

de edad y 21 días después se sacrificaron perfundiendo con PFA3%. Se realizaron cortes con vibrátomo. La proliferación se encontró aumentada en el GD de GK respecto a W estudiada mediante inmunocitoquímica para Ki67 (GK 3309±362 vs W 1496±227, $p < 0.02$). El número de células BrdU+, indicativo de supervivencia celular, también mostró un aumento en GK y en el mismo sentido en este grupo se encontró el doble de células doublecortin+, marcador de maduración neuronal (GK15776 ±745.3 vs W 9923±1356 $p < 0.01$). En cuanto a los vasos, la relación área + para factor de von Willebrand (endotelio)/área de GD indicó una disminución mayor al 50% en los diabéticos: GK 0.033±0.004, W0.078±0.013 $p < 0.05$. Nuestros Resultados muestran un aumento neto de la neurogénesis hipocámpal, junto a un aumento de la proliferación y la supervivencia celular en las ratas GK. Los altos niveles de neurogénesis se observan en ciertas situaciones patológicas, como el trauma cerebral, convulsiones e isquemia. En la rata GK se ha descrito micro y macroangiopatía cerebral y pancreática respectivamente. La remodelación vascular inducida por la hiperglicemia e hiperlipidemia crónicas, sugerida por la disminución de la superficie de los vasos, se relacionaría con la alta neurogénesis en la T2D.

0344 (202) EXPRESIÓN DE LOS GENES DE O-GLICOSILTRANSFERASAS EN EL HIPOCAMPO DE RATAS EN CONDICIONES DE AMBIENTE ENRIQUECIDO. V Burgos¹, A Rinflerch¹, P Argibay¹

¹Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental - Hospital Italiano de Buenos Aires <valeria.burgos@hospitalitaliano.org.ar>

En las fases tempranas del desarrollo del cerebro, las moléculas modificadas con glicanos afectan a la guía axonal, al reconocimiento y a la migración celular, estructurando la compleja red de conexiones neuronales que determinarán el cerebro adulto. La glicosilación tendría también un rol importante en la formación y función de las sinápsis y en la plasticidad neuronal ante diversos estímulos ambientales. Una forma de estimulación en roedores es el Ambiente Enriquecido, cuyos efectos positivos a nivel celular y comportamental en modelos de depresión e injuria cerebral, entre otros, están descritos. Dado el rol de modulador sináptico de los glicanos en el SNC, nuestra hipótesis de trabajo es que la expresión génica de tales moléculas sería afectada por la estimulación ofrecida por un ambiente enriquecido. Como proyecto inicial hemos estudiado la expresión génica de O-glicosiltransferasas. Ratas macho fueron asignadas a dos grupos experimentales por 14 días: Control (condiciones estándar) y Enriquecidas (jaulas especiales que ofrecen estimulación motora y sensorial). Luego fueron sacrificados y se extrajo el ARN total de hipocampo. Mediante la técnica de Real-Time PCR se analizó la expresión de las siguientes O-glicosiltransferasas: Pomt1 (protein-O-manosiltransferasa 1), Pomt2 (protein-O-manosiltransferasa 2), PomgnT1 (β-1,2 N-acetilglucosamina protein-O-manosiltransferasa 1), Pofut2 (protein O-fucosiltransferasa 2), GalNAcT-11 (N-Acetilgalactosaminil-transferasa 11) y OGT (O-Nacetilglucosaminiltransferasa). Se observó un mayor nivel de expresión para el gen Pomt2 en el hipocampo del grupo Enriquecidos ($p < 0.05$). No se observaron diferencias para los demás genes estudiados. La exposición a un ambiente enriquecido parecería afectar a un único componente de la vía de la O-manosilación, importante en el desarrollo del cerebro. Se necesitan más experimentos a fin de determinar si existe una ventana temporal de expresión para los restantes genes en este modelo.

0345 (340) EL ALELO e4 DE LA APOLIPOPROTEÍNA E MODIFICARÍA EL "PERÍODO SILENTE" DEL DESARROLLO DE LA EPILEPSIA MESIAL TEMPORAL CON ESCLEROSIS DEL HIPOCAMPO. M Kauffman¹, D Consalvo², D Gonzalez Moron¹, V Pujol³, P Solis², S Oddo², C Lomlondjian², S Kochen²

¹Consultorio de Neurogenética. Centro de Epilepsia. Htal Ramos Mejia; ²Centro de Epilepsia. Htal Ramos Mejia;

³Residencia de Neurología. Htal Ramos Mejía
<marcelokauffman@gmail.com>

Introducción y objetivos: El gen de la apolipoproteína E (ApoE) presenta polimorfismos en su secuencia codificante que modulan distintos mecanismos de regeneración neuronal. La epilepsia mesial temporal con esclerosis del hipocampo (EMT-EH) frecuentemente se desarrolla años después de una injuria cerebral, habiéndose sucedido fenómenos plásticos neuro-regenerativos potencialmente epileptogénicos durante este intervalo denominado "período silente". Estudios previos han sido controversiales en cuanto al rol de esta variante genética en la EMT-EH. En particular, podría modificar la edad de comienzo de la patología. Nuestro objetivo fue explorar en mayor profundidad el rol de la variación genética de ApoE en el intervalo silente de la epileptogénesis de la EMT-EH. **Material y Metodologías:** Se realizó un estudio de epidemiología molecular que incluyó 78 pacientes con EMT-EH, investigando el efecto del polimorfismo sobre la edad de comienzo de la patología. La genotipificación fue hecha mediante PCR-RFLP. Se realizó un análisis limitado a nuestra población y un meta-análisis de la evidencia acumulada incluyendo nuestros datos (574 pacientes en total). **Resultados:** En nuestra población, los sujetos portadores de la variante ApoE E4 evidenciaron una tendencia a comenzar sus crisis a más temprana edad. En el meta-análisis se confirmó esta tendencia, aquellos sujetos portadores de la variante ApoE E4 comienzan sus crisis casi 4 años antes que los sujetos portadores de las isoformas 2 y 3 de ApoE ($p=0,005$). **Conclusiones:** ApoE E4 es un factor genético que modifica la edad de comienzo de la EMT-EH, pudiendo estar implicado en los procesos epileptogénicos que se suceden en el período silente del desarrollo de la Epilepsia Mesial Temporal con Esclerosis del Hipocampo.

0346 (365) PAPEL DEL HIERRO EN EL EFECTO OXIDATIVO DE LA IRRADIACIÓN GAMMA EN PRECURSORES NEURONALES. E Robello ¹, S Puntarulo ¹

¹Fisicoquímica - PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires-CONICET
<erobello@ffyb.uba.ar>

La hipótesis de trabajo es que la exposición a radiación gamma de células precursoras cerebrales produce una alteración en el metabolismo del Fe que lleva a daño oxidativo. El sistema empleado fueron cultivos de precursores de células cerebrales en medio RPMI 1640 expuestos a una dosis de 2 Gy de radiación gamma. Las células fueron cosechadas a 1, 2 y 4 h post-irradiación (pi). Como índice de estrés oxidativo se empleó la relación contenido de radical ascorbilo (A)/contenido de ascorbato (AH), donde el A fue medido por EPR y el AH por HPLC. Se observó un aumento significativo en este índice en las células a 1, 2 y 4 h pi, $(2,7 \pm 0,4) \times 10^{-2}$; $(2,5 \pm 0,1) \times 10^{-2}$ y $(2,7 \pm 0,2) \times 10^{-2}$ respectivamente, respecto al determinado en los cultivos no irradiados, $(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-2}$. El contenido de Fe total, determinado por la formación del complejo Fe²⁺-batofenantrolina no mostró diferencias significativas entre células no irradiadas y a 1, 2 y 4 h pi ($3,2 \pm 0,7$, $3,3 \pm 0,9$, $4,0 \pm 0,2$ y $3,5 \pm 0,3$ nmol Fe/10⁶ células, respectivamente). El pool de Fe lábil (LIP), determinado por EPR, resultó 665 ± 126 , 695 ± 247 , 704 ± 277 y 585 ± 219 pmol(Fe²⁺+Fe³⁺)/10⁶ células, para células no irradiadas y a 1, 2 y 4 h pi, respectivamente. El LIP, medido por quenching de fluorescencia de calceína, tampoco resultó significativamente diferente entre células no irradiadas y luego de 1, 2 y 4 h pi (425 ± 28 , 407 ± 19 , 398 ± 128 y 511 ± 31 pmol(Fe²⁺+Fe³⁺)/10⁶ células, respectivamente). Estos Resultados indican que la irradiación gamma produce estrés oxidativo celular sin afectar el contenido de Fe disponible para actuar como catalizador en células irradiadas directamente. La falta de respuesta en el metabolismo de Fe en este modelo experimental sugiere que los efectos verificados en estudios previos de irradiación in vivo se deben al aumento del tráfico de Fe desde la sangre materna a la fetal. Financiado por CONICET, UBA y ANPCyT.

0347 (372) RESONANCIA MAGNETICA FUNCIONAL. APORTES EN EPILEPSIA REFRACTARIA. S Oddo ^{1,2}, J P Princich ^{1,2}, C Lomlomidjian ^{1,2}, M Benitez ^{1,2}, P Solis ^{1,2}, D Consalvo ^{1,2}, H Jeder ³, J Gonzalez ³, M Eleta ³, S Kochen ^{1,2}

¹Centro de Epilepsia, Hospital Ramos Mejía; ²Instituto de Biología Celular y Neurociencias; ³Fundación Jaime Roca TCBA. <silviaoddo@hotmail.com>

En los pacientes con epilepsia refractaria, candidatos a cirugía, resulta imprescindible la localización de las funciones cognitivas (lenguaje, memoria) o motoras involucradas en la zona epileptógena. La resonancia magnética funcional (fMRI) es un método de imágenes que, mediante la utilización de paradigmas específicos, permite observar activación cortical. La técnica utilizada es compleja y requiere del trabajo conjunto de neurólogos, neuropsicólogos, radiólogos y bioingenieros. El objetivo de este trabajo fue presentar la experiencia de la puesta a punto de los diferentes paradigmas y técnicas de procesamiento de las imágenes en sujetos control. Se analizaron 10 sujetos normales, diestros entre 18 y 45 años. Se realizó un entrenamiento previo del procedimiento. Las imágenes se adquirieron a través de un resonante Phillips Intera 1,5 T (volumen, tr, parámetros). Se utilizó E-prime para el diseño y presentación de paradigmas. El pre y post procesamiento se realizó con MRIcro y SPM 5.0. (matlab) Se realizaron los siguientes paradigmas: fluencia verbal, denominación y comprensión; finger tapping. Se obtuvieron activaciones en áreas de Broca, motora primaria y temporal lateral. Este método no invasivo, metodológicamente complejo, requiere de un trabajo multidisciplinario y resulta promisorio en la toma de decisiones en el paciente candidato a cirugía de la epilepsia.

0348 (373) LA ADMINISTRACIÓN LOCAL DE LA TOXINA SHIGA DE TIPO 2 (STX2) INDUCE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR GB3 EN CEREBROS DE RATA. C F Tironi Farinati ¹, W Morris ², A Venzano ², J Boccoli ², L C. Fabián ³, C Ibarra ⁴, J Goldstein ⁴

¹Facultad de Medicina, UBA; ²Instituto de Patobiología-Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; ³Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof E. De Robertis", Fac. de Medicina, UBA; ⁴Laboratorio de Fisiopatología, Dep. Fisiología, Fac. de Medicina, UBA <carlatf@gmail.com>

La Stx proveniente de *E. coli* enterohemorrágica causa colitis hemorrágica, Síndrome Urémico Hemolítico y encefalopatía aguda, uno de los mayores factores de riesgo de mortalidad infantil. La Stx se une al receptor de membrana Gb3, un glicolípido globotriasilceramida y causa la muerte celular. Hasta el presente es causa de controversia la distribución cerebral de Gb3. Previamente publicamos que la administración intracerebroventricular (icv) de Stx2 en cerebros de rata causa encefalopatías (Boccoli y col., *Brain Res* 2008, doi:10.1016/j.brainres.2008.07.05). El objetivo del presente trabajo es demostrar la distribución del receptor Gb3 en el cerebro de rata cuando se administra via icv Stx2. Luego de 8 días de tratamiento las ratas fueron anestesiadas, perfundidas y sus cerebros extraídos para estudios de inmunofluorescencia confocal utilizando anticuerpos anti-Gb3 y anti-Stx2 comerciales. Se inmunodetectó la presencia del receptor Gb3 en sustancia blanca, microvasculatura y neuronas del estriado, hipocampo, corteza cerebral y eminencia media del hipotálamo, y en las zonas subventriculares cercanas a la microinfusión de la toxina. Además las áreas en donde se inmunodetectó Stx2 coincidió con la distribución regional de su receptor. Cuando se administró el vehículo se observó una disminución en la expresión de Gb3 ($p < 0,01$). La observación histológica renal de los animales tratados mostró un engrosamiento en las membranas basales de los capilares glomerulares y abundantes depósitos proteicos en el citoplasma de las células tubulares renales. Concluimos que la administración local de Stx2 induce la expresión del receptor Gb3 en diferentes regiones y tipos celulares cercanos al ventrículo lateral coincidente con la

inmuno-detección de Stx2. Es sugestiva la presencia de Gb3 en la microvasculatura cerebral, la que permitiría la difusión de la toxina desde el cerebro a la periferia, por lo que las alteraciones renales demostrarían la participación periférica de la toxina.

0349 (377) EFECTO DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) SOBRE EL ÁREA CA4 DEL HIPOCAMPO DE LA RATA. SU ANÁLISIS ESTEREOLÓGICO. M D P Torres¹, L Masciotra², A M Puyó¹, A Carranza¹

¹Catedra de Anatomía Humana (Macro y Microscópica), Facultad de Farmacia Y Bioquímica, UBA.; ²Instituto de Investigaciones Cardiológicas (ININCA), Facultad de Medicina, UBA-CONICET. <torresuarez@gmail.com>

La dehidroepiandrosterona (DHEA), el principal precursor del beta-estradiol y miembro de la familia de los neuroesteroides producidos por los astrocitos, se ha postulado que incrementa la densidad de las espinas dendríticas, produce cambios en la actividad eléctrica y previene la apoptosis neuronal. Nuestro objetivo fue determinar el tamaño del área CA4 del hipocampo en encéfalos de ratas tratadas con DHEA y controles a partir de secciones histológicas, comparando mediante procedimientos estereológicos asistidos por el software ImageJ. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 250 g, que fueron divididas en 2 grupos: Control (C, n=6) y DHEA (D, n=6, DHEA 15 mg/kg/día, subcutáneo) durante 9 semanas. Se determinaron la trigliceridemia (TG) y la glucemia por kits comerciales, y la presión arterial sistólica (PAS) por método indirecto para evaluar algunos efectos metabólicos y hemodinámicos de la DHEA. Los cerebros fueron fijados en formol 10 %, incluidos en parafina y coloreados con la técnica de Nissl, tinción específica para neuronas que permite cuantificar su número. Se analizaron 46 imágenes de ambos hemisferios de 3 ratas de cada grupo mediante estereología, metodología que permitió integrar las imágenes digitales como conjuntos de números y cuantificar con criterio matemático las áreas CA4 del hipocampo de la rata. El tratamiento con DHEA no modificó la PAS (mmHg, C: 115±2 vs. D: 118±3, ns) ni la glucemia (mg/dl, C: 88.5±6 vs D: 78,6±1.2, ns) pero disminuyó los TG (mg/dl, C: 101±14 vs D: 37±5, p<0.01). La exploración estereológica del área CA4 en función de proyecciones numéricas demostró que dicha área fue significativamente menor en el grupo C que en el D (mm², C: 1,005±0,076 vs. D: 0,709±0,075, p<0.05). Conclusión: Los Resultados obtenidos al analizar el área CA4 del hipocampo permiten sugerir que uno de los efectos neuroprotectores de la DHEA sobre el sistema nervioso central sería producir un aumento del área neuronal.

0350 (423) EVALUACIÓN DE MEMORIA EPISÓDICA EN UN MODELO ANIMAL EN RATAS. M Ríos¹, V I Weisz¹, J Martínez¹, R I Ferrer¹, P F Argibay¹

¹Unidad de Ciencias Cognitivas, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires <marianab.rios@hospitalitaliano.org.ar>

Introducción: A partir de los Resultados obtenidos en un modelo formal con redes neuronales artificiales (*Cognition*, en prensa), desarrollamos un protocolo de evaluación de memoria episódica en ratas. En analogía con el modelo de red, se intenta lograr que el animal almacene un determinado número de configuraciones como memorias distintas, pudiendo luego ser recuperadas o reconocidas a partir de estímulos claves. **Objetivos:** Comprobar la existencia de recuperación y evaluar la influencia del número de configuraciones presentadas sobre la eficiencia de la misma. **Materiales y Metodologías:** Se emplearon en el protocolo 18 ratas Wistar machos de 3 meses de edad. Basándonos en la tríada "qué, dónde, contexto" para la definición de las memorias episódicas (Eacott y Norman, 2004), cada configuración es establecida como una única combinación de contexto, objetos y ubicación de los mismos dentro del contexto. Luego de una primera fase de presentación de las distintas configuraciones, en la fase de testeo una de ellas es modificada presentando dos copias de un mismo objeto, uno en la ubicación correcta y otro en

una ubicación novedosa. La recuperación es inferida a partir de la existencia de preferencia exploratoria evaluada en tiempos para el objeto colocado en la ubicación novedosa, apelando al paradigma de reconocimiento espontáneo (Ennaceur y Delacour, 1988) que emplea la tendencia natural de la rata a explorar nuevos aspectos de su entorno. **Resultados:** Se observa reconocimiento para 2, 3 y 4 configuraciones distintas. **Conclusiones:** Si bien nuestros Resultados son preliminares, parecerían indicar que los animales son capaces de reconocer la novedad hasta 4 configuraciones. Estos Resultados, novedosos en la literatura, ameritan continuar la línea de trabajo.

0351 (476) CULTIVOS PRIMARIOS DE ASTROCITOS DE RATA COMO MODELO PARA LA EVALUACIÓN DE LA NEUROMIELITIS ÓPTICA (NMO). L Melamud^{1,2}, V Rivarola¹, J Fernandez¹, P Ford¹, A Villa², C Capurro¹

¹Lab de Biomembranas, Dep Fisiología, Facultad de Medicina, UBA; ²Hospital Ramos Mejía <luciana.melamud@gmail.com>

La NMO, desorden inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), afecta principalmente a los nervios ópticos y la médula espinal. Recientemente se descubrió que los pacientes con NMO producen un anticuerpo específico (IgG-NMO) cuyo blanco es la acuaporina 4 (AQP4), canal de agua más abundante del SNC, localizada en los pies de los astrocitos en contacto con la barrera hemato-encefálica. Este patrón específico de expresión sugiere que la AQP4 podría estar involucrada tanto en la regulación del volumen celular del astrocito como en el intercambio de agua entre los compartimientos vasculares e intersticiales. Sin embargo, el rol que jugaría la AQP4 en el desarrollo de la NMO es totalmente desconocido. Para poder investigarlo propusimos utilizar cultivos primarios de astrocitos de rata y nuestro primer objetivo fue validar el uso de este modelo. Para ello se realizaron estudios moleculares y funcionales con técnicas de inmunocitoquímica y videomicroscopía de fluorescencia. Utilizando anticuerpos específicos mostramos que los cultivos presentan un 98% de pureza (astrocitos vs. oligodendrocitos) y existe una diferenciación de astrocitos Tipo I a Tipo II tras 15 días de estimulación con AMPc. Evaluamos luego la expresión y función de la AQP4. Los estudios de inmunofluorescencia mostraron que, independientemente del grado de diferenciación, existe una alta expresión de AQP4 en la membrana conservada hasta 3 pasajes luego de establecidos los cultivos. Los estudios funcionales de medición de la permeabilidad al agua (P_a) mostraron que al someter a las células a un gradiente hiposmótico rápidamente aumentan su volumen (P_a x 10⁻⁴ cm/s = 60.04 ± 11.20) y comienzan a regularlo alcanzando un 50% de su volumen original a los 5 minutos. Estos Resultados muestran que los cultivos primarios de astrocitos constituyen un modelo adecuado para evaluar los mecanismos de acción del anticuerpo anti-AQP4, presente en el suero de pacientes con NMO, sobre la expresión y función de la AQP4.

0352(486) IMPACTO DE GALECTINA-1 EN UN MODELO DE DESMIELINIZACIÓN INDUCIDO POR CUPRIZONA. C P Muiola¹, J Pasquini¹, G Rabinovich², L Pasquini¹

¹Departamento de Química Biológica-Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB), Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA-CONICET; ²Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Laboratorio de Inmunopatología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina. <c_muiola@yahoo.com>

Los oligodendrocitos son las células encargadas de formar la vaina de mielina en el sistema nervioso central de los vertebrados. Existen numerosas patologías que afectan su integridad y funcionalidad, desencadenando procesos neurodegenerativos, como ocurre en la Esclerosis Múltiple. Galectina-1, una proteína que pertenece a la familia de las lectinas, participa en una gran variedad de procesos biológicos a través del reconocimiento de

glicoconjugados específicos en la superficie celular y la matriz extracelular. Está demostrada además, su participación en procesos neuronales tales como regeneración axonal y proliferación de células madres neurales tanto en sistema nervioso periférico como central. En el presente trabajo investigamos, en un modelo experimental de desmielinización por intoxicación con cuprizona (CPZ), el rol de Gal-1 en procesos de desmielinización y remielinización, utilizando ratones deficientes en esta proteína (*Lgals1^{-/-}*) de la cepa 129Sv, mediante la caracterización morfológica de la mielina por medio de ensayos inmunohistoquímicos y tinciones colorimétricas. Los ratones *Lgals1^{-/-}* presentaron una desmielinización significativamente menor en respuesta a CPZ comparados con ratones *Lgals1^{+/+}* ($P < 0,05$) al evaluarse marcadores específicos de mielina como las proteínas MBP, CNP y lípidos característicos de dicha membrana. En estos animales también se observó una menor reactividad de los astrocitos frente al tratamiento con CPZ, lo que avala el menor grado de desmielinización. Al evaluar la actividad microglial mediante el marcador CD11b, observamos una activación basal mayor de la microglia en los animales *Lgals1^{-/-}* respecto a los *Lgals1^{+/+}*. Estos Resultados demuestran que Gal-1 podría estar participando en el mecanismo que conduce a la desmielinización inducida por CPZ y en la posterior remielinización ya que los animales deficientes en Gal-1, parecen no desmielinizarse ni remielinizar, en la misma magnitud que sus contrapartes.

0353 (554) PARTICIPACIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN N-CADHERINA Y NCAM EN EL REMODELADO SINÁPTICO OBSERVADO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESIÓN Y EN SU TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO. M F Podestá ^{1,2}, J R Lorenzo Lopez ¹, M Sonnemberg ¹, M López ³, A H Brusco ³, S Wikinski ^{1,4}, A Reinés ^{1,2}

¹Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, UBA-CONICET); ²Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; ³Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN), Facultad de Medicina, UBA; ⁴1^o Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA <podestafer@yahoo.com.ar>

Se sabe que las dendritas apicales del área CA3 del hipocampo se atrofan en modelos experimentales de depresión y que la causa podría ser una excesiva liberación de glutamato. Las moléculas de adhesión son participantes activos de los procesos de señalización, capaces de modular la estructura y la función sinápticas y de conducir al remodelado sináptico. En las sinapsis excitatorias del hipocampo la N-cadherina (N-cad) y NCAM, son las más abundantes. Por ello nuestros objetivos fueron evaluar si la exposición al paradigma de desesperanza aprendida (LH) y el tratamiento con fluoxetina (FLX) inducían cambios morfológicos en las sinapsis del área CA3 y si en ellos participaban las moléculas de adhesión. En los animales con conducta de desesperanza (LH), la brecha sináptica de las sinapsis del CA3 resultó aumentada y el número de vesículas sinápticas disminuido. Asimismo, la densidad postsináptica se redujo en longitud y aumentó en espesor. La cuantificación de los niveles de expresión de N-cad y NCAM en homogenatos de hipocampo total no mostró diferencias significativas tanto en sus isoformas adhesivas como no adhesivas (Pro N-cad y PSA-NCAM, respectivamente). Sin embargo, mientras que en el CA3 la inmunomarcación para NCAM disminuyó y la de PSA-NCAM aumentó, en el CA1 se observó el efecto contrario. Sorprendentemente, el tratamiento con FLX de los animales LH indujo una tendencia a la disminución de los niveles de expresión de NCAM en homogenato de hipocampo total. Nuestros Resultados indican que el desbalance entre las formas adhesivas y no adhesivas de NCAM en el CA3 de los animales LH sería compatible con el aumento de la longitud de la brecha sináptica, sugiriendo una alteración de la conectividad sináptica hipocámpal. Sin embargo, la reducción hipocámpal de NCAM participaría también del remodelado sináptico inducido por FLX, sugiriendo una importante participación de las moléculas de

adhesión en el mecanismo fisiopatológico de la depresión y en su tratamiento.

0354 (574) PARTICIPACIÓN DE LA INMUNOFILINA DE ALTO PESO MOLECULAR FKBP52 EN LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL. H R Quintá ¹, M D Galigniana ²

¹Fundación Instituto Leloir-IIBBA; ²Fundación Instituto Leloir/IIBBA-CONICET, Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. <hquinta@leloir.org.ar>

Las inmunofilinas (IMMs) son receptores intracelulares de drogas inmunosupresoras capaces de formar complejos con receptores esteroidales vía su unión a hsp90. La subfamilia de FKBP5 (FK506-binding proteins) posee 15 miembros, de los cuales FKBP12 es la única involucrada en la inmunosupresión. Poco se sabe acerca de la función biológica de las IMMs de alto PM. En nuestro laboratorio demostramos que FKBP52 es esencial para el retrotransporte de GR al actuar como puente molecular con la proteína motora dineína. Se sabe también que la droga FK506 favorece la diferenciación neuronal y posee acción neuroprotectora/neuroregeneradora, efectos que son totalmente independientes de la acción inmunosupresora mediada por FKBP12. El objetivo de este trabajo fue evidenciar si el heterocomplejo hsp90•FKBP52 tiene alguna participación en el mecanismo molecular de diferenciación neuronal. Utilizamos como modelo a la línea de neuroblastoma murino N2a, a la que se incubó con diferentes concentraciones de cAMP, FK506 o ambas drogas. Las células indiferenciadas, normalmente redondeadas, cambiaron su morfología en apenas 3 h de incubación adoptando un fenotipo característico de neuronas. La longitud y número de las neuritas se incrementó de manera concentración-dependiente a lo largo del tiempo. Los glucocorticoides no tuvieron efecto alguno en la diferenciación. FK506 mostró mayor potencia que cAMP, y el proceso se aceleró con ambas drogas juntas. Hsp90, hsp70 y p23 se indujeron significativamente mientras que el contenido total de FKBP52 se redujo a la mitad. Sin embargo, la IMM sufrió una relocalización subcelular notable, pasando de estar colocalizada con las chaperonas en un halo perinuclear a una distribución difusa en el cuerpo celular y más concentrada en los conos de ramificación y crecimiento de las neuritas. Estos efectos son mucho más rápidos y notables con FK506, lo que nos permite inferir que FKBP52 podría ser el principal responsable del efecto neurogénico.

0355 (657) INTRANASAL ADMINISTRATION OF HUMAN RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN (RHUEPO) IMPROVES THE SPONTANEOUS MOTOR ACTIVITY IN HYPOXIC RATS IN SPITE OF BRAIN MDR-1 OVEREXPRESSION. A Merelli ^{1,2}, L R Caltana ³, A J Ramos ³, M López ³, A J Lazarowski ^{1,2}, A H Brusco ³

¹Instituto de Biología Celular y Neurociencias Facultad de Medicina UBA; ²Dpto de Bioquímica Clínica-Hospital de Clínicas-FFyB UBA; ³Instituto de Biología Celular y Neurociencias Facultad de medicina-UBA <amerelli2002@yahoo.com.ar>

Stroke is the major problem for human health inducing long-term disability without therapeutic options. Hypoxic damage reduces of aerobic metabolism with ultrastructural changes, loss of function and/or cell death. Hypoxia-inducible factor-1a (HIF-1a) upregulation induce genes such as EPO-R, related with O₂ supply and/or cell survival. HIF-1a can also induce MDR-1 gene expression conferring potential pharmacoresistance to neuroprotective therapeutics. Under these conditions the use of rHuEpo has not been enough studied. We evaluate the effects of intraperitoneal (i.p) or intranasal (IN) rHuEpo administration on the spontaneous motor activity (SMA) in rats undergone to focal cortical hypoxia, and its relationship with MDR-1, HIF-1a and EPO-R brain expression. Adult male Wistar rats (n=18) were anaesthetized, placed in a stereotaxic device and intracerebrally

injected with CoCl_2 (2ul-50mM). The injection site was layer 2-3 of right fronto-parietal cortex (Bregma -1.30mm). rHuEpo 950U i.p. (n=6) or 24U-IN (n=6) was administered; remaining 6 rats were treated with saline (i.p). Sham-operated rats (n=3) were normal controls. Reticulocytes (%) were studied after rHuEpo administration during 5 days. SMA (open field) was evaluated 1 day before and during 5 days after injury. Immunostaining, MDR-1, HIF-1a and EPO-R were performed in brain slides. Our results showed that rHuEpo induced an increased reticulocyte value only in rats i.p. administered. MDR-1, HIF-1a and EPO-R were highly expressed in hypoxic brains as compared with their contralateral hemisphere and control ones. SMA decreased in CoCl_2 injected-rats but remained normal when CoCl_2 injected-rats were treated with rHuEpo ($p < 0.01$) in both i.p. and IN. In spite of the MDR-1 gene overexpression observed, these results suggest that a single dose of IN-rHuEpo prevents the impairment in SMA as compared with saline treatment and does not induce peripheral erythropoietic effects as shown for ip-rHuEpo administered group.

ONCOLOGIA 01

0356 (16) EL POLIMORFISMO GSTP1 P.105I>V ESTÁ ASOCIADO CON RECAÍDAS EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA.. J Cotignola¹, C Riccheri², A De Siervi¹, G Alfonso³, E Vazquez¹

¹Laboratorio de Cancer y Apoptosis, FCEN, UBA;

²Hematología Pediátrica, Hospital Nacional A. Posadas;

³Hematología de Adultos, Hospital Nacional A. Posadas <javiercoty@gmail.com>

Las variaciones inter-individuales en la respuesta a carcinógenos y antineoplásicos pueden deberse a los efectos de la edad, sexo, etnia, enfermedades, o interacciones medicamentosas; pero en estos momentos se sabe que muchas de estas reacciones son determinadas genéticamente. Las variaciones genéticas inter-individuales, llamadas polimorfismos, pueden dar como resultado modificaciones en el transporte de una droga, su distribución e interacción con las dianas terapéuticas, y su metabolismo. Consecuentemente, la susceptibilidad a carcinógenos y/o la respuesta al tratamiento antineoplásico tienen diferente eficacia en cada individuo dependiendo de su composición genética. La hipótesis del presente trabajo es que los polimorfismos que modifican la metabolización de los carcinógenos y agentes antineoplásicos influyen en el desarrollo de la enfermedad y/o la eficacia del tratamiento. Para corroborar nuestra hipótesis reclutamos, hasta el momento, 68 pacientes diagnosticados con Leucemia Aguda en el Hospital Posadas (el protocolo fue aprobado por el correspondiente comité de ética y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado). Se extrajo ADN de linfocitos de sangre periférica y se genotipificaron 5 polimorfismos por PCR-RFLP en 5 genes relacionados con la farmacocinética de xenobióticos (MDR1, GSTP1, GSTT1, GSTM1, CDA). El análisis estadístico de asociación entre las variables clinicopatológicas y los genotipos mostró que el polimorfismo GSTP1 p.105I>V está asociado con el tiempo a recaídas; siendo los pacientes homocigotas 105V los que recaen más rápidamente (Log-Rank $p = 0,01$). Estos hallazgos podrían convertirse en una herramienta útil para predecir la evolución de los pacientes con Leucemia Aguda y de este modo implementar terapias individualizadas; ayudando a incrementar la sobrevida y calidad de vida de los pacientes que sufren de este tipo de cáncer.

0357 (168) CARACTERIZACIÓN DE UN MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA UTILIZANDO CÉLULAS TRANSFECTADAS CON EL ONCOGEN HER-2/NEU. L Kass¹, J Varayoud¹, M Bollati-Fogolín², S Mirazo², M Crispo³, G Schlapp³, M Muñoz de Toro¹, E H Luque¹, J G Ramos¹

¹Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral; ²unidad de Biología Ce-

lular, Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay; ³Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay <kass@fbc.unl.edu.ar>

El oncogén HER-2/neu se encuentra sobreexpresado en el 25-30% de los tumores de mama humanos. Por ello, caracterizar líneas tumorales que expresen este oncogén y que desarrollen tumores en modelos *in vivo* es de gran importancia clínica. Los objetivos fueron 1) caracterizar las líneas tumorales murinas D2F2 y D2F2/neu (transfectada con HER-2/neu), 2) generar y caracterizar tumores mamarios en ratones BALB/cJ utilizando diferentes vías de administración y sustratos tisulares. Ambas líneas subclulares fueron cultivadas *in vitro* y se evaluó la cinética de crecimiento y la expresión de Her2/neu por citometría de flujo. Las células D2F2/neu presentaron mayor proliferación evidenciada a las 100 hs de cultivo ($p < 0.05$). Ratones hembras (cepa BALB/cJ, 6-8 semanas) fueron inyectados por vía intramamaria (im) en la glándula N° 4 con una suspensión de células D2F2 y en la mama contralateral con las células D2F2/neu. Otro grupo de hembras recibió el mismo esquema de inyecciones pero por vía subcutánea (sc). A los 27 días se obtuvieron muestras de los animales que presentaron tumores. Las biopsias se procesaron de rutina y se procedió a su caracterización. Las células D2F2/neu inyectadas en la mama tuvieron 100% de incidencia de tumores con período de latencia de 10 días. Por vía sc la incidencia fue del 75% y la latencia mayor (15 días). Las células D2F2 presentaron 35% de incidencia y 23 días de latencia, sin diferencias entre las vías de administración. Todos los tumores fueron negativos para receptores de estrógeno alfa y de progesterona. Los tumores Her2/neu positivos presentaron alta expresión de la proteína nestina. Los Resultados demuestran que la expresión de Her2/neu promueve la capacidad proliferativa de las células tumorales D2F2 y que el sustrato tisular afecta la biología tumoral. La inyección im de D2F2/neu resultó ser la vía más efectiva para su utilización como modelo de cáncer de mama.

0358 (207) HEMOXIGENASA-1 EN CARCINOMAS MAMARIOS HUMANOS Y EN DOS MODELOS ANIMALES: UN MODELO ANIMAL DE CARCINOGENESIS INDUCIDA (DMBA) Y UN MODELO MURINO TRANGENICO (MMTV-PYMT). N A Gandini¹, M E Fermento¹, C A Lang¹, H V Maturi², J C Zenklusen³, M M Facchinetti¹, A C Curino¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímica Bahía Blanca INIBIBB-CONICET Lab de Biología Básica del Cáncer; ²Laboratorio de Anatomohistología Universidad Nacional del Sur Bahía Blanca Argentina; ³Neuro-Oncology Branch National Cancer Institute (Nci) National Institutes of Health (Nih) Bethesda MD USA <ngandini@uns.edu.ar>

La Hemoxigenasa-1 (HO-1) es una enzima microsomal que cataliza el paso limitante del catabolismo del grupo hemo e interviene en la respuesta celular al estrés oxidativo. Estudios recientes demostraron su relación con procesos neoplásicos; sin embargo existe escasa información de su expresión en carcinomas mamarios. El objetivo de este trabajo fue investigar la presencia y localización celular de esta proteína en biopsias quirúrgicas de tumores humanos y comparar estos Resultados con aquellos obtenidos en dos modelo animales. Se procesaron por inmunohistoquímica 30 biopsias humanas (estadios I a IV) de las cuales el 73% mostraron marcación positiva para HO-1 (>10% de células inmunomarcadas, CI). En todas las biopsias se detectó diferente expresión entre la zona tumoral con "alta marcación" (>50% de CI) y las regiones adyacentes histológicamente normales con "baja marcación" (10%-50% de CI). Sorprendentemente en el 36% de las biopsias positivas se detectó localización nuclear en la zona tumoral. El estudio de HO-1 en el modelo animal inducido evidenció Resultados similares. Además, estudios de western blot e inmunofluorescencia de cultivos primarios derivados de tumores (CT) y glándulas mamarias normales (CN) confirmaron que los niveles de expresión de la HO-1 son mayores en los primeros. Cuando se realizaron tratamientos con hemina (20-80 μM), un inductor de la expresión y de la actividad de HO-1, se observó mayor incremento de su expresión en CT compa-

rado con CN. Los primeros estudios en el modelo transgénico permitieron detectar marcación citoplasmática en hiperplasias mamarias y localización nuclear en carcinomas avanzados. La sobreexpresión, y diferente localización, de HO-1 en los tumores con respecto a los tejidos normales refuerza la hipótesis de su importancia en el cáncer. La similitud de los Resultados obtenidos entre los carcinomas mamarios en humanos y en los modelos animales estudiados indica que los mismos serán adecuados para futuros estudios.

0359 (309) PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN EPITELIO Y ESTROMA TUMORAL DERIVADOS DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS HORMONO DEPENDIENTES (HD) E INDEPENDIENTES (HI). S.J.Giulianelli¹, J I Herschkowitz², V Patel³, A Molinolo³, S Gutkind³, C M Perou², C Lanari¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²Lineberger Comprehensive Cancer Center, Chapel Hill, North Carolina USA; ³National Institutes of Health, Bethesda, Maryland USA <giulianelli@dna.uba.ar>

La interacción epitelio-mesenquima es clave en el desarrollo y morfogénesis de la glándula mamaria, como también en procesos neoplásicos. Contamos con un modelo experimental de carcinomas mamarios murinos con distinto grado de dependencia hormonal. El tumor C4-HD crece *in vivo* solo en presencia de acetato de medroxiprogesterona (MPA), mientras que su variante HI lo hace en ausencia del progestágeno. *In vitro*, ambos tumores muestran la misma respuesta al tratamiento hormonal y a factores de crecimiento. Fibroblastos asociados a carcinomas (CAF) HI, inducen mayor proliferación de células epiteliales en cultivo que los CAF-HD, sugiriendo la participación de factores paracrinos regulando el crecimiento tumoral *in vivo*. Postulamos que el estroma tumoral cumple un rol clave en la adquisición de un fenotipo HI. Con el objetivo de comparar los perfiles de expresión génica entre tumores C4-HD (+MPA n=5, y -MPA n=4) y C4-HI (n=7), se aisló RNA de muestras tumorales o de células epiteliales y estromales purificadas por Microdissección por captura laser a partir de los mismos tumores (C4-HD n=3, C4-HI n=3), y realizamos DNA *microarrays*. Cada muestra experimental fue co-hibridada con una de referencia. El análisis de datos reveló 6418 genes diferencialmente expresados en forma significativa (SAM - FDR<0.05) entre las muestras tumorales. Además, 349 genes se hallaron sobreexpresados (ej: Mmp10, Mmp13, CXCR6) y 64 genes subexpresados (ej: Stra6, Glycam1) en el estroma HI vs el HD. Mientras que 320 genes resultaron sobreexpresados (ej: Steap, CXCL9, Pdgfr) y 780 genes subexpresados (ej: Calca, IGF1R, Wisp1) en el epitelio HI respecto al HD, muchos de los cuales han sido relacionados a cáncer de mama o regulados por hormonas. Nuestros Resultados demuestran que los estromas de tumores HD y HI son diferentes. El estudio de estos genes nos permitirá avanzar sobre el conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales un tumor HD adquiere un crecimiento autónomo.

0360 (488) LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DEL RECEPTOR A HISTAMINA H3 EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS HUMANAS. V A Medina^{1,2}, M Croci³, N Massari¹, M Nuñez¹, R Bergoc^{1,2}, E Rivera¹

¹Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, 1113, ARGENTINA; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ARGENTINA; ³Instituto de Inmunooncología, Av. Córdoba 3200, Buenos Aires, 1187, ARGENTINA <vmedina@ffyba.uba.ar>

Demostremos previamente la presencia de los receptores H3 (RH3) y H4 (RH4) no sólo en líneas celulares sino también, en lesiones benignas y malignas de la glándula mamaria humana. Llamativamente, se observó inmunoreactividad citoplasmática y una fuerte tinción nuclear para el RH3 en un gran número de le-

siones mamarias. Asimismo, el RH3 cumple un papel crucial en la regulación de la proliferación y progresión del cáncer mamario. Los objetivos del presente trabajo fueron investigar la modulación de la expresión del RH3 y de su localización subcelular por ligandos del RH3, en las células tumorales mamarias MDA-MB-231 y MCF-7. El análisis por inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo que reconoce el dominio N terminal del RH3 demostró en las células MDA-MB-231, que la expresión del RH3 aumentó con el tratamiento con ligandos del RH3 (histamina e Imetit, agonistas) dentro del compartimento intracelular determinado por microscopía confocal. La semicuantificación se realizó también mediante citometría de flujo. El tratamiento con Clobenpropit (antagonista) incrementó su expresión nuclear y perinuclear. Esta distribución subcelular del RH3 fue confirmada empleando otros dos anticuerpos diferentes desarrollados contra el tercer dominio intracelular y además se demostró en las células MCF-7. La inmunoreactividad para el RH3 se observó en la membrana plasmática y a nivel nuclear y perinuclear donde colocalizó con estructuras del Golgi. El análisis por Western blot demostró inmunoreactividad en los extractos nucleares y el tratamiento con ligandos del RH3 moduló la expresión de diferentes especies moleculares del RH3. Podemos concluir que el RH3 se expresa principalmente a nivel intracelular observándose en el núcleo en células mamarias humanas. Diferentes ligandos modulan la expresión del RH3 y también su localización subcelular influenciando el perfil farmacológico y en consecuencia la eficacia terapéutica de los ligandos del RH3.

0361 (213) LA PRESENCIA DE HLA-E EN LAS CÉLULAS BLANCO INHIBE LA CITOTOXICIDAD CELULAR MEDIADA POR ANTICUERPOS (ADCC) EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR). E M Levy¹, G Sycs¹, A I Bravo², M M Barrio¹, J M Arriaga¹, M Aris³, J Mordoh^{1,3}, M Bianchini¹

¹Centro de Investigaciones Oncológicas (CIO-FUCA); ²HIGA Eva Perón, San Martín, Provincia de Buenos Aires; ³Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET <estrellamlevy@yahoo.com.ar>

Los agentes citotóxicos han logrado incrementar la sobrevida de los pacientes con CCR. El Cetuximab, un anticuerpo monoclonal quimérico cuyo blanco es el EGFR, actúa inhibiendo las vías de supervivencia celular y la progresión del ciclo celular. Así mismo dirige las células inmunitarias citotóxicas (NK) hacia las células tumorales (CT) por medio de receptores específicos (CD16). Previamente demostramos que la expresión de HLA-E se encuentra significativamente aumentada en los pacientes con CCR, y aquellos con mayor porcentaje de células HLA-E⁺ presentaron peor pronóstico. Con el propósito de establecer si la expresión de HLA-E puede ser un factor que vuelve a las CT menos susceptibles a la ADCC mediada por Cetuximab, analizamos dicha actividad en 3 líneas de CCR humano. Observamos que los NK lisaron más eficientemente a las células tratadas con Cetuximab (1µg/ml), mientras que la ADCC resultó inhibida en aquellas células que expresaban HLA-E en la membrana. Por otra parte, la inhibición del crecimiento, fue observada sólo a concentraciones de 100 µg/ml, y el efecto sobre la citotoxicidad mediada por complemento fue bastante moderado. Así mismo no fue posible observar actividad proapoptótica por parte del Cetuximab a concentraciones de 10 a 100 µg/ml aún después de 72 h de tratamiento. Teniendo en cuenta nuestros Resultados, la actividad ADCC parece ser el efecto antitumoral principal observable a concentraciones del anticuerpo que se encontrarían disponibles en el sitio del tumor (entre 1-10 µg/ml). Pensamos que sería de utilidad la caracterización de nuevos marcadores de respuesta a la ADCC inducida por este tipo de agentes. Considerando la función inmunomodulatoria de HLA-E, su expresión en las CT puede representar uno de los varios mecanismos de escape al sistema inmune. Nuestros datos justifican futuros estudios sobre pacientes tratados con Cetuximab, para establecer si HLA-E podría considerarse como marcador predictivo de la respuesta.

0362 (546) INTERACCIÓN ENTRE MACRÓFAGOS Y FIBROBLASTOS EN EL TRATAMIENTO CON BCG Y L-NAME DEL CÁNCER DE VEJIGA. Y V Langle¹, C Lodillinsky¹, E Sandes¹, A Casabé¹, A M Eijan¹

¹Instituto de Oncología Angel H Roffo <yaninalangle@yahoo.com.ar>

Tanto BCG como L-NAME, inhibidor de la producción de óxido nítrico (NO), disminuyen el crecimiento de tumores generados por la línea de cáncer de vejiga murina MB49 (productora de NO) induciendo depósito de fibras colágenas. El tratamiento combinado potencia este efecto. Para comprender los mecanismos relacionados con este fenómeno medimos la actividad de macrófagos (MAC), principal tipo celular involucrado en la respuesta, provenientes de ratones portadores de tumor tratados con BCG (2mg/ml) y L-NAME (1g/L). Se evaluó a) actividad de MMP-9 y MMP-2 por zimografía (UA/10⁶cel/24h). Sobre la línea NIH-3T3 tratada con los medios condicionados (MC) de MAC se midió b) proliferación por MTS (Abs 492nm) y c) diferenciación a miofibroblastos por expresión de actina de músculo liso alfa (SMA-a) por western blot. Análisis estadístico ANOVA-Bonferroni. En el MC de MAC la actividad de MMP-9 y MMP-2 se ve aumentada al tratar con BCG y disminuye ante el tratamiento con BCG + L-NAME. MAC-C: 8.71+/-0.13, 1.48+/-0.46; MAC-BCG: 12.15+/-1.98, 3.61+/-0.64; MAC-BCG+L-NAME: 5.18+/-0.06, 0.95+/-0.74 (p<0.05). El MC de MAC-BCG+L-NAME induce la mayor proliferación de NIH-3T3. CRL: 0.289+/-0.016; MAC-BCG+L-NAME: 0.594+/-0.012 (p<0.001). Los MC de MAC-BCG y MAC-BCG+L-NAME promueven la expresión de SMA-a sobre NIH-3T3 a las 24h post tratamiento. Nuestros Resultados muestran que el mecanismo de acción de los MAC implica un efecto sobre los fibroblastos induciendo su proliferación y su diferenciación a miofibroblastos. La inhibición de la producción de NO podría mejorar la respuesta a BCG, mediante la remodelación de la matriz extracelular por parte de fibroblastos y macrófagos.

0363 (570) DISMINUCIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS METÁSTASIS PULMONARES EXPERIMENTALES (MTEPS) DEL TUMOR DE MAMA LM3 EN RATONES SINGENEICOS, QUE SE ENCUENTRAN RECHAZANDO MTEPS DEL TUMOR DE VEJIGA ALLOGENEICO MB49. P D Cresta Morgado¹, C Lodillinsky¹, S I Vanzulli², A M Eijan¹, L L Colombo¹

¹Depto Inmunobiología, Área Investigación, Inst de Oncología; ²Inst. Invest. Oncológicas, Fund. Maissa. Acad. Nac. Medicina. <pablo_crestam@hotmail.com>

La línea tumoral murina de vejiga MB49 (MB) de cepa C57BL/6 al ser inoculada por vía endovenosa (iv) con 300.000 células (cels) en ratones BALB/c produce incontables metástasis experimentales pulmonares (MTEPs) al día 7, que luego son rechazadas. En este trabajo investigamos si el crecimiento de MTEPs del tumor mamario LM3, singeneico en BALB/c, se ve afectado cuando las cels arriban a un pulmón que está en diferentes etapas de este proceso de rechazo. Mat y Mét: 28 ratones hembras BALB/c se inocularon iv a día cero con Sol Fisiol (SF) y otros 40 con 300.000 cels MB. Los 28 ratones con SF y 30 de los inoculados con MB se dividieron en 3 grupos (10 y 10; 9 y 10; 9 y 10, respectivamente) y cada grupo recibió un 2do inóculo iv de 100.000 cels LM3 a los días 3, 10 ó 17 posteriores al inóculo de SF o MB. Los 10 restantes de los 40 con MB recibieron como 2do inóculo SF iv: 3 a día 3, 4 a día 10 y 3 a día 17 (Grupo CMB) Los ratones se sacrificaron a los 21 días post 2do inóculo (3+21=24 días, 10+21= 31d, ó 17+21=38d). **Resultados:** Los datos se expresan como Mediana (Rango): Estadística: Mann Whitney Non Parametric Test. Número total de MTEPs (NTMTs): Día 24: LM3: 45,5 (30-85), MB+LM3: 36 (6-63) P=0,13(ns). Día 31: LM3: 79(16-118), MB+LM3: 49(8-90) P=0,24(ns). Día 38: LM3: 119(64-164), MB+LM3: 22(5-86) P<0,05. El NTMTs de MB que todavía permanecen a los 24, 31 y 38 días (grupo CMB) fue: 12 (3-20), 11 (5-16) y 0 (0-0) respectivamente. % de MTEPs grandes(>1,5mm de diámetro)/ratón: Día 24: LM3: 15,9 (5,5-27,2), MB+LM3:1,06 (0-5,2) P<0,001. Día 31: LM3: 15,2(0-27,9), MB+LM3: 3,5(0-13,9)

P<0,05. Día 38: LM3: 17,5(7,8-21,9), MB+LM3: 0(0-23,2) P<0,001 **Conclusiones:** El crecimiento de las MTEPs del tumor singeneico LM3 se ve afectado por la presencia del rechazo allogeneico en el mismo órgano hacia las MTEPs del tumor de vejiga MB, disminuyendo el tamaño final de las LM3. La disminución del número total de MTEPs es estadísticamente significativa solo en el grupo de 38d.

ONCOLOGIA O2

0364 (71) MECHANISMS OF RESISTANCE AND SENSITIVITY TO TREATMENT WITH CH128.1AV, AN ANTIBODY-AVIDIN FUSION PROTEIN SPECIFIC FOR HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR 1 (CD71), IN HEMATOPOIETIC MALIGNANT CELLS. G Helguera¹, J A Rodríguez¹, T R Daniels¹, D Casero Díaz Cano², E Ortiz Sanchez¹, G Coppola³, M Pellegrini², O Martinez Maza⁴, M L Penichet¹

¹División de Cirugía Oncológica, Escuela de Medicina, Universidad de California, Los Angeles (UCLA); ²Departamento de Biología Celular y del Desarrollo, Universidad de California, Los Angeles (UCLA); ³Neurogenética, Escuela de Medicina, Universidad de California, Los Angeles (UCLA); ⁴Departamento de Ginecología y Obstetricia, Escuela de Medicina, Universidad de California, Los Angeles (UCLA) <gustavoh@ucla.edu>

Transferrin receptor 1 (TfR1 or CD71) is the major gateway for iron entry into cells. It is overexpressed on a variety of cancer cells and is becoming an attractive tumor associated antigen. We have developed a mouse/human chimeric IgG3-avidin fusion protein (ch128.1Av) that binds specifically to human TfR1 and exhibits a significant intrinsic anti-proliferative and pro-apoptotic activity against hematopoietic malignant cells by inducing TfR1 degradation and iron starvation. However, we have found a wide range of responses to treatment *in vitro* with ch128.1Av, where the human B-lymphoblastoid cell line IM-9 is one of the most sensitive, while the human myeloma cell line U266 is tolerant. In order to elucidate the mechanisms of sensitivity or tolerance to the treatment with ch128.1Av we conducted a series of studies that include confocal microscopy and global gene expression analysis of IM-9 and U266 cells treated with the drug. IM-9 cells treated with ch128.1Av reroute TfR into the lysosomal compartment. In addition, ch128.1Av treated IM-9 cells show at 24h significant up-regulation of genes associated with apoptosis. Moreover, a transcription factor binding site analysis of the promoter region of the regulated genes identified p53 as a key player in the apoptotic response in IM-9. We validated the *in silico* promoter analysis by siRNA down-expression of wild type p53 in IM-9 cells, which rescues in part the inhibition of proliferation by treatment with ch128.1Av. In contrast, U266 cells are tolerant due to a number of possible mechanisms including the presence of mutant p53, no redirected trafficking of TfR into the lysosome upon treatment, a rapid pro-proliferative response to treatment, and a high intrinsic expression of the cyclin D1 gene. This work is expected to have important implications for the clinical use of anti-TfR1 therapies and in advancing the development of novel therapeutic approaches targeting iron metabolism in hematopoietic malignancies.

0365 (112) EFECTO FOTOSENSIBILIZANTE DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA A PARTIR DE ALA SOBRE UNA LÍNEA ENDOTELIAL MICROVASCULAR. L Rodriguez¹, G Di Venosa¹, L Mamone¹, A Casas¹, A Battle¹

¹Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porfirias (CIPYP)-CONICET-Hospital de Clínicas Gral. José de San Martín <lorenagabrielarodriguez@yahoo.com.ar>

El efecto fotodinámico corresponde al daño o muerte celular inducido por un fotosensibilizante en presencia de luz y oxígeno y constituye una alternativa terapéutica muy prometedora para el tratamiento de ciertos tumores accesibles por vía endoscópica o

superficiales. En este sentido, la terapia fotodinámica (TFD) se está aplicando para el tratamiento de tumores localizados. Un aspecto importante y controvertido de la fotosensibilización es el rol de la vasculatura. Se cree que la destrucción irreversible de la vasculatura del tumor es en parte responsable de la efectividad de la TFD con algunos fotosensibilizantes. Por otra parte, la TFD se ha empleado tanto por su efecto angiogénico como antiangiogénico, pudiendo estas diferencias deberse a las distintas dosis de luz y fotosensibilizantes aplicadas. El objetivo del presente trabajo es estudiar la TFD con el precursor del fotosensibilizante Protoporfirina IX, el ácido 5-aminolevulínico (ALA), sobre la línea de células microvasculares endoteliales humanas inmortalizadas HMEC-1. Luego de 3 hs de incubación con ALA el plateau de porfirinas se alcanzó empleando una concentración de ALA de 2 mM, y fue de 1,51 ng porfirinas/ 10^5 cél, mientras que a las 24 hs de incubación el plateau de 12,9 ng porfirinas/ 10^5 cél se alcanzó empleando una concentración de ALA 1 mM. El plateau en la síntesis de porfirinas en el tiempo se encontró a las 24 hs de incubación con ALA 2 mM. A partir de esto, las condiciones fijadas para realizar la TFD con un banco de tubos fluorescentes fue de 3 hs de incubación con ALA 2 mM. Al otro día de la TFD se evaluó por MTT la respuesta a la terapia, y se vio que la dosis letal 50 de luz fue de 0.048 ± 0.003 J/cm². Se concluye por la baja dosis de luz necesaria para matar estas células endoteliales, que efectivamente la fotosensibilización de estas jugaría un papel preponderante en la regresión tumoral inducida por la TFD.

0366 (193) PATRON DIFERENCIAL EN LA EXPRESION DEL COACTIVADOR RAC3 Y DE LA CICLINA D1 DURANTE EL CICLO CELULAR. M F Rubio¹, C V Alvarado¹, S M Mienmacher¹, M A Costas¹

¹Instituto de Investigaciones Médicas
<maferrubio@yahoo.com.ar>

La división celular involucra un control transcripcional dinámico responsable de la expresión temporal de moléculas involucradas en este proceso. El coactivador RAC3, se asocia con E2F1 y transactiva la expresión de genes que favorecen la transición G1/S; y su expresión estaría regulada en el ciclo celular. Demostramos previamente que RAC3, regula la expresión de Ciclina D1 vía un complejo conteniendo al ER y NF- κ B. Además observamos que CD1 se asocia a NF- κ B, reprimiendo su actividad de manera dosis dependiente y este efecto es contrarrestado por RAC3. Dado que RAC3 y CD1 regulan el ciclo celular y se encuentran sobreexpresados en distintos tumores, se quiso determinar si la proliferación de la línea embrionaria de riñón humano HEK 293 era afectada al aumentar los niveles endógenos de estas proteínas. Las células se transfectaron con plásmidos que expresan RAC3, CD1 o ambos y fueron sincronizadas por privación de suero 16 hs. 24hs post-agregado de suero las células expresando RAC3+CD1 proliferaron menos con respecto a las que sobreexpresan CD1 o RAC3 (CD1 666%, RAC3 639% vs RAC3 + CD1 484%) por lo tanto la presencia simultánea de ambas proteínas tendría un efecto antagónico sobre la proliferación celular. Se determinó por Western blot el patrón de expresión a distintos tiempos de RAC3 y de CD1 en cultivos sincronizados de HEK 293 y la línea tumoral de mama T47D que naturalmente sobreexpresa ambas proteínas. Se observó que el patrón es similar en ambas líneas, pero desfasado temporalmente; el pico de CD1 es 3 hs post-agregado de suero y para RAC3 3hs más tarde cuando los niveles de CD1 disminuyen. Si bien CD1 y RAC3 se encuentran sobreexpresados en distintos tipos de tumores, su antagonismo en la acción proliferativa, sugiere la existencia de mecanismos moleculares más complejos implicados en la progresión tumoral, cuyo estudio contribuiría al diseño de nuevas estrategias para su tratamiento.

0367 (284) LA HIPOXIA TUMORAL CREA, A TRÁVÉS DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1, UN MICROAMBIENTE PROPICIO PARA LA INDUCCIÓN DE ANGIOGÉNESIS. O Croci¹, J M Illarregui¹, M Salatino¹, M V Girart¹, M A

Toscano¹, G A Bianco¹, N W Zwirner¹, G A Rabinovich¹

¹Laboratorio de Inmunopatología IBYME-CONICET
<dcrocirusso@yahoo.com.ar>

Previamente demostramos que Galectina-1 (Gal1) promueve el crecimiento tumoral al incrementar la neovascularización en un modelo de Sarcoma de Kaposi (KS). Nuestro objetivo fue investigar la participación del microambiente tumoral en el proceso angiogénico promovido por Gal1. En primer lugar, determinamos que la hipoxia incrementa la expresión de Gal1 en células KS ($p < 0,01$) a través de un mecanismo dependiente de NF- κ B ($p < 0,05$). Utilizando ensayos de tubulogénesis, demostramos que los medios condicionados de células KS hipóxicas, son más efectivos para inducir morfogénesis de células endoteliales (HUVEC) ($p < 0,05$) y que el bloqueo de la expresión de Gal1, revierte este efecto. ($p < 0,05$). Estudios recientes de nuestro laboratorio demuestran que Gal1 induce la generación de células dendríticas (DC) tolerogénicas. Teniendo en cuenta el impacto de un ambiente tolerogénico en la progresión tumoral, investigamos la capacidad de estas DCs de modular la neovascularización. Se inyectaron ratones B6 con Matrigel conteniendo 1×10^6 DCs diferenciadas en ausencia (DC) o presencia (DC_{Gal1}) de Gal1 ó 1,25-di-hidroxi-vitamina D3 (DC_{D3}) y DCs de ratones *Lgals1^{-/-}* (DC_{KO}). Luego de 12 días se evaluó el contenido de hemoglobina y la vascularización, observándose una fuerte inducción de angiogénesis *in vivo* promovida por DC_{Gal1} y DC_{D3} vs DC ($p < 0,05$). Confirmamos el papel crítico de Gal1 en este efecto ya que DC_{KO} fueron menos eficaces que DC en su capacidad de promover angiogénesis ($p < 0,05$ vs DC). El análisis de los mecanismos involucrados reveló que Gal-1 induce un incremento de la proliferación y morfogénesis de HUVEC ($p < 0,01$) a través de PI3K/Akt y ERK1/2 ($p < 0,01$), no involucrando a p38, JNK, STAT3 o NF κ B. Estos Resultados sugieren una conexión causal entre la expresión de Gal1 inducida por hipoxia y la generación de DC tolerogénicas las cuales favorecen el crecimiento tumoral a través de la inducción de una respuesta inmune regulatoria y la promoción de angiogénesis

0368 (381) DISEÑO DE TERAPIAS INMUNOLÓGICAS CONTRA UN FIBROSARCOMA MURINO. EXTIRPACIÓN DEL GANGLIO DRENANTE COMO MEDIO DE ELIMINAR UN FOCO INMUNOSUPRESOR.. A F Magliocco^{1,2}, D Machuca^{1,2}, J Mundiñano^{1,2}, D Lorenzo^{1,2}, G Camicia^{1,2}, J Bruzzo^{1,2}, H Costa^{1,2}, I Fenoy³, M Giovannoni³, G Dran^{1,2}

¹ILEX-CONICET; ²División Medicina Experimental. IHEMA. Academia Nacional de Medicina; ³CESyMA, ECyT, UNSAM
<afmag313@yahoo.com.ar>

El objetivo de este estudio es implementar inmunoterapias contra tumores murinos de diversos grados de inmunogenicidad. Comenzamos analizando los cambios inducidos por el crecimiento de un fibrosarcoma sobre componentes del sistema inmune a fin de identificar posibles blancos terapéuticos. Estudiamos el fenotipo y función de células inmunes y la producción de citoquinas (CK) en ganglio drenante (TDLN) y distal (NTDLN) del tumor, en sucesivas etapas de desarrollo (2, 15 y 30 días p.i. tumoral), que denominamos NP, IMM y ADV. En NP aumentan los N° de CD4s, macrófagos, linfocitos TCD4⁺ activados y TCD8⁺ *naive*; no se modifican las células Treg ni B; las CD4s y células B expresan fenotipo de APC tanto en TDLN como NTDLN. Aumentan la respuesta inmune frente a un antígeno no tumoral (CHS) y la citotoxicidad específica (CTX), mientras que la inducción de proliferación aloégena (MLR) se encuentra inhibida. Los ganglios producen IL10 y TGF β e IFN γ al ser estimulados *ex vivo* con extracto acelular del tumor; ninguna de esas CK fue detectada en suero. En IMM y ADV los TDLN presentan alto N° de linfocitos B y TCD8⁺ activados; en ambos ganglios ocurre un progresivo aumento de Tregs y disminución de TCD4⁺ Foxp3⁺; las CD4s y linfocitos B expresan fenotipo tolerogénico. Consecuentemente, las reacciones CHS y MLR están inhibidas; sin embargo la CTX continúa elevada. Los ganglios producen IL10 y TGF β pero no IFN γ ni IL12; en estas fases se detecta TGF β en suero. Dado el predominio de factores inmunosupresores en el TDLN a partir de

IMM, se extirpó dicho ganglio, observándose una marcada exacerbación del crecimiento tumoral. Ello, junto con la persistencia de CTX, sugiere que el TDLN conserva mecanismos antitumorales activos, los que serían eliminados con la gangliectomía. Proponemos combinar la ablación del TDLN con la transferencia de CTLs tumor-específicas purificadas a partir del mismo ganglio y/o la administración de ciclofosfamida, uno de cuyos efectos es la depleción de Tregs.

0369 (332) REGULACIÓN DE LA SENSIBILIDAD HORMONAL POR PROTEÍNAS QUINASAS Y EL MICROAMBIENTE TUMORAL EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER MAMARIO. M Riggio¹, V Arnoni¹, A Colman Lerner², J P Cerliani¹, s Giulianelli¹, C Lanari¹, V Novaro¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales <marinariggio@gmail.com>

Las proteínas quinasa integran la respuesta celular a diversas señales extracelulares y están relacionadas con el crecimiento tumoral en ausencia de hormonas. En un modelo murino de cáncer mamario inducido con medroxiprogesterona (MPA) hemos demostrado que la activación de la vía PI3K/Akt está involucrada en el crecimiento de la variante tumoral hormono-independiente (C4-HI) pero no de la variante hormono-dependiente (C4-HD). Además la activación de PI3K/Akt induce la expresión de receptores de progesterona (PR) y estrógeno (ER) en células epiteliales del tumor C4-HI. La hipótesis que surge de nuestros Resultados es que en el tumor C4-HI la vía predominante en la regulación de receptores esteroides y de proliferación celular es la de PI3K/Akt, mientras que en el tumor C4-HD la vía predominante es la de MPA. En este trabajo, analizamos DNA *microarrays* en muestras tumorales y observamos que PTEN está incrementado en tumores C4-HD, mientras que PDK1 está incrementada en tumores C4-HI. Si bien la activación de Akt por PDK1 puede ser la responsable del crecimiento hormono-independiente, esta vía estaría activada por factores derivados del microambiente tumoral. En cultivo, las células epiteliales pueden activar Akt, PR y proliferar en presencia del medio condicionado de fibroblastos C4-HI (comparado con el medio condicionado de fibroblastos C4-HD). La activación diferencial de Akt fue reproducida en células C4-HI al incubarlas con FGF-2 (50 ng/ml) ($p < 0.01$) y en células C4-HD con MPA ($p < 0.05$). Estos Resultados indican que señales parácrinas del entorno extracelular estarían determinando el crecimiento hormona-independiente del tumor. Por último, generamos tumores mamarios en ratones mediante la inoculación de células epiteliales C4-HD las cuales expresan una forma constitutivamente activa de Akt (variante *myristoilada* de Akt que permanece asociada a la membrana) determinando así que la activación de PI3K/Akt juega un rol crítico en el crecimiento tumoral.

0370 (424) EL GLIPICANO 3 (GPC3) ES CAPAZ DE MODULAR LA SUPERVIVENCIA Y CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS DEL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM3 MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA CANÓNICA DE WNT. C Buchanan¹, M Garay Malpartida², L Puricelli¹, M Sogayar³, E Bal de Kier Joffé¹, M G Peters¹

¹Instituto de Oncología Angel H. Roffo. Area Investigación; ²Escuela de Artes, Ciencias y Humanidades. Universidad de San Pablo; ³Instituto de Química. Universidad de San Pablo <buchanancecilia@hotmail.com>

La vía Wnt es clave en cáncer, siendo capaz de regular eventos como crecimiento y migración. Nuestro grupo demostró que la reexpresión de GPC3 induce la inhibición de la vía Wnt canónica en células del adenocarcinoma mamario murino LM3. Determinamos que los clones que reexpresan GPC3 son menos invasivos y metastáticos *in vivo*, como también menos migrantes y más susceptibles a la muerte celular *in vitro*. En el presente trabajo estudiamos si estas diferencias en el comportamiento eran debidas al efecto inhibitorio de GPC3 sobre la vía Wnt canónica. Mediante Anexina-V y citometría de flujo corroboramos que las células LM3-GPC3 son más susceptibles a la apoptosis en todos

los tiempos de hambreado ensayados (48hs: 30% LM3-GPC3 vs 18% LM3-vector; 96hs: 65% LM3-GPC3 vs 40% LM3-vector, $p < 0,001$). Coincidentemente, empleando WB y qPCR, determinamos un aumento de las moléculas pro-apoptóticas p53, Bax, PUMA, Caspasa-3 y -9, así como una disminución de las anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL y XIAP en los clones LM3-GPC3. La activación de la vía Wnt canónica mediante LiCl revirtió parcialmente la mayor susceptibilidad a la muerte de las células LM3-GPC3, respecto a las mismas células tratadas con NaCl como control. Con el objetivo de establecer el papel de la vía Wnt canónica en el efecto de GPC3 sobre la migración, se realizó un ensayo de cicatrización de heridas en presencia de LiCl. A las 6hs las células LM3-GPC3 tratadas con el activador de la vía Wnt canónica migraron de manera similar a las células LM3-vector (cierre de la herida= 15% LM3-GPC3, 50% LM3-GPC3+LiCl, 60% LM3-vector, $p < 0,05$). En relación con este comportamiento demostramos, mediante qPCR, que las células LM3-GPC3 tienen menor expresión de las proteasas uPA y MMP-7, blancos transcripcionales de la vía Wnt canónica. En resumen, los datos obtenidos indican que GPC3 sería capaz de inducir una disminución en la supervivencia y en la capacidad migratoria de las células LM3 a través de la inhibición de la vía Wnt canónica.

0371 (520) EFECTOS DE LOS GLUCOCORTICOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD APOPTÓTICA DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS. A J Orqueda¹, E Hoijman¹, E Bal de Kier Joffé², E Kordon¹, A Pecci¹

¹LEGMA, IFIBYNE, Depto de Química biológica, CONICET; ²Instituto de Oncología A H Roffo <andresorqueda@yahoo.com.ar>

Los glucocorticoides (GC) se utilizan como adyuvantes en tratamientos de tumores sólidos con quimioterápicos como paclitaxel (PXL) y doxorubicina (DOXO). Sin embargo, hay evidencias que muestran que la presencia de los mismos genera resistencia a la terapia, probablemente al activar señales anti-apoptóticas. En particular, los GC pueden modular los niveles de miembros de la familia Bcl-2. El objetivo del trabajo fue analizar los mecanismos por los cuales los glucocorticoides interfieren con la acción apoptótica de los quimioterápicos. Se utilizaron células de la línea de epitelio mamario tumoral murina LM3 que demostraron expresar el receptor de glucocorticoides funcional. Las mismas se trataron con PXL o DOXO, junto con dexametasona (Dex). Se evaluó el grado de muerte celular mediante ensayos de cristal violeta y de actividad de caspasa-3, y los niveles proteicos de los miembros antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-XL. Los Resultados muestran que DOXO y PXL reducen la viabilidad celular ($70 \pm 6\%$ y $68 \pm 13\%$, respectivamente). Este efecto es revertido por Dex en ambos casos ($21 \pm 7\%$ y $56 \pm 11\%$, respecto a los quimioterápicos). El efecto de Dex es antagonizado por RU486, indicando que el esteroide efectivamente actúa a través de su receptor. Ambos quimioterápicos provocan un aumento de la actividad de caspasa-3: 62 y 150% (DOXO y PXL, respectivamente), el cual es revertido por Dex (8,5% DOXO+Dex vs. Control y 0,9% PXL+Dex vs. Control), demostrando no sólo la capacidad de los quimioterápicos de inducir apoptosis en esta línea celular sino de los GC de inhibirla. Finalmente, los niveles de Bcl-2 y Bcl-XL, medidos por Western blot, aumentan en las células tratadas con Dex+DOXO, mientras Dex inhibe la reducción de los niveles de Bcl-XL por PXL pero no los de Bcl-2. Estos Resultados sugieren que en las células LM3 Dex inhibe la apoptosis inducida por DOXO y PXL a través de mecanismos que involucran los niveles proteicos de Bcl-2 y Bcl-XL.

ONCOLOGIA O3

372 (26) C-JUN CONTRIBUYE AL DESARROLLO DE MELANOMA A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DE PDK1, AKT Y PKC. D Martire Greco¹, M S Bravo¹, H Kim², Z Ronai², P Lopez Bergami¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²The Burnham Institute, La Jolla, USA
<pablobergami@gmail.com>

Las mutaciones en *N-Ras* y *B-Raf* que frecuentemente se observan en melanoma resultan en la activación constitutiva de la vía de señalización MAPK-ERK. La activación de ERK incrementa la expresión y actividad del factor de transcripción c-Jun y proporciona un vínculo entre las vías ERK y JNK. Si bien el rol de ERK y c-Jun en tumorigénesis está establecido, poco se sabe acerca de las proteínas que median sus efectos. Por lo tanto, el objetivo de nuestro trabajo es la identificación de proteínas que medien el rol de c-Jun en el desarrollo de melanoma. En el presente trabajo, se describe la regulación transcripcional de la proteína quinasa dependiente de fosfoinositidos (PDK1) por c-Jun a través de la unión a sitios Sp1 en la región proximal del promotor. La inhibición de c-Jun por medio de ARN de interferencia o TAM67, un dominante negativo de c-Jun, resultó en una menor expresión de PDK1 y en una menor fosforilación y actividad de sus sustratos Akt y PKC. Estos cambios se debieron a los menores niveles de PDK1 ya que pudieron ser revertidos por expresión de PDK1 exógeno. Al regular PDK1, c-Jun modula la fosforilación de otros sustratos de PDK1 como RSK y S6K. La inhibición de la señalización por c-Jun mediante la expresión de TAM67 indujo una reducción en el tamaño celular, el crecimiento y la habilidad de estas células de formar tumores en ratones. Los efectos descriptos fueron mediados por PDK1 ya que la infección de células que expresaban TAM67 con retrovirus expresando PDK1 revirtió estos procesos. Los mayores niveles de c-Jun en líneas celulares de melanoma y en muestras de tumores coincidió con mayores niveles de PDK1 y con un aumento en la fosforilación de PKC y Akt. La identificación de la regulación de PDK1 por c-Jun pone en evidencia un importante mecanismo mediador de la actividad oncogénica de c-Jun y provee nuevos datos acerca de la activación de Akt y PKC en melanoma.

0373 (549) OSTEOCLASTOGÉNESIS ESPONTÁNEA DE MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE MÉDULA ÓSEA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO, SIN COMPROMISO ÓSEO. V B Fernández Vallone ¹, J Otaegui ¹, V Lavovskiy ¹, F Dimase ², E Batgelj ², L Feldman ³, R H Bordenave ⁴, N A Chasseing ¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental IBYME; ²Hospital Militar Central; ³Fundación Favaloro; ⁴Hospital zonal de agudos Iriarte de Quilmes <vallone@dna.uba.ar>

Un 60-70% de las pacientes con cáncer de mama avanzado (PCM) desarrollan metástasis óseas. La invasión y proliferación tumoral en hueso se da por un desbalance entre los procesos de osteogénesis y osteoclastogénesis, que en las PCM es a predominio osteoclástico. Dado que el osteoblasto/osteocito y la célula madre mesenquimal (MSC) de médula ósea (MO) regulan la osteoclastogénesis, es lógico pensar, que antes que el tumor afecte al hueso se produzca una alteración en la formación de osteoclastos (OC). Objetivo: Estudiar la formación de OC a partir de células mononucleares (CMN) de MO y de monocitos de sangre periférica (moSP) de PCM avanzado, sin tratamiento, sin metástasis en MO/hueso, menopáusicas y sin osteoporosis y voluntarias sanas (VS). Evaluar el efecto de medios condicionados (Mco) del cultivo de CMN de MO de PCM sobre la diferenciación osteoclástica de moSP de VS. *Diferenciación osteoclástica*: CMN de MO de 6 PCM y 5 VS se cultivaron 5 días con o sin VitD3 y 20% suero de caballo, se recogieron los Mco y se continuó el cultivo. moSP de 4 PCM y 4 VS se cultivaron en presencia de M-CSF y 10% SBF, al 3^{er} día se estimularon con RANKL y M-CSF. moSP de 4 VS se cultivaron con 90% de 4 Mco de CMN de MO de PCM, 10% SBF y M-CSF. Al día 16 se contaron como OC células con 3-5 núcleos y TRAP+. % de OC (X±ES): MO: producción espontánea de OC en PCM (36.9±1.9) y falta de respuesta a la VitD3 (23.2±4.3), mientras que las VS no tuvieron osteoclastogénesis espontánea y la respuesta a VitD3 fue 9.8±0.6.

SP: osteoclastogénesis espontánea, PCM (25.7±0.5) y VS (5.9±3.5), p=0.002. El % de incremento de OC inducido por RANKL fue en PCM=8.7±0.9 y VS=26.6±3.7 (p=0.003). Post-estimulo con Mco de PCM los moSP de VS tuvieron valores de diferenciación osteoclástica semejantes a los inducidos con RANKL (34.6±1.9 vs. 32.6±2.5). **Conclusión:** PCM presentaron osteoclastogénesis espontánea en MO y SP y los Mco de las CMN de MO de las mismas estimularon la diferenciación osteoclástica de moSP normal.

0374 (236) INHIBICIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL EN TEJIDOS CON CANCERIZACIÓN DE CAMPO MEDIANTE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT): ESTUDIOS EXPERIMENTALES QUE EVIDENCIAN UNA NUEVA APLICACIÓN POTENCIAL DE BNCT.

A Monti Hughes ¹, V A Trivillin ¹, E M Heber ¹, E Pozzi ^{1,2}, D W Nigg ³, O Calzetta ⁴, H Blaumann ⁴, J Longhino ⁴, S I Nievas ⁵, R F Aromando ⁶, M E Itoiz ^{1,6}, A E Schwint ¹

¹División Patología de la Radiación, Departamento de Radiobiología, Centro Atómico Constituyentes (CAC), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA); ²Departamento de Reactores de Investigación y Producción, Centro Atómico Ezeiza, (CNEA); ³Idaho National Laboratory, Idaho Falls, Idaho, USA; ⁴Departamento de Ingeniería Nuclear, Centro Atómico Bariloche, CNEA, Rio Negro, Argentina; ⁵Departamento de Química, CNEA, Buenos Aires, Argentina; ⁶Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, UBA, Buenos Aires, Argentina.
<andrea.monti@cnea.gov.ar>

BNCT es una terapia binaria basada en la irradiación con neutrones y la acumulación selectiva de compuestos borados en tumor. La reacción de captura entre un neutrón térmico y ¹⁰B genera partículas letales de corto alcance que dañan el tumor sin daño significativo al tejido normal. Previamente demostramos la eficacia de BNCT mediado por borofenilalanina (BPA), GB-10 (Na₂¹⁰B₁₀H₁₀) y (GB-10 + BPA) para controlar tumores, sin radiotoxicidad en el tejido normal, en un modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hamster. Dado que las recurrencias loco-regionales a partir de tejido con cancerización de campo son frecuentemente la causa del fracaso terapéutico, el objetivo del presente trabajo fue explorar a largo plazo, en un modelo de cancerización de campo desarrollado por nosotros, el potencial inhibitorio sobre el desarrollo de segundos tumores primarios de los mismos protocolos de BNCT que fueron eficaces para controlar tumores. Se realizaron estudios de biodistribución de boro seguidos por estudios de BNCT *in vivo* en el Reactor Nuclear RA-6, con seguimiento de 8 meses. Los 3 protocolos de BNCT indujeron una inhibición estadísticamente significativa (ANOVA con mediciones repetidas, Chi cuadrado con corrección de Yates) en el desarrollo de tumores a partir de tejido con cancerización de campo, llegando a una inhibición máxima respecto del control no tratado con BNCT de 77-100%, sin radiotoxicidad en el tejido normal. El efecto inhibitorio de BPA-BNCT y (GB-10 + BPA)-BNCT persistió en 51% en el último tiempo estudiado (8 meses), mientras que el efecto de GB-10-BNCT y de haz solamente fue transitorio. A los 8 meses de tratamiento con BPA-BNCT ó (GB-10 + BPA)-BNCT, las bolsas con cancerización de campo que no desarrollaron tumores recuperaron las características macroscópicas y microscópicas de las bolsas normales no cancerizadas. El presente estudio evidencia el potencial de BNCT de inhibir recurrencias loco-regionales, sugiriendo una nueva aplicación de BNCT.

0375 (428) REGULACIÓN HORMONAL DEL ESCAPE TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA: PROGESTERONA REGULA LA FRECUENCIA DE CÉLULAS T REGULADORIAS Y LA EXPRESIÓN DE GALECTINA-1. M Salatino ¹, D O Croci ¹, J M Ilarregui ¹, G A Bianco ¹, M A Toscano ¹, G A Rabinovich ¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental <salatino@dna.uba.ar>

La progesterona (Pg) ha sido asociada con fenómenos inmunosupresores y cáncer. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de esta hormona de favorecer mecanismos de escape en cáncer de mama. Observamos que el tratamiento con el análogo de la Pg acetato de medroxiprogesterona (MPA) indujo la expresión de galectina-1 (Gal-1) en células de cáncer de mama humano MCF-7 (FI=2,3 C vs MPA) y T47D (FI=4,3) y en tumores mamarios murinos hormono-dependientes C4HD (FI=3) tanto a nivel proteico por Western blot como a nivel transcripcional por ensayos de actividad Luc (MCF-7, FI=3) y RT-PCR en tiempo real (T47D, FI=2,6). A su vez, observamos por citometría de flujo que el agregado de MPA a un cocultivo de MCF-7 con células mononucleares de sangre periférica indujo un incremento en la frecuencia de células T regulatorias (Tregs) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (0,5 vs 1,1%, p<0,05). Asimismo, el tratamiento de ratones con MPA determinó un aumento significativo en ganglios linfáticos de la expresión del marcador específico Foxp3 (FI=2,9, RT-PCR en tiempo real) y un aumento en Tregs (4,2 vs 6,9%, p<0,05 por citometría de flujo) en ratones Balbc portadores del tumor C4HD. Cuando se trataron ratones C57BL6 con MPA el porcentaje de Tregs en ganglio aumentó de 6,8% a 10,8% (p<0,05), inducción que fue dependiente de Gal-1, ya que en ratones deficientes en esta proteína (*Lgals-1^{-/-}*) el MPA no tuvo efecto. Finalmente, evaluamos el efecto que la Pg ejercía sobre la expresión tumoral de la quimiocina CCL22, involucrada en el reclutamiento de Tregs. El tratamiento con MPA indujo un aumento en la expresión de CCL22 en células tumorales humanas T47D (FI=2,4) y en el tumor C4HD (FI=2,1). En resumen, nuestros Resultados indican que en cáncer de mama la Pg induce la expresión de Gal-1 y un incremento en la frecuencia de células Tregs las cuales serían reclutadas por la quimiocina CCL22 tumoral generando un estado de inmunosupresión lo que contribuiría a los efectos deletéreos de la Pg en cáncer de mama.

0376 (555) EFECTO TERAPÉUTICO DE DOXORUBICINA LIPOSOMADA EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS SENSIBLES O RESISTENTES A LA TERAPIA ENDOCRINA. R Soldati¹, J Bolado¹, I Luthy¹, L Colombo², A Molinolo³, C Lanari¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²Instituto Angel H. Roffo; ³National Institute of Health, NIH <soldati@dna.uba.ar>

La doxorubicina (doxo) es ampliamente utilizada en el tratamiento del cáncer de mama y de ovario. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de carcinomas mamarios murinos con distinta respuesta hormonal a la doxo liposomada con el fin de encontrar terapias más efectivas y de menor toxicidad. Se usó como control positivo la línea de cáncer de ovario SKOV-3 transplantada en ratones *nude*. Se compararon dosis endovenosas de 18 y 9 mg/kg de peso de doxo libre, o de las formas liposomadas Caelix (Cx) o Doxopeg (Dg), administrados 11 días después del inóculo tumoral, una vez/semana. Se evaluó crecimiento tumoral durante 1 mes realizando luego autopsias completas. La dosis alta de Cx o Dg indujo regresión casi completa mostrando escasos signos de toxicidad; la doxo libre retardó el crecimiento tumoral observándose importantes efectos tóxicos asociados (p<0.001). Dosis bajas de Dg o Cx arrestaron los tumores en forma similar (p<0.001) y la doxo libre indujo un retardo del crecimiento tumoral (p<0.05). No hubo signos de toxicidad. Se usaron luego dos carcinomas mamarios murinos C4-HI y CC4-3-HI, ambos inhibibles por antiprogesteronas y 17- β -estradiol (E2), y el C4-2-HI no respondedor. Los tratamientos fueron similares a los usados para la línea SKOV-3. Los tres tumores se arrestaron por igual al tratarlos con Cx o Dg aun en dosis bajas (p<0.001). Luego se usó el tumor C4-HI y se trataron los ratones con RU-486 (12 mg/kg/día) o con pellets sc de E2 (5 mg) o con Dg dosis baja o en tratamientos combinados. Dg junto con E2 o RU 486 indujo mejor efecto terapéutico que cada droga por separado (p<0.05). Estos estudios demuestran a) la superioridad terapéutica de Dg y Cx con respecto a doxo libre sin observarse diferencias entre Cx y Dg, b) que la respuesta a doxo fue inde-

pendiente de la respuesta endocrina y c) que las terapias combinadas de doxo liposomada con tratamiento hormonal mejoran la eficacia terapéutica sugiriendo que se puede bajar aún más la dosis de doxo.

0377 (585) INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO METASTÁSICO DEL CARCINOMA MAMARIO MURINO M-406 Y AUMENTO DE SUPERVIVENCIA POR QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA (QTM) CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y CELE-COXIB (CEL). L E Mainetti¹, A Rossa¹, V R Rozados¹, O G Scharovsky^{1 2}

¹Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R.; ²Consejo de Investigaciones, U.N.R. <leandromainetti@gmail.com>

La quimioterapia metronómica consiste en la administración crónica de drogas en dosis bajas, a intervalos regulares y sin períodos largos de descanso. Nuestro objetivo fue continuar el estudio del efecto de la QTM combinada con Cy y Cel sobre el desarrollo metastásico. Para ello, ratones endocriados CBI, fueron inoculados con células M-406 vía i.v. En el día 3 los animales se distribuyeron en cuatro grupos (G) experimentales (n=10/grupo) que recibieron: GI) Testigos: 0,3ml de diluyente p.o., 5 días/semana; GII) Cy en el agua de bebida con ingesta diaria de 20-30mg/kg de peso; GIII) Cel, p.o., 30mg/kg de peso/día, 5 días/semana; GIV) tratamientos GII + GIII. Se extrajo sangre en los días 0 y 14 para evaluar: glóbulos blancos, fórmula leucocitaria y concentración sérica de GOT, GPT, urea y creatinina; se determinó 2 veces/semana el peso corporal. Los animales se sacrificaron en el día 14. El N° de metástasis pulmonares fue menor en GIV comparado con GI (p<0.001), siendo su diámetro promedio para GII y GIV menor, comparado con GI (p<0.001) y con GIII (p<0.001). El peso pulmonar relativo, fue mayor en GI respecto al de GII y GIV (p<0.001) y en GIII respecto al de GII y GIV (p<0.001). No se constataron efectos tóxicos debidos al tratamiento evaluados por evolución del peso corporal, parámetros serológicos y fórmula leucocitaria Sin embargo, se observó una disminución del N° de glóbulos blancos en GII y GIV (día 14) respecto al día 0 (p<0.05). La supervivencia en GIV fue mayor que en GI (p<0.0005). Estos Resultados, junto a los obtenidos con otro carcinoma mamario murino sugieren que: 1) El tratamiento combinado es superior a los monoterapias; 2) La QTM es un método eficaz y de escasa toxicidad para inhibir el desarrollo de metástasis pulmonares de carcinoma de mama. Tales propiedades, sumadas al incremento observado en la supervivencia, permiten pronosticar su aplicación a nivel clínico en un futuro cercano.

0378 (473) EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LA VACUNA NEUGCGM3/VSSP EN UN MODELO MURINO DE MELANOMA CON EXPRESIÓN ESTABLE DE GANGLIÓSIDOS GLICOLILADOS. V I Segatori¹, L L Otero¹, D E Gomez¹, D F Alonso¹, M R Gabri¹

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes <valeriasegatori@yahoo.com.ar>

Los ácidos siálicos son azúcares de 9 carbonos que forman parte de los gangliósidos, miembros de la familia de los glicoesfingolípidos. La síntesis del ácido siálico N-glicosilado (NeuGc), una variante altamente expresada en melanoma humano, es realizada por la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa (CMAH). En ratones, los tejidos normales expresan la enzima CMAH, mientras que los tejidos tumorales por lo general no lo hacen. Por lo tanto, los modelos murinos son de limitada utilidad para evaluar terapias vacunales contra NeuGc por no expresar el antígeno blanco. Mediante técnicas de clonación de la secuencia CMAH y transfección por lipofección, fue posible desarrollar a partir de la línea de melanoma murino B16, una población de células con expresión estable de NeuGc (B16-H). La síntesis de NeuGc derivó en una marcada presencia del gangliósido NeuGcGM3 en la

superficie celular. La capacidad proliferativa de las células B16-H duplicó la registrada por la línea B16 parental ($p < 0,001$, t test), mientras que mostró un perfil migratorio *in vitro* alterado. En ratones singénicos C57bl/6, se alcanzó el 100% de toma tumoral con la inyección de 5×10^5 células B16-H, mientras que en la línea parental este valor se alcanzó con un desafío de 1×10^4 . Los animales fueron preinmunizados con 4 dosis quincenales de 200 μ g/dosis de la vacuna NeuGcGM3/VSSP (provista por el Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba) y desafiados con un inóculo de 2×10^4 de células B16-H. Ningún ratón vacunado mostró desarrollo tumoral, mientras que en el lote control la incidencia fue del 80% ($p < 0,01$, Fischer's test). Complementariamente, a fin de desarrollar líneas con expresión variable de NeuGcGM3, se procedió a establecer poblaciones clonales a partir de la línea B16-H. Los Resultados muestran el desarrollo de un novedoso modelo de melanoma murino con expresión de NeuGc, de utilidad para la evaluación preclínica de vacunas contra este tipo de gangliosidos.

0379 (550) EL ESTADO DE INMUNOSUPRESIÓN GENERADO POR TUMORES COMPUESTOS POR CELULAS MIOEPITELIALES INVOLUCRA A LOS LINFOCITOS T REGULATORIOS. M A Krasnapolski ¹, A Maglioco ², G Peluffo ¹, G Dran ², E Bal de Kier Joffé ¹, A M Eijan ¹

¹Instituto de Oncología; ²ILEX-CONICET. Division Medicina Experimental, IHEMA, Academia Nacional de Medicina <mkrasnapolski@gmail.com>

El adenocarcinoma mamario murino M38, de BALB/c, está formado por varias subpoblaciones de células tumorales. Generamos la línea mixta LM38-LP (luminal y mioepitelial), la epitelioide LM38-HP y la mioepitelial LM38-D2. *In vivo*, la línea LM38-HP crece menos que la LM38-D2 y LM38-LP. Sin embargo, *in vitro*, tiene la mayor velocidad de duplicación. Mostramos que su baja tumorigenicidad y crecimiento *in vivo* se deben al rechazo inmunológico. Las líneas LM38-LP y LM38-D2, que tienen células mioepiteliales, evitarían el rechazo produciendo TGF β activo que induciría un estado inmunosupresor. Para poner en evidencia *in vivo* la actividad inmunosupresora de las células mioepiteliales hicimos un ensayo de respuesta a un segundo inóculo contralateral en ratones BALB/c. Inoculamos sc células LM38-LP, LM38-D2, o vehículo y 14 días más tarde inoculamos sc en el otro flanco, células LM38-HP. También realizamos el ensayo complementario inoculando células LM38-HP, y células LM38-LP o LM38-D2 en el segundo flanco. Se evaluó la incidencia tumoral en el segundo flanco a los 40 días. Observamos que la presencia de tumores LM38-LP o LM38-D2 aumentó la tumorigénesis de LM38-HP de 30% a 80%, mientras que la presencia de tumores LM38-HP no afectó la de LM38-LP o LM38-D2. El análisis de citoquinas producidas por los ganglios drenantes a los tumores comparadas con ganglios normales (Array de Citocinas) mostró que LM38-LP indujo disminución de IL6, Rantes y SCF, y aumento de GM-SCF e IL3. LM38-HP indujo aumento de TIMP1, IL3 e IL8. LM38-D2 indujo aumento de TIMP1. Los ganglios drenantes a LM38-LP y LM38-D2 presentaron un número significativamente ($p < 0,05$) mayor de linfocitos CD4+CD25+ (2,67 y 3,40 veces sobre el control resp.) y CD4+CD25+FoxP3+ (2,03 y 2,24 veces sobre el control resp.) evaluado por citometría de flujo. La célula mioepitelial tumoral presentaría un mecanismo de escape mediado posiblemente por el reclutamiento y/o la inducción de linfocitos Tregs.

ONCOLOGIA 04

0380 (60) EXPRESIÓN DE GALECTINA-8 Y SUS LIGANDOS EN TEJIDO MAMARIO HUMANO. V M Cárdenas Delgado ¹, M T Elola ¹, I Frahm ², M F Troncoso ¹, M Salatino ³, G A Rabinovich ³, C Wolfenstein-Todel ¹

¹Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica-UBA-CONICET; ²Sanatorio Mater Dei; ³instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET <vmanuel_cd@yahoo.com.ar>

Las galectinas son lectinas caracterizadas por poseer secuencias de aminoácidos consenso y al menos un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC) con afinidad por α -galactósidos. La galectina-8 (Gal-8) es un miembro de esta familia aún poco explorado, que existe en varias isoformas bi- y mono-DRC, y que presenta localización citoplasmática, nuclear y extracelular. El objetivo general del presente trabajo es el estudio de la expresión de Gal-8 y sus ligandos en tejido mamario humano. Son nuestros objetivos específicos: 1) Estudiar la expresión de Gal-8 en líneas celulares humanas de carcinoma mamario; 2) Identificar proteínas que se unen a Gal-8 en líneas de carcinoma mamario humano y 3) Evaluar la expresión de Gal-8 en tejidos humanos mamaros normales y tumorales. Los Resultados demostraron que los extractos totales de células T47D y MCF-7 de carcinoma mamario humano presentaron una banda de Gal-8 (36 kDa) en inmunoblotting revelado con un anticuerpo policlonal anti-Gal-8. Por otra parte, a los efectos de identificar proteínas que ligan Gal-8, la fracción de membranas de las células T47D se sometió a cromatografía de afinidad en AffiGel 10-Gal-8. El eluido se analizó en SDS-PAGE, y las bandas resultantes se digirieron *in gel* con tripsina y se sometieron a HPLC-espectrometría de masa, identificándose las siguientes proteínas ligandos: CD98h, CD36, CD71, CD82, CD107a/b, CD276 y α -actina. La presencia de ligandos para Gal-8 en la superficie de células T47D fue también confirmada por FACS. En estudios preliminares de inmunohistoquímica, se encontró Gal-8 en cortes histológicos de tejidos mamaros humanos normales y malignos. Se concluye que Gal-8 se expresa tanto en líneas celulares de carcinomas mamaros como en tejidos mamaros humanos, y que varias proteínas se unen en forma específica a esta lectina en carcinomas mamaros, pudiendo alguna de ellas mediar procesos vinculados a la transformación maligna o la metástasis.

0381 (188) LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) Y LA MODULACIÓN DE LA TRANSICIÓN DE CARCINOMA MAMARIO DUCTAL IN SITU A INVASIVO MEDIADA POR FIBROBLASTOS INFLAMATORIOS. G Peluffo ¹, M Hu ², K Polyak ²

¹ Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires; ²Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Ma, USA <gpeluffo@imcd.uba.ar>

La homeostasis tisular depende de un diálogo espacial y temporal entre el epitelio y el estroma circundante (fibroblastos, entre otros componentes). La inflamación, relacionada con un incremento del riesgo de cáncer, es primariamente una reacción estromal, y los cambios asociados en el microambiente serían responsables de la tumorigénesis. Previamente se halló que la coinoculación de fibroblastos inflamatorios de artritis reumatoidea (RASf) y las células de DCIS mamario humano MCF10DCIS.com (DCIS) incrementa la invasión y el crecimiento tumoral subcutáneo, aumentando la expresión de la COX-2 en las células tumorales. Su inhibidor, celecoxib, disminuyó el crecimiento asociado a la coinoculación. Las células DCIS cultivadas en Matrigel en presencia de RASf, desarrollaron estructuras 3D esféricas con protuberancias invasivas que se prolongan hacia los fibroblastos. Se verificó el incremento de la COX-2 (qPCR) en las mamíferas provenientes de cocultivos comparadas con el control sin RASf, así como también de MMP-14, aunque no de MMP-9 (similar resultado se obtuvo en células DCIS recuperadas de cultivos 2D). No obstante se observó un aumento en la actividad de MMP-9 en medios condicionados de cocultivos. Se determinó un aumento significativo de la migración y la invasión (cámaras Transwell), tanto en cocultivos directos como indirectos, que se redujo cuando se utilizaron células DCIS modificadas con el ARN de interferencia para COX-2 o MMP-9, o por el tratamiento con celecoxib. Se encontró que el cocultivo aumenta la actividad de NF κ B en las células DCIS, y su inhibición resultó en una reducción de la invasión. La presencia de un microambiente inflamatorio (RASf), induciría la transición de DCIS a invasivo mediante la activación de una cascada proteolítica que incluye a MMP-14 y MMP-9. COX-2 y NF κ B estarían involucrados en este proceso, dado que

inhibiendo ambos se revierte parcialmente el fenotipo invasivo asociado al cocultivos con fibroblastos inflamatorios.

0382 (233) EFECTO DE AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS EN MODELOS IN VIVO DE CÁNCER DE MAMA HUMANO. C

Pérez Piñero ¹, M G Sarappa ¹, L F Castillo ¹, A Bruzzone ¹, I A Luthy ¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental <perez@dna.uba.ar>

Describimos la expresión de receptores α_2 -adrenérgicos en líneas tumorales mamarias humanas, asociados a un aumento en la proliferación celular y el crecimiento tumoral. El antagonista α_2 -adrenérgico rauwolscina (RAW) inhibe el crecimiento tumoral en modelos *in vivo*. Otros grupos han descripto la expresión de receptores β_2 -adrenérgicos (β_2 -RA) en líneas tumorales mamarias asociadas a una disminución de la síntesis de ADN. **Objetivo:** estudiar la expresión de β_2 -RA y el efecto de agonistas en las líneas tumorales mamarias humanas IBH-4 e IBH-6 *in vitro* y creciendo en ratones desnudos. Se detectó marcación positiva para β_2 -RA por inmunofluorescencia en ambas líneas celulares. Se administró diariamente el agonista salbutamol (SAL) 1,2mg/Kg, el antagonista propranolol 1mg/Kg o ambos a ratones hembra portadores de tumores IBH-4 e IBH-6. SAL disminuyó el crecimiento tumoral respecto del control (ctrl). Ej: Tumor IBH-4 día 20 SAL 444,1 \pm 76,5mm³ vs ctrl 843,4 \pm 189,4mm³ p<0.05. Tumor IBH-6 día 25 SAL 201,2 \pm 44,5mm³ vs ctrl 844,2 \pm 317,4mm³ p<0.05. También se administraron diariamente el antagonista RAW 0,5mg/Kg, SAL 1,2mg/Kg o ambos. Ej: Tumor IBH-6 día 22 SAL 213,7 \pm 27,8mm³ p<0.05, RAW 161,7 \pm 27,1mm³ p<0.01, RAW+SAL 209 \pm 52,3mm³ vs ctrl 372 \pm 60,7 mm³ p<0.05. Tumor IBH-4 día 24 SAL 594,2 \pm 66,5mm³ p<0.01, RAW 775 \pm 68,1mm³ p<0.01, RAW+SAL 775,04 \pm 68,1 mm³ vs ctrl 1237 \pm 134,9mm³ p<0.05. No hay un efecto aditivo ni sinérgico entre SAL y RAW. En cultivos primarios del tumor IBH-6 el agonista isoproterenol (ISO) disminuyó la incorporación de ³H-Timidina. Ej: IBH-6 ISO 10 nM 71 \pm 5.6% p<0.05. Por *Western Blot* se detectó una disminución en la fosforilación de ERK1/2 luego de la incubación a tiempos cortos con ISO y SAL. **Conclusión:** la estimulación α -adrenérgica *in vivo* disminuye el crecimiento de los tumores mamarios IBH-4 e IBH-6. Observamos una disminución en la proliferación celular luego del tratamiento con ISO *in vitro* y una disminución de la fosforilación de ERK 1/2.

0383 (519) DETECCIÓN MOLECULAR DEL FACTOR DE COAGULACIÓN III (TF). DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DETECCIÓN MOLECULAR PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CARCINOMA MAMARIO. L Otero ¹, V Vazquez ¹, M Castro ², G Cinat ², D F Alonso ¹, M R Gabri ¹, D E Gomez ¹

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Depto. de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes; ²Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" <lotoero@unq.edu.ar>

Las estrategias de detección molecular permiten determinar tempranamente la existencia de enfermedad tumoral con su potencial impacto en el tratamiento. La expresión de factor de coagulación III o *Tissue Factor* (TF) ha sido reportada en células transformadas y se cree que su expresión está relacionada con el fenotipo metastásico. Se diseñó una estrategia de detección molecular del ARNm de TF para pacientes con carcinoma mediante RT-PCR seguida de PCR anidada, diseñando cebadores interexónicos y contemplando las variantes de *splicing* de la secuencia. Utilizando la línea MCF7 de cáncer mamario humano, se optimizó la técnica alcanzando niveles de sensibilidad de hasta 5 ng de ARN total en la ronda de PCR y de 500 pg para PCR anidada. Además, se detectó la presencia del marcador partiendo de ARN total en las líneas celulares H125, HeLa (carcinomas humanos de pulmón y cervix), WERI-RB1 e Y79 (retinoblastomas humanos). TF no fue detectado en material proveniente de la línea SKmel (melanoma humano). Se analizaron 27 muestras de sangre venosa provenientes de 16 pacientes con carcinoma

mamario avanzado. Se interpreta que casos positivos para TF en la etapa de RT-PCR contienen mayor carga inicial de la secuencia por lo que, según los Resultados obtenidos, los pacientes se dividieron en 3 grupos: positivos para RT-PCR (Alta carga: 5/16, 31%), positivos sólo para PCR anidada (Baja carga: 8/16, 50%) y negativo para ambos (Carga nula: 3/16, 19%). En los pacientes, la mediana de supervivida para el grupo de alta carga fue de 16m, mientras que en el grupo de pacientes con carga baja y nula más del 50% de los pacientes se encontraba vivo al momento del cierre de este estudio. En este trabajo, mostramos el desarrollo de un novedoso sistema de diagnóstico molecular basado en la amplificación del ARNm del TF y el análisis preliminar de su utilización como valor pronóstico para carcinoma mamario.

0384 (273) EFECTO DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) SOBRE TUMOR, TEJIDO PREMALIGNO Y TEJIDO NORMAL EN UN MODELO DE CÁNCER ORAL EN HAMSTER: BNCT IN VIVO EN LA FACILIDAD DESARROLLADA EN EL REACTOR NUCLEAR RA-3. E C Pozzi ¹, D W Nigg ², M Miller ³, S I Thorp ³, E M Heber ⁴, V A Trivillin ⁴, L Zarza ⁵, G Estrzyk ⁵, A Monti Hughes ⁴, A J Molinari ⁴, M Garabalino ⁴, R F Aromando ⁶, M E Itoiz ⁴, A E Schwint ⁴

¹Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina; ²Idaho National Laboratory, Idaho Falls, USA; ³Departamento de Instrumentación y Control, CNEA, Argentina; ⁴Departamento de Radiobiología, CNEA, Argentina; ⁵Departamento de Reactores de Investigación y Producción, CNEA, Argentina; ⁶Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, UBA, Argentina <epozzi@cnea.gov.ar>

BNCT es una terapia binaria basada en la irradiación con neutrones y la acumulación selectiva de compuestos borados en tumor. La reacción de captura entre un neutron térmico y ¹⁰B genera partículas letales de corto alcance que dañan el tumor sin daño significativo al tejido normal. Previamente demostramos la eficacia terapéutica de BNCT en un modelo de cáncer oral en la bolsa de la mejilla del hamster empleando el haz de neutrones hipertérmico del Reactor Nuclear RA-6 (Centro Atómico Bariloche). Habiendo desarrollado una facilidad para irradiación de animales pequeños, cultivos celulares y órganos ex-situ en el Reactor Nuclear RA-3 (CAE), el objetivo del presente trabajo fue caracterizar dosimétricamente el sistema de irradiación de animales pequeños y hacer estudios radiobiológicos de BNCT en el modelo de cáncer oral en hamster. Se midió el espectro de flujo neutrónico y la tasa de dosis gamma. Se desarrolló y caracterizó dosimétricamente un blindaje de carbonato de ⁶Li que permite exponer la bolsa, protegiendo el cuerpo del hamster. Se realizaron estudios de BNCT mediado por los compuestos borados borofenilalanina (BPA) (n=33 tumores), GB-10 (Na₂¹⁰B₁₀H₁₀) (n=11 tumores) y (GB-10 + BPA) (n=13 tumores) en un rango de dosis de 6-8.5 Gy. Se estudió el efecto de BNCT sobre tumor, tejido premaligno y tejido normal a nivel macroscópico e histológico. El flujo de neutrones térmicos fue de 7.1 x 10⁹ n cm⁻² s⁻¹. La tasa de dosis gamma en aire fue de 4.8 \pm 0.5 Gy/h. El blindaje redujo en más de 20 veces el flujo de neutrones térmicos. El control tumoral (remisión total + remisión parcial) con los 3 protocolos de BNCT fue significativo (ANOVA), con valores de 73-85% vs 0% en animales con tumor no tratados. El tejido premaligno exhibió mucositis reversible. No se observó radiotoxicidad en tejido normal. La facilidad del RA-3 resulta adecuada para estudios experimentales de BNCT. Se demostró la eficacia terapéutica de BNCT en el RA-3 para tratar el cáncer oral experimental.

0385 (356) L-DGE/M, UNA VARIANTE DEL LINFOMA L-DGE OBTENIDA POR SELECCIÓN, TIENE MAYOR PODER METASTÁSICO Y SOBRE-EXPRESA GALECTINA-1. M E Zacarías Fluck ¹, G A Rabinovich ², O Scharovsky ¹

¹Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario; ²Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experi-

mental (BYME-CONICET)
<marianozacarias@hotmail.com>

El tumor L-DGE es un linfoma murino inmunoblástico que apareció espontáneamente en un ratón de la línea BALB/c mantenido por pasajes s.c. en ratones singeneicos. Este linfoma se caracteriza por desarrollar metástasis ganglionares espontáneas durante el crecimiento tumoral más baja frecuencia. Galectina-1 (Gal-1) es una proteína inmunoreguladora de unión a glicanos, que controla la proliferación y supervivencia de linfocitos T. Su sobreexpresión se asocia con la progresión maligna del tumor. Con el objetivo de obtener una variante del tumor que se diferenciara en su agresividad y, por ende, en su expresión de Gal-1, se llevó a cabo un proceso de selección. Se desafiaron 12 hembras BALB/c con L-DGE, vía s.c. (día 0). Se seleccionó como donante para el linfoma de crecimiento más agresivo (L-DGE/M) el tumor de mayor volumen (V). Se repitió el procedimiento en 25 pasajes consecutivos. Se estudió crecimiento tumoral y capacidad metastásica desafiando 20 ratones con c/tumor. Los datos V vs. tiempo se ajustaron con un modelo exponencial creciente y se obtuvo la tasa de crecimiento. La presencia de metástasis ganglionares (Met) se determinó en el momento del sacrificio. La tasa de crecimiento del linfoma L-DGE/M fue mayor que la de L-DGE ($p < 0,05$). Ello concordó con los datos de supervivencia (vida media de ratones con L-DGE mayor a la de portadores de L-DGE/M; $c^2 < 0,01$). El linfoma L-DGE/M fue más metastásico que L-DGE ($p < 0,001$). De manera interesante, la expresión de Gal-1 fue mayor para L-DGE/M que para L-DGE ($p < 0,05$), mientras que no difirió en las Met de ambos tumores. Resultados preliminares indican expresión diferencial de Gal-1 en metástasis de L-DGE/M según provengan de animales con más de una Met o con sólo una. Se logró obtener una variante más agresiva del L-DGE que presenta un incremento de su capacidad metastásica y un aumento de la expresión tumoral de Gal-1, sugiriendo una relación causal entre estas dos variables.

0386 (102) BRCA1 AUMENTA LA SENSIBILIDAD DE LAS CÉLULAS TUMORALES DE PRÓSTATA A LOS AGENTES GENOTÓXICOS A TRAVÉS DE UN MECANISMO MEDIADO POR GADD153. P De Luca ¹, F Zalazar ¹, J Cotignola ¹, G Gueron ¹, E Vazquez ¹, A De Siervi ¹

¹Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA, CONICET <paoladeluca81@yahoo.com.ar>

El gen de la susceptibilidad del cáncer de mama (BRCA1) es un gen supresor de tumores y mutaciones en este gen confieren un riesgo alto para varios tipos de cánceres que responden a hormonas, incluyendo el cáncer de próstata. BRCA1 interactúa directamente con el receptor de andrógenos que es un factor de transcripción clave en la regulación del crecimiento del epitelio prostático normal y tumoral. En este trabajo, encontramos un nuevo blanco de BRCA1: GADD153, una proteína de arresto del crecimiento y respuesta al daño en el ADN que está asociada a la apoptosis inducida por estrés del retículo endoplasmático. Utilizando estudios *in vivo* (inmunoprecipitación de la cromatina: CHIP) e *in vitro* ("binding assay"), determinamos que BRCA1 se une al promotor de GADD153 luego del tratamiento con agentes genotóxicos (Doxorubicina o UV) en líneas celulares de cáncer de próstata. La sobre-expresión de BRCA1 sinergizó la inducción de la actividad transcripcional de GADD153 provocada por estos agentes. El silenciamiento de BRCA1 produjo una marcada reducción de la actividad del promotor de GADD153. Estos Resultados indican que BRCA1 induce la expresión de GADD153 luego del daño en el ADN. Además observamos que BRCA1 es capaz de regular no sólo la expresión de GADD153 sino también su función ya que al silenciar en forma transiente o estable la expresión de BRCA1, se redujo significativamente la apoptosis inducida por daño en el ADN, analizada por citometría de flujo (Anexina V/Ioduro de Propidio). Cabe resaltar que por ensayos de viabilidad celular (MTS) observamos que la sobre-expresión de BRCA1 aumentó significativamente la sensibilidad a agentes genotóxicos. Estos Resultados muestran por primera vez que la función supresora de tumores en el cáncer de próstata de BRCA1 podría

deberse en parte, a la modulación de la apoptosis mediada por GADD153. El entendimiento de este mecanismo facilitará el diseño y desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas contra el cáncer de próstata.

0387 (93) BÚSQUEDA DE NUEVOS FOTOSENSIBILIZANTES Y PRINCIPIOS ACTIVOS A PARTIR DE PLANTAS REGIONALES PARA SU USO EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER. L Mamone ¹, G Divenosa ¹, L Rodriguez ¹, A Battle ¹, A Casas ¹

¹CIPYP <leandro_mamone@hotmail.com>

La luz puede ser empleada para el tratamiento de tumores superficiales o de acceso por vía endoscópica por medio de la Terapia Fotodinámica (TFD), combinación de fotosensibilizantes con luz visible. Algunos compuestos encontrados en las plantas han sido usados como fotosensibilizantes en la TFD. El objetivo de este trabajo es investigar una colección de extractos de plantas autóctonas para buscar nuevos fotosensibilizantes de uso en el tratamiento del cáncer, y paralelamente evaluar las propiedades curativas *per se* de estos extractos. Se estudiaron extractos metanólicos y acuosos de 18 especies vegetales autóctonas. Se encontró que las especies *Combretum fruticosum* y *Scutia buxifolia* (hoja) presentaron propiedades fotoactivas. Luego de 24 h de exposición de la línea celular tumoral murina LM2 al extracto metanólico crudo de *Combretum* (10 µg/ml) y *Scutia* (50 µg/ml), la aplicación de una dosis lumínica de 0.19 J/cm² y 0.073 J/cm² respectivamente indujo un 50% de muerte celular, determinada por el ensayo de MTT. Los extractos metanólico crudo de flor de *lochroma australis* y acuoso de hoja de *Solanum verbacifolium* resultaron citotóxicos *per se*, induciendo en células LM2, un 50% de muerte luego de 24 de exposición a 10 µg/ml de *lochroma* y de 1 µg/ml de *Solanum*. La línea tumoral mamaria humana HB4a-Ras también resultó afectada por el tratamiento con *lochroma* y *Solanum*, donde una dosis de 50 µg/ml indujo un 50% de muerte celular. Asimismo, una concentración de 50 µg/ml de *Combretum fruticosum* y *Scutia buxifolia* indujeron un 50% de muerte celular al ser irradiadas con una dosis lumínica de 0.034 y 0.058 J/cm² respectivamente. La composición de estos extractos está siendo analizada actualmente.

ONCOLOGIA 05

0388 (6) ACTIVACIÓN ANORMAL DE LA VÍA WNT/BETA-CATENINA EN LA PRENEOPLASIA HEPÁTICA DE RATA. J P Parody ¹, M d L Alvarez ¹, A Quiroga ¹, M P Ceballos ¹, D Francés ¹, G Pisani ², C Carnovale ¹, M C Carrillo ^{1 2}

¹Instituto de Fisiología Experimental (Ifise); ²area De Morfología, Facultad De Ciencias Bioquímicas Y Farmacéu^ocas (UNR) <parody@ifise.gov.ar>

La vía de señalización Wnt/b-catenina se activa en varios tipos de cáncer humano. La característica de esta activación anormal es la estabilización de β -catenina y su migración al núcleo, donde promueve la transcripción de genes involucrados en el crecimiento y la proliferación celular. El conocimiento del estado de la vía en una etapa temprana de la neoplasia puede proveer datos para comprender mejor el proceso carcinogénico y encontrar nuevos blancos para el diagnóstico temprano y el tratamiento terapéutico. La mayoría de los estudios realizados en esta vía se efectuaron en hepatocarcinomas humanos o en modelos animales con un grado avanzado de esta enfermedad. Por esto, decidimos estudiar el estado de la vía en un proceso temprano de la carcinogénesis hepática. Utilizamos animales controles (C) y con preneoplasia hepática (IP). Mediante inmunofluorescencia encontramos localización citosólica y nuclear de b-catenina en hígados IP; los hígados C mostraron localización en membrana. Por immunoblotting observamos que los niveles protéicos de b-catenina total fueron los mismos para los dos grupos de animales, pero los niveles de p-Ser33- b-catenina fueron menores en IP. También vimos un descenso en IP de los niveles de APC, la

cual forma parte del complejo que fosforila a β -catenina. Por RT-PCR analizamos la expresión de genes blancos de la vía. En IP encontramos sobreexpresión de mRNAs que codifican Ciclina-D1, Frizzled-7 (receptor de Wnt) y matrilisina (MMP7). No se vio sobreexpresión de c-Myc a nivel del mRNA. Por RT-PCR descartamos la existencia de mutaciones de delección en el gen *ctnrb1* que codifica β -catenina, que sí están presentes en hepatocarcinomas humanos. Estos datos sugieren que la vía Wnt/ β -catenina está activada en nuestro modelo de preneoplasia. La sobreexpresión de Frizzled-7 y de MMP7 así como el descenso de los niveles de APC estarían definiendo un fenotipo canceroso y probablemente metastásico en etapas muy tempranas del desarrollo neoplásico.

0389 (43) CARACTERIZACIÓN CITOGÉNICA DE CARCINOMA HEPATOCELULAR NO ASOCIADO A HEPATITIS CRÓNICA. C Castronuovo ¹, A Lorenti ¹, S Acevedo ², V Ardiles ³, E De Santibaños ³, L Parada ⁴

¹Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires ²Academia Nacional de Medicina; ³Servicio de Cirugía General, Hospital Italiano de Buenos Aires; ⁴Centro de Investigación Cooperativa Biogune-Cibereh, España <cnthia.castronuovo@hospitalitaliano.org.ar>

El carcinoma hepatocelular (HCC) es el tumor primario de hígado más frecuente en adultos. Está asociado a cirrosis hepática, enfermedades metabólicas, pero fundamentalmente a hepatitis crónica por HBV o HCV. Su patogénesis es poco conocida, aunque se sabe que los cambios genéticos son relevantes en el desarrollo y progresión del HCC. Hasta el presente, no más de treinta HCCs se han analizado citogenéticamente, la mayoría provenientes de zonas de alta incidencia de HBV. Presentamos el primer caso de HCC sometido a análisis cromosómico de Argentina. El paciente, varón de 70 años, HBV-HCV negativo, con historia de enfermedad alcohólica y sin evidencia de cirrosis, fue intervenido quirúrgicamente por un tumor hepático. La biopsia fue sometida a examen histopatológico y análisis cromosómico. Para esto, la muestra fue disgregada mecánica y enzimáticamente y la suspensión celular se cultivó en medio DMEM/F12 suplementado con SFB. Las preparaciones cromosómicas se hicieron por procedimientos estándares. Las metafases se tiñeron con Giemsa y se analizaron microscópicamente. El diagnóstico fue HCC bien diferenciado, sin invasión vascular. El examen citológico demostró que las células expresan alfa1Anti-Tripsina, aSMA y AFP, mientras que el análisis cromosómico de tres cultivos celulares de diferentes pasajes reveló la presencia de múltiples aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales. Se detectaron pérdidas de los cromosomas 4, 12, 15, 16, 17, 20, 22 e Y, pero no se observaron ganancias clonales. La naturaleza de las aberraciones estructurales fue diversa y difieren de las observadas en pacientes de otras regiones geográficas. Los cromosomas 5 y 6 fueron frecuentemente afectados por aberraciones tales como del(5q), add(5p), t(12;5) y del(6q). Nuestros Resultados, aunque incompletos, sugieren que el HCC no asociado a H(B-C)V podría presentar un perfil genómico distinto de aquellos analizados hasta el presente.

0390 (282) INTERACCIÓN ENTRE RECEPTORES DE FGF Y EL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN MODELOS DE CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL. J.P. Cerliani ¹, C Lamb ¹, C Lanari ¹

¹BYME <cerliani@dna.uba.ar>

Carcinomas mamarios murinos hormono-dependientes (HD) por presión selectiva dan origen a variantes hormono-independientes (HI), sin embargo, ambos tumores expresan altos niveles de receptores de estrógenos (RE) y progesterona (RP). Hemos sugerido que fibroblastos estromales de tumores HI producen mayor cantidad de FGF-2 que el estroma del tumor HD, participando así en el crecimiento HI activando receptores de progesterona (RP) del parénquima tumoral. El objetivo de este trabajo fue eva-

luar la posible interacción directa entre el RP y FGFR2 en nuestro modelo y en la línea celular humana de cáncer de mama T47D. Imágenes de confocal demuestran una íntima interacción nuclear entre estos dos receptores cuando las células son tratadas con FGF2 50 ng/ml o MPA 10⁻⁸M, (p<0.05), bajo las mismas condiciones no observamos interacción alguna del RP y FGFR1, 3, o 4. Además en experimentos tiempo dependientes (5, 10, 30 min., y 1 hora) observamos una fosforilación diferencial en la serina 190 del RP (p<0.05) con los mismos tratamientos conjuntamente con una sobre-activación de las vías de Akt y/o Erk y sobre-expresión de c-Myc (p<0.05) en el modelo de ratón o la línea tumoral humana T-47 D. Estos Resultados demuestran por primera vez una íntima interacción entre el RP y el FGFR2 en núcleos de células humanas y de ratón de cáncer de mama, lo cual refuerza nuestra hipótesis en la cual el FGF2 liberado por el estroma activa al FGFR2 en las células epiteliales impulsando la activación del RP como un mecanismo hormono-independiente, lo que hace al FGFR 2 un posible candidato para nuevas terapias conjuntas en el cáncer de mama.

0391 (290) ESTUDIO DE LA TRANSLOCACIÓN ENTRE LOS CROMOSOMAS 4 Y 7 DE UN CARCINOMA MAMARIO MURINO HORMONO-INDEPENDIENTE (HI). V T Fabris ¹, P Rojas ¹, S Merani ², C Lanari ¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²Facultad de Medicina UBA <vfabris@dna.uba.ar>

El estudio citogenético de los carcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) reveló la presencia de translocaciones que involucran ciertos cromosomas con mayor frecuencia que otros. Se observó una translocación entre los cromosomas 4 y 7, T(4;7), la cual está presente en dos tumores HI pertenecientes a dos familias tumorales diferentes (C7-2-HI y C4-HI). El objetivo del trabajo es identificar el sitio de ruptura de la translocación T(4;7). Para ello se utilizó la técnica de Hibridación in situ Fluorescente (FISH), usando como sondas secuencias de ADN que hibridizan con diferentes regiones de los cromosomas 4 y 7. Se analizaron las metafases obtenidas de una línea celular derivada del tumor C7-2-HI con la translocación T(4;7). Resultados previos de bandeado G mostraron que la ruptura estaría localizada en la región próxima al centrómero del cromosoma 7 y en la región terminal del cromosoma 4. Las sondas para la región 7A2-B1 hibridaron con el cromosoma 7 normal y con la translocación. La sonda para la banda 7A1 marcó el cromosoma 7 normal pero no se obtuvo hibridación en la translocación, indicando que dicha región no estaría presente en la misma. La sonda para la banda 4E1 hibridó con el cromosoma 4 normal y con la translocación. Estos Resultados indican que el sitio de ruptura de T(4;7) en el tumor C7-2-HI estaría localizado entre las bandas 7A1-A2, y en la banda 4E2. Podemos concluir que hemos logrado delimitar con mayor precisión el sitio de ruptura de la translocación por medio de FISH, utilizando secuencias específicas cercanas a la ruptura. Esta información será de utilidad en la búsqueda de posibles genes afectados por la translocación que podrían estar relacionados con el desarrollo de los tumores inducidos por MPA.

0392 (479) EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y ANGIOSTÁTICO DE LA DESMOPRESINA Y UN NUEVO ANÁLOGO DE VASOPRESINA SOBRE CÉLULAS CANCEROSAS MAMARIAS. G V Ripoll ¹, J Garona ¹, N Iannucci ², O Cascone ², D E Gomez ¹, D F Alonso ¹

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes; ²Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires <gripoll@unq.edu.ar>

La desmopresina (DDAVP) es un análogo sintético de vasopresina con probada acción antitumoral en modelos murinos de cáncer mamario y en ensayos veterinarios en caninos. DDAVP actúa como un agonista del receptor V2 de vasopresina del endotelio vascular, elevando los niveles plasmáticos del factor von

Willebrand, factor VIII de la coagulación y activadores del plasminógeno. Se conoce que el clivaje proteolítico extensivo sobre la molécula de plasminógeno produce angiostatina, un conocido inhibidor angiogénico. La presencia del receptor V2 se ha reportado también en algunos tipos tumorales, incluyendo cáncer mamario. En este trabajo, investigamos la acción antitumoral y angiostática de DDAVP y del nuevo análogo sintético 1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina (análogo VQ) sobre carcinomas mamarios. Cortes histológicos de tumores mamarios F3II implantados en ratones singénicos Balb/c que fueron tratados por vía endovenosa con DDAVP (0.9 ig/kg/semana), mostraron una disminución marcada de la angiogénesis peri e intratumoral. La incubación con DDAVP (100 nM) en presencia de plasminógeno de monocapas semiconfluentes de células de carcinoma mamario humano MCF7, una línea celular que expresa el receptor V2, favoreció la producción de angiostatina. El nuevo análogo VQ produjo un efecto aún mayor, quintuplicando los niveles basales de angiostatina según la valoración por Western blot seguida de densitometría. Asimismo, este análogo fue capaz de reducir la formación de túbulos vasculares de células endoteliales humanas HMVEC cultivadas sobre Matrigel ($p < 0.001$). Por otro lado, el análogo VQ (1 μ M) mostró actividad antiproliferativa directa sobre células MCF7 en crecimiento exponencial, estudiada mediante el ensayo de MTT ($p < 0.001$). Los Resultados obtenidos sugieren que estos péptidos agonistas del receptor V2 de vasopresina podrían desplegar una actividad antitumoral sobre carcinomas mamarios asociada a mecanismos angiostáticos.

0393 (525) MECANISMOS MOLECULARES INDUCIDOS POR BACILO CALMETTE GUERIN (BCG) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE VEJIGA MURINAS MB49. C Lodillinsky ¹, E Sandes ¹, A Casabe ¹, A M Eijan ¹

¹Instituto de Oncología Angel H Roffo
<catalinalodi@yahoo.com.ar>

La administración intravesical de BCG es la terapia de elección para la profilaxis de recidivas y progresión del cáncer de vejiga (CaV) *in situ*, superficial de alto grado o recurrente. Es de nuestro interés estudiar la acción directa de BCG sobre la célula tumoral. El óxido nítrico (NO) es producido principalmente por la NO sintasa inducible (iNOS), cuya expresión es considerada un factor de mal pronóstico en pacientes con CaV. Anteriormente observamos que BCG inhibe el crecimiento de la línea MB49 y aumenta en la producción de NO. El tratamiento combinado con BCG y PGJ-2, ligando natural de PPAR γ , potencia la muerte celular inducida por BCG, al mismo tiempo que inhibe la producción de NO a través de una vía independiente de PPAR γ . Nuestro objetivo es evaluar las vías intracelulares de muerte que induce BCG en la línea celular MB49. Las células se tratan con BCG (2mg/ml) y con o sin PGJ-2 (1 μ M). Se evaluó por western blot a través del tiempo la activación de proteínas pro-apoptóticas, Bid y pro-caspasa 9 y la modulación de la vía del NF-kB. El análisis de la vía apoptótica inducida por BCG muestra activación de Bid y caspasa 9 a las 3 h post tratamiento. Por otro lado BCG induce la degradación del inhibidor de NF-kB, el I κ B- α . Esto se hace evidente a los 45 min de tratamiento para luego reaparecer a las 3 h. En el tratamiento combinado con BCG y PGJ-2 se observa una recuperación del inhibidor antes que en las células tratadas con BCG sola, entre 1 y 2 h aproximadamente. BCG induce apoptosis activando proteínas de la vía intrínseca. También induce en un primer momento señales de sobrevida activando al factor de transcripción NF-kB. Este resultado nos sugiere que BCG a través de la vía de NF-kB aumenta la producción de NO posiblemente activando la transcripción de iNOS. PGJ-2 inhibiría la actividad transcripcional de NF-kB evitando la activación de sus genes blanco, como iNOS y consecuentemente la disminución de la producción de NO.

0394 (562) EFECTOS DEL FLAVONOIDE SILIMARINA SOLO O COMBINADO CON BCG EN LÍNEAS DE CÁNCER DE VE-

JIGA HUMANA T24 Y MURINA MB49. E O Sandes ¹, C Lodillinsky ¹, Y V Langle ¹, A R Casabé ¹, A M Eijan ¹

¹ Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Universidad de Buenos Aires <eosandes@yahoo.com.ar>

Introducción: La BCG intravesical es utilizada en el tratamiento del cáncer de vejiga (CaV) superficial de alto grado, el carcinoma *in situ* y en CaV recidivantes. Existe un porcentaje de pacientes que son resistentes a BCG o sufren efectos adversos de variada magnitud. Encontrar moléculas que potencien la BCG sería de gran utilidad clínica. Los flavonoides son productos naturales, poco tóxicos, uno de ellos es la silimarina (Sm), que actúan sobre distintas vías de señalización intracelular (ej: NF-kB). **Objetivo:** estudiar el efecto de la Sm sola o combinada con BCG sobre células de CaV. **Metodología:** se siembran 3000 cel/hoyo T24 y MB49 en placas de 96 hoyos, reciben tratamiento con o sin BCG +/- Sm 40 μ M y 80 μ M durante 96 h, la proliferación se evaluó con MTS. La muerte celular se evaluó con tinción con NA/BrE y analizamos la expresión de I κ B α por western blot. Test estadístico ANOVA/Tukey. **Resultados:** Sm 40 μ M potencia la actividad inhibitoria de BCG (BCG 26 %, Sm 40 9 %, BCG + Sm 40 55 % $p < 0.001$) y Sm 80 inhibe 85 % independientemente de la BCG. La línea MB49 presenta una respuesta similar pero menos marcada. La tinción celular con NA/BrE mostró un incremento en células necróticas y apoptóticas a las 24 h de tratamiento con Sm 80 +/- BCG en ambas líneas. BCG activa la degradación de I κ B α y Sm 80 bloquea esta degradación en ambas líneas. **Conclusión:** La Sm 80 μ M tiene un efecto citotóxico independiente de BCG en ambas líneas celulares. La Sm 40 μ M potencia el efecto de BCG. La inhibición de la vía NF-kB promotora de señales de sobrevida celular podría ser el sustrato de la actividad de la Sm.

0395 (645) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE RECEPTORES Y PROTEASAS INVOLUCRADAS EN LA MIGRACIÓN E INVASIÓN CELULAR: LRP-1 (LOW-DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN-1), UPAR Y EMMPRIN EN LA ENFERMEDAD PROSTÁTICA. M Gilardoni ¹, M Dominguez ², J P Sarría ², G Minuzzi ², L Racca ², T Dellavedova ², M Oviedo ³, C G Pellizas ¹, J Sarría ⁴, A C Donadio ¹

¹FAC CS QCAS, UNIV. NACIONAL DE CÓRDOBA; ²Fundación Urológica Córdoba para el desarrollo y la investigación médica (FUCDIM); ³Catedra de Histología, Fac. de Medicina Universidad Nacional de Córdoba; ⁴Instituto Oncológico Universitario, Hosp. Nacional de Clínicas, UNC <mgilard@fcq.unc.edu.ar>

El cáncer de próstata es una de las principales causas de muerte en el hombre. En la enfermedad prostática se observan cambios bioquímicos, genéticos y moleculares, que indican progresión de la patología. Las enzimas proteolíticas son importantes en la fisiopatología tumoral por su rol en la degradación de la matriz extracelular y membrana basal. El resultado neto de la acción de las enzimas proteolíticas dependerá del balance de sus reguladores naturales, producidos por las células tumorales o por las células estromales como defensa ante la progresión tumoral. **Objetivo:** Analizar la expresión del LRP-1, uPAR (receptor de uPA), EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer) y la actividad enzimática de metaloproteinasas de matriz, MMP 2 y 9 en biopsias prostáticas humanas con diferentes estados patológicos. **Materiales y Metodologías.** Muestras provenientes de RTU de Próstatas se agruparon de acuerdo a los estudios histopatológicos: hiperplasia nodular glandular (HNG)(n=20); HNG+moderada inflamación estromal (IE)(n=8); HNG+intensa IE (n=7); premalignas, PINs, (n=3) y tumores (n=16). Se realizaron western blots para uPAR y EMMPRIN, zimografías para MMP 2 y 9 e inmunohistoquímica para LRP-1. **Resultados:** LRP-1 se expresa en las células epiteliales de las lesiones benignas (HNG 8/8; HNG+Inflamación10/10) y premalignas (PINs, 3/3) con un grado de marcación +1, +2, +3 respectivamente; en tumores (10/10) y próstata normal (7/7) el grado de marcación es 0. La expresi-

sión de uPAR y EMMPRIN y la actividad de MMP9 aumenta significativamente en tumores con respecto a las lesiones benignas y procesos inflamatorios. **Conclusiones:** El receptor LRP-1 regula la actividad proteolítica extracelular al depurar a MMPs y uPA mediante la internalización de uPA/uPAR o MMPs/LRP-1. La expresión diferencial en tumores de uPAR/LRP-1 y/o MMPs/LRP-1 explicaría el comportamiento invasivo de los tumores y permitiría establecer su uso como factor predictivo en el cáncer de próstata.

ONCOLOGIA P1

0396 (59) TERAPIA FOTODINÁMICA BASADA EN ALA COMO TRATAMIENTO ANTICANCERIGENO EN CÉLULAS LEUCÉMICAS. B Diez^{1,2}, M García³, R Cordo Russo³, M J Teijo^{1,2}, S Hajos³, A Battle¹, H Fukuda^{1,2}

¹Centro de Investigaciones Sobre Porfirias y Porfirinas (CIPYP), Conicet, Hospital de Clínicas, UBA; ²Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA; ³Cátedra de Inmunología, IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA Y CONICET <bdiez@qb.fcen.uba.ar>

La terapia fotodinámica (TFD) basada en ácido 5-aminolevulínico (ALA) es útil para erradicar células malignas mediante la fotoactivación de porfirinas endógenas sintetizadas a partir del precursor ALA. En este trabajo utilizamos células de leucemia murina: LBR- (sensible a drogas antineoplásicas), LBR-D160 (resistente a doxorubicina) y LBR-V160 (resistente a vincristina). Evaluamos la localización intracelular de la protoporfirina (PpIX) sintetizada a partir de ALA mediante microscopía confocal, utilizando marcadores mitocondriales y lisosomales (Mito Tracker Green y Lyso Tracker Green). En las tres líneas celulares estudiadas se observó un patrón similar de localización de PpIX. A tiempos cortos de incubación con ALA 0.1 mM (2-3 h) la PpIX se localiza principalmente en mitocondrias y también en lisosomas, a las 20 h de incubación el patrón de fluorescencia se vuelve más difuso, indicando una redistribución en el citoplasma celular. La localización de PpIX sugiere que la apoptosis podría constituir un mecanismo de muerte asociado a la TFD. Teniendo esto en cuenta, se evaluó la inducción de apoptosis (naranja de acridina-bromuro de etidio) irradiando a distintos tiempos luego de incubar con ALA. Observamos que la apoptosis aumenta en función del tiempo de irradiación (% de apoptosis 1 h post-TFD: LBR- a 10 min: 15,94 ± 2,1; 20 min: 24,97 ± 1,9). En la línea sensible LBR- la inducción de apoptosis fue más lenta que en las líneas resistentes (% apoptosis 2 h post-TFD: LBR-: 43,81 ± 1,3; LBR-D160: 63,86 ± 0,6; LBR-V160: 70,57 ± 1,6; % apoptosis 3 h post-TFD: LBR-: 73,78 ± 1,8; LBR-D160: 73,87 ± 2,3; LBR-V160: 69,99 ± 2,4). La línea LBR-V160 fue la de mayor síntesis de PpIX y a 2 h post-TFD presentó el mayor % de apoptosis, por lo que sería la más sensible al tratamiento. Los Resultados obtenidos sugieren que la TFD constituye una alternativa eficaz para la erradicación de células malignas remanentes en el tratamiento de leucemias resistentes a quimioterapia.

0397 (99) LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA), EL MARCADOR CLÍNICO MOLECULAR MAS IMPORTANTE DEL CÁNCER DE PRÓSTATA, ES MEDIADA POR EL SUPRESOR TUMORAL BRCA1. F Zalazar¹, P De Luca², J Cotignola¹, C Moiola¹, G Gueron¹, E Vazquez¹, A De Siervi¹

¹Departamento Química Biológica, FCEyN, UBA, CONICET; ²Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA, CONICET <fzalazar@qb.fcen.uba.ar>

El Antígeno Prostático Específico (PSA) es una proteasa sintetizada por las células epiteliales normales y malignas de la próstata humana. Cuando hay un tumor en este órgano, el PSA es liberado al suero en altos niveles, los cuales se utilizan para diagnosticar y monitorear el cáncer de próstata. Estas asociaciones

permitieron considerar al PSA como el más importante marcador clínico molecular de esta enfermedad. Nuestra hipótesis es que la identificación de las vías de señalización que regulan la expresión y/o función de PSA esclarecerá el mecanismo molecular de la progresión hacia el cáncer de próstata independiente de andrógenos. Para ello, nos propusimos identificar nuevos co-reguladores del receptor de andrógenos que regulen a PSA. Utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) encontramos que un conocido co-regulador del receptor de andrógenos, BRCA1, se une al promotor de PSA. El gen de la susceptibilidad del cáncer de mama (BRCA1) es un gen supresor de tumores y mutaciones en este gen confieren un riesgo alto para varios tipos de cánceres que responden a hormonas, incluyendo el cáncer de próstata. En este trabajo encontramos que la inducción por andrógenos de la transcripción de PSA fue significativamente mayor en la línea celular de cáncer de próstata cuando la expresión endógena de BRCA1 se silenció con el ARN de interferencia (LNCaP shARN BRCA1), en comparación con la línea celular estable control (LNCaP shARN control). En resumen, estos Resultados confieren por primera vez a BRCA1 un rol crucial en el cáncer de próstata, a través de la modulación del marcador más específico encontrado hasta la fecha, el PSA. El desafío de las investigaciones futuras es el entendimiento de este mecanismo de regulación y sus consecuencias fisiológicas que facilitarían el tratamiento y/o prevención del cáncer de próstata avanzado.

0398 (142) EXPRESIÓN CITOPASMÁTICA Y NUCLEAR DE HEMOXIGENASA-1 EN CARCINOMAS CELULARES ESCAMOSOS DE CABEZA Y CUELLO. N A Gandini¹, C A Lang¹, M E Fermento¹, H V Maturi², V Patel³, S J Gutkind³, M M Facchinetti¹, A C Curino¹

¹Instituto de Investigaciones Bioquímica Bahía Blanca INIBIBB-CONICET Lab de Biología Básica del Cáncer; ²Laboratorio de Anatomohistología Universidad Nacional del Sur Bahía Blanca Argentina; ³Oral And Pharyngeal Cancer Branch National Institute Dental and Craniofacial Research National Institutes of Health (NIH) Bethesda MD USA <ngandini@uns.edu.ar>

La hemoxigenasa-1 (HO-1) es una enzima que cataliza el paso limitante de la degradación del grupo hemo. Estudios recientes sugieren que esta proteína puede tener un rol en el cáncer. Sin embargo, es escasa la evidencia sobre la expresión y posible acción de la enzima en carcinomas celulares escamosos (SCC). El objetivo de este estudio fue investigar la expresión de la HO-1 en SCC humanos y comparar los Resultados con aquellos obtenidos en un modelo murino. Se estudiaron por inmunohistoquímica (IHC) 36 biopsias humanas observándose expresión positiva (más del 10% de células inmunomarcadas, CI) en el 43%. Dentro de estas últimas, el 57% presentó baja (entre 10 y 50% de CI) y 43% alta expresión (más del 50% de CI). La expresión estaba restringida mayormente a las células neoplásicas y el 53% de los tumores presentó expresión nuclear (más del 10% de células con núcleos inmunomarcados). También se encontró asociación significativa ($P=0,035$; test Mann-Whitney y de Wilcoxon) entre el grado de diferenciación y la frecuencia de expresión nuclear (poco diferenciado: 69%; moderadamente diferenciado 50% y bien diferenciado 0% de los tumores positivos). Para aumentar el número de biopsias investigadas se estudió un microarreglo de tejido (139 muestras) obteniéndose un porcentaje de expresión similar del 46% de tumores positivos. La detección de HO-1 por IHC se confirmó por detección de ARNm mediante microdissección con captura láser y RT-PCR. Se comenzó a estudiar el modelo murino no detectándose expresión de HO-1 en tejido normal a diferencia de los papilomas de bajo riesgo, alto riesgo y SCC propiamente dicho, que mostraron expresión positiva. En SCC se detectó expresión nuclear en el 25% de las CI. Los porcentajes de expresión de HO-1, su localización nuclear y la asociación de la misma con los estados mas avanzados de estos tumores, tanto en las neoplasias humanas como murinas, corroboran la hipótesis que propone un rol significativo para esta enzima en el cáncer.

0399 (208) EL TRATAMIENTO CON LA FORMA TRANS DEL ÁCIDO RETINOICO (ATRA) MODULA LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS ALFA (A) Y DELTA (D) DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN LÍNEAS MAMARIAS MURINAS Y HUMANAS NORMALES Y TUMORALES. L B Todaro ¹, M L Polo ¹, E D Bal de Kier Joffé ¹, A J Urtreger ¹

¹Area Investigacion Instituto de Oncologia <ltodaro@fmed.uba.ar>

Los retinoides ejercen algunos de sus efectos sobre la diferenciación celular y la reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con isoformas de PKC, disminuyendo principalmente PKCa (asociada a proliferación) y aumentando PKCd (asociada a diferenciación). Para determinar de qué manera el crosstalk entre ambas vías es capaz de regular la progresión maligna de células mamarias, nos propusimos analizar en esta primera etapa, si el tratamiento con ATRA modula la expresión de isoformas de PKC como así también si la activación de las PKC por PMA modifica la expresión de los receptores retinoides. Utilizamos las líneas murinas LM3 (tumoral) y NMuMG (normal) y la línea tumoral humana MDA-MB231. Por RT-PCR determinamos que el tratamiento con PMA indujo una marcada disminución en la expresión de todos los receptores retinoides RAR en los modelos murinos (65±15%), mientras que en las células humanas se observó el efecto inverso (aumento: 80±25%). Mediante Western blot y densitometría determinamos que el tratamiento con ATRA (1µM, 6h) de las células LM3, indujo una reducción en los niveles de expresión de PKCa (40±14%) y un aumento en PKCd (60±17%), así como también un incremento de 4 veces en los niveles de pAkt (en todos los casos p<0,05 n=3). En éstas, el tratamiento con ATRA (2-6 días) condujo al arresto celular con un incremento en el tamaño, sin evidencias de apoptosis. Las células NMuMG, respondieron al ATRA aumentando la expresión de ambas isoformas de PKC (-3 veces, p<0,05 n=3) y los niveles de pAkt (~2 veces, p<0,05 n=3). Por otro lado en la línea MDA-MB231, el ATRA redujo la expresión de PKCa y PKCd (40±5% y 48±7% resp p<0,05 n=3) sin alterar los niveles de pAkt. Estos Resultados indican que la activación la PKC es capaz de modular la expresión de receptores retinoides involucrados en diferenciación/crecimiento, como así también que el tratamiento con ATRA modula los niveles de distintas PKCs, en forma diferencial dependiendo del tipo y especie celular.

0400 (229) ESPECIFICIDAD EN LA INHIBICIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN INDUCIDA POR PROTEÍNAS MAGE-A. J E Laiseca ¹, L Y Peche ², A G Erlejan ¹, C Schneider ², M D Galigniana ¹, M Monte ¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Dpto Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; ²Laboratorio Nazionale CIB, Trieste, Italia <mmonite@qb.fcen.uba.ar>

Las proteínas de la subfamilia Mage-A (Melanoma Antigen Genes) poseen expresión específica tumoral y una alta homología de secuencia. La homología entre proteínas Mage-A varía entre el 60 y el 95% aproximadamente. Esta característica hace que se las consideren proteínas con funciones redundantes. Nosotros hemos demostrado que Mage-A2 es un potente inhibidor del factor de transcripción y supresor tumoral, p53. Observamos que Mage-A2 se asocia a p53 causando la desacetilación del factor de transcripción y de las histonas que circundan su sitio de unión al ADN. Este efecto es catalizado la histona deacetilasa HDAC3 asociada a Mage-A2. Sin embargo, no todos los miembros pertenecientes a Mage-A inhiben p53 con la misma eficiencia. Esta inesperada observación nos llevó a profundizar el estudio sobre la especificidad estas proteínas en la inhibición de la transcripción. Mediante estudios de actividad transcripcional utilizando genes reporteros específicos y el análisis de interacción proteica por inmunoprecipitación, realizamos un estudio sobre el efecto de las proteínas Mage-A más expresadas en tumores (Mage-A1, Mage-A2, Mage-A4 y Mage-A6), en la actividad transcripcional de

factores de transcripción de la familia de p53 (p53, p63 y p73) y en los receptores nucleares GR (receptor de glucocorticoides) y MR (receptor de mineralo-corticoides). Nuestros Resultados indican que Mage-A2 se une y es el inhibidor más potente de p53 y p73, mientras no se observa efecto de represión ni de asociación sobre p63. En el caso de los receptores nucleares, Mage-A6 fue quien mostró la mayor actividad represora sobre la actividad transcripcional de GR y MR. Estos datos indican que a pesar de la alta homología entre los miembros Mage-A, existe una evidente especificidad funcional. Esto sugiere la importancia en la identificación de los genes Mage-A que se expresan en los tumores ya que podrían indicar comportamientos asociados a la expresión de los genes Mage-A detectados.

0401 (346) AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DE CARCINOMA CELULAR ESCAMOSO RESISTENTES A TERAPIA FOTODINÁMICA. L N Milla ¹, E Rodríguez ¹, F Saenz Rodríguez ², Á Juarranz ², V Rivarola ¹

¹Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC; ²Facultad de Ciencias, UAM <lmilla@exa.unrc.edu.ar>

El cáncer cutáneo no melanoma (CCNM) es el tipo de cáncer de piel más frecuente. La terapia fotodinámica (TFD), usando el fotosensibilizador ALA y sus derivados, es empleada para tratar el CCNM. Sin embargo, el problema principal de la TFD y de otras terapias anticancerígenas es la aparición de poblaciones celulares resistentes. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos de resistencia a la TFD en carcinoma de células escamosas (SCC-13). Los objetivos específicos fueron: 1) Obtener poblaciones resistentes (R) a tratamientos repetidos de TFD con Me-ALA en cultivos de SCC-13. 2) Caracterizar morfológica, molecular y funcionalmente las poblaciones R. La población original (parental) se sometió a ciclos de tratamiento combinado de Me-ALA y luz roja, habiéndose aislado 5 subpoblaciones R (generaciones). Empleando Western Blot se determinaron los cambios en los niveles de expresión de proteínas de adhesión celular (E-cadherina, b-catenina, vinculina, p-FAK y b-integrina), proteínas antiapoptóticas (survivina) y proteínas de resistencia a múltiples drogas (Pgp) en la población celular parental y en las generaciones R. Mediante inmuno-fluorescencia indirecta se analizaron los cambios en la expresión y localización subcelular de esas proteínas. Se observó que los niveles de expresión de vinculina disminuyeron en la 1ra y 2da generación de células R, con respecto a la generación parental, y aumentaron en las siguientes generaciones, superando los niveles de las células parentales. No se encontraron diferencias de expresión de las demás proteínas estudiadas. Sin embargo, por inmunofluorescencia indirecta se observaron cambios en la distribución de b-catenina y survivina y en la expresión de E-cadherina y Pgp con relación a las generaciones de células R. Los Resultados permiten concluir que las células SCC-13 podrían involucrar alteraciones en la expresión y/o la distribución de las proteínas estudiadas, como una estrategia de resistencia a la TFD.

0402 (349) CARACTERIZACIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE NEOPLASIAS DE MAMA INDUCIDAS POR EL VIRUS POLIOMA MURINO. S Simula ¹, A Aprile ¹, N Sanjuan ¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA <nasanjuan@gmail.com>

El virus Polioma induce neoplasias de mama en ratones tanto hembras como machos. La caracterización histológica preliminar y su prevalencia fue reportada por nosotros en una comunicación anterior. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de receptores de estrógeno y de progesterona en neoplasias de mama inducidas por Polioma en ratonas y caracterizar su origen histológico. Se inocularon ratonas neonatas C3H BiDa subcutáneamente con 10⁵ ufp de Polioma A2 y los animales fueron sacrificados a los 70 días post-infección, cuando ya habían sido detectados tumores mamarios clínicamente. Las neoplasias fue-

ron procesadas para su inclusión en parafina y se tomaron cortes seriados de cada tumor. Se evaluaron en total 20 tumores. La presencia de receptores de estrógenos y de progesterona, así como la expresión de E-cadherina y de p-63 se detectó por inmunoperoxidasa. Histológicamente todos fueron carcinomas intraductales, con áreas papilares, otras cribradas y otras necróticas. Se detectó la expresión de receptores de estrógenos en 11/20 tumores y de progesterona en 12/20 tumores. En ambos casos la marcación se observó sólo en sectores del tumor y entre el 5 y el 60% de las células neoplásicas presentes en 10 campos a gran aumento por preparado. Fue frecuente la superposición de la marcación de ambos receptores en las mismas células. En 15/20 tumores la marcación de E-cadherina fue positiva y el antígeno p-63 fue solamente detectado en células fusiformes que rodeaban a nidos de células neoplásicas. La expresión de E-cadherina confirma el origen ductal de estos tumores y descarta su naturaleza lobulillar. El patrón de expresión de p-63 sugiere que las células mioepiteliales sólo rodean a las neoplasias pero no forman parte de ellas. La heterogénea expresión de receptores de estrógenos y progesterona indicaría que una misma neoplasia presenta poblaciones celulares en distintos grados de diferenciación, hecho inusual para un tumor inducido por un virus oncogénico.

0403 (432) TUMORIGENICIDAD DE CÉLULAS CLONOGÉNICAS (STEM) DE MELANOMA HUMANO. M Aris¹, M M Barrio², I Bravo³, E M Levy², M Bianchini², J M Arriaga², G Sycz², J Mordoh^{1,2}

¹Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires; ²Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA, Ciudad de Buenos Aires; ³HIGA Eva Perón, San Martín, Provincia de Buenos Aires <maris@leloir.org.ar>

El modelo de las células *stem* tumorales (CST) propone para explicar el cáncer un modelo jerárquico dentro del tumor en donde hay una población minoritaria, las células *stem* tumorales, con capacidad de autorrenovación y de generar células tumorales con diferente grado de diferenciación constituyendo la masa tumoral. Es de nuestro interés estudiar el modelo de las CST en melanoma. Como criterio de selección de CST elegimos la capacidad de crecimiento independiente de anclaje (*células clonogénicas*), obteniendo esta población a partir de líneas celulares de melanoma humano. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la formación de tumores por células clonogénicas de melanoma en ratones inmunodeficientes. Se estudió la formación de colonias de la línea Mel-XY1 mediante su cultivo en metilcelulosa 1,5%, observando una población minoritaria (10-20%) de células en la línea celular con capacidad de crecimiento independiente de sustrato. A su vez, estas células presentan una menor dependencia de suero. Las células clonogénicas se obtuvieron a partir de colonias con un diámetro de por lo menos 70 micrones, seleccionadas por filtración. Se inocularon ratones inmunodeficientes N:NIH (S)-*nu* para comparar formación y crecimiento de tumores a partir de células clonogénicas, células no clonogénicas y células totales de la línea de origen. Los tumores procedentes de células clonogénicas presentaron una fase de latencia más corta, constituidos por células monomórficas y con elevada densidad de vasos sanguíneos pequeños (neoangiogénesis). Se evaluó la expresión de los antígenos de diferenciación melanocítica Mart-1 y gp100 entre las distintas poblaciones estudiadas. Estos Resultados indican que las células clonogénicas poseen capacidad tumorigénica, pudiendo constituir células *stem* de melanoma, y que una caracterización más profunda de dichas células puede contribuir a identificar una población blanco para una terapia antitumoral efectiva.

0404 (456) EFECTOS DE LA LIPOFECCIÓN DEL GEN DEL INTERFERÓN-BETA SOBRE LA LÍNEA DE MELANOMA HUMANO M8. M S Villaverde¹, M L Gil Cardeza¹, G C Glikin¹, L M Finocchiaro¹

¹Unidad de Transferencia Genética, Hospital de Oncología Ángel H. Roffo <marcelavillaverde@hotmail.com>

La terapia genética utilizando el gen del interferón beta humano (hIFN β) complejado con liposomas catiónicos (lipofección), proporcionaría una estrategia terapéutica más efectiva y menos tóxica para el tratamiento del melanoma. En una línea humana establecida a partir de este tumor (M8) nos propusimos a) determinar la respuesta citotóxica al tratamiento con hIFN β (utilizando el reactivo MTS) b) comparar este efecto con el de la proteína interferón humano recombinante (rhIFN α y rhIFN β). c) determinar la ubicación intracelular del hIFN α expresado (inmunofluorescencia) y d) evaluar morfología resultante (hematoxilina y eosina) y mecanismo de apoptosis/necrosis en las células lipofectadas (naranja de acridina, NA/bromuro de etidio, BEt). Luego de 5 días de lipofección con el gen hIFN α solo el 40% (respecto al control) de las células cultivadas en monocapa permaneció viable. Si bien los cultivos tridimensionales (esferoides) tuvieron una respuesta citotóxica significativa, presentaron una leve resistencia comparados a las monocapas. Por otro lado la respuesta al tratamiento con las proteínas recombinantes no alcanzó los niveles de efectividad logrados por transferencia genética, aún en las más altas concentraciones evaluadas (10000 UI/ml). La inmunocitoquímica del hIFN β mostró una localización citoplasmática y nuclear difusa post-tratamiento con rhIFN β , mientras el hIFN β expresado post-lipofección presentó zonas puntuales bien definidas de localización intranuclear. Además, la lipofección del hIFN β produjo alteraciones en la morfología de las células (aumento de citoplasma y núcleo) acompañadas de eventos apoptóticos/necróticos que se hicieron visibles mediante la doble tinción NA/BET. En conjunto, estos Resultados muestran que la efectividad antitumoral de la transferencia del gen de hIFN β es 100% mayor ($p < 0,05$) a la de su propia proteína recombinante, probablemente por la presencia de mecanismos adicionales inherentes al proceso de lipofección y expresión.

0405 (492) RIESGO DE CÁNCER DE MAMA ASOCIADO A CONGÉNERES DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBS) EN TEJIDO ADIPOSO MAMARIO. A S Ridolfi^{1,2}, S Burlando², M Olivera¹, V Olmos¹, G Álvarez¹, G González², M E Rodríguez Girault¹, I Yohena¹, M I Sarchi³, E Villamil Lepori¹

¹Cátedra de Toxicología y Química Legal-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA; ²Instituto de Investigaciones Médicas Dr Alfredo Lanari; ³Cátedra de Matemáticas-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA <aridolfi@ffyb.uba.ar>

Los PCBs constituyen un grupo de 209 congéneres altamente persistentes y lipofílicos. Estos compuestos han generado preocupación en la población y en la comunidad científica por considerárselos potenciales cancerígenos. Algunos autores han reportado correlación entre congéneres específicos o grupos de congéneres de PCBs y cáncer de mama mientras que para otros no existe asociación. El objetivo de este trabajo es correlacionar los niveles hallados en tejido adiposo mamario de 17 congéneres de PCBs de un estudio caso-control sobre 88 mujeres con tumores de mama malignos (n= 57) y benignos (n=31) y riesgo de cáncer de mama. Se empleó para el análisis de PCBs la técnica de Janak, K. y col. mod. La investigación se realizó por GC/ECD y se utilizaron los congéneres 28, 52, 77, 99, 101, 105, 118, 126, 138, 153, 156, 169, 170, 180, 183, 187 y 189. Las concentraciones medias (en ng/g de lípidos) del total de congéneres de PCBs hallados en tejido adiposo mamario fueron significativamente mayores en los casos malignos ($p = 0,0009$). La media de la suma de los congéneres simil-dioxinas ajustada por edad, IMC, residencia y ocupación fue significativamente mayor en los tumores malignos que en los benignos: $200,1 \pm 33,9$ vs $61,1 \pm 49,2$ ng /g de lípidos ($p < 0,05$), predominando los congéneres mono-*orto*-sustituidos 118 ($p < 0,01$) y 156 ($p = 0,046$). Se encontró significativa asociación entre la concentración total de los congéneres simil-dioxinas y el riesgo de cáncer de mama (odds ratio (OR)=1,02, IC 95%: 1,01; 1,03) $p = 0,001$ ajustado por edad, IMC, ocupación y hábito de fumar. La media geométrica de los equivalentes tóxicos totales (TEQs) ajustada por las covariables edad, residencia y ocupación fue altamente significativa para el grupo maligno ($p < 0,0001$). También se encontró asociación significativa entre TEQs y riesgo de cáncer de mama (OR)=2,04, IC 95%: 1,14; 3,65) $p = 0,016$. Los Resultados sugie-

ren que la exposición a PCBs simil-dioxinas aumentaría el riesgo de cáncer de mama.

0406 (512) LA SOBREENPRESIÓN DEL COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES Y DE NF-KB, RAC3 PROMUEVE EL CRECIMIENTO INDEPENDIENTE DE ANCLAJE Y LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMÁTICA.

S Micenmacher¹, G Colo¹, M F Rubio¹, C Alvarado¹, M Ruiz Grecco¹, C Escaris¹, M Costas¹

¹Instituto de Investigaciones Médicas <samicen@hotmail.com>

El coactivador de receptores nucleares RAC3 se encuentra sobreexpresado en varios tumores. Demostramos previamente su rol como coactivador del factor de transcripción NF-kB que controla la expresión de genes anti-apoptóticos y se ve involucrado en la proliferación celular. Para determinar su rol en el desarrollo de tumores mediante su posible participación en la transición epitelio-mesenquimática, crecimiento independiente de anclaje y aumento de la tasa proliferativa, se generaron clones estables con alta expresión de RAC3 en células HEK293. En este trabajo se detectó una correlación significativa de los niveles de expresión de RAC3 y Vimentina, marcador tumoral y gen blanco de NF-kB, asociada a la transición epitelio-mesenquimática e invasividad. Por crecimiento en soft agar, se observó a los 29 días, la formación de colonias en los clones con altos niveles de RAC3 y la incapacidad de las células HEK tipo salvaje de sobrevivir al crecimiento independiente de anclaje sembrando igual número. Finalmente, por tinción con cristal violeta se observó que la proliferación de los clones sobreexpresando RAC3 respecto de las células tipo salvaje fue de 82, 60 y 77% mayor a las 24, 48 y 72 hs respectivamente para los clones de expresión moderada y de 147, 200 y 120% para los de alta expresión, demostrando que existe una correlación entre los niveles de expresión de coactivador y su capacidad proliferativa. Concluimos que la sobreexpresión del coactivador RAC3 en HEK293, contribuye al desarrollo tumoral, no solo porque previene la apoptosis y contribuye a la respuesta proliferativa sino también por su colaboración en la expresión de moléculas blanco de NF-kB necesarias para la transición epitelio-mesenquimática vinculadas con la capacidad de migración y contribuyendo al crecimiento independiente de anclaje. RAC3 podría ser un posible blanco para futuras terapias en tumores hormono-dependientes e independientes

0407 (536) DESARROLLO DE RECEPTORES SOLUBLES EPHB4 Y EPHRINB2: SUS EFECTOS SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES Y LÍNEAS DE MELANOMA HUMANO. M C Gómez¹, A D Góngora¹, A G Mladovan¹, A Baldi¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental <martinxv@hotmail.com>

La interacción de receptores Eph con sus ligandos Ephrin, son reguladores importantes en el desarrollo de la vasculogénesis y angiogénesis. Eph de clase B se expresa en células tumorales y endoteliales, y su ligando, EphrinB, está involucrado en la proliferación y migración de células endoteliales. Además, la expresión del complejo EphB/EphrinB es regulado por VEGF, sugiriendo que cumplen un papel crítico en el desarrollo de la angiogénesis y la progresión tumoral. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del complejo Eph/Ephrin de la clase B en la angiogénesis y desarrollo tumoral. Para esto hemos clonado receptores solubles fusionados con una porción Fc de IgG humano (EphB4-Fc y EphrinB2-Fc) y evaluado in vitro su efecto sobre la proliferación de células endoteliales (HUVEC) y en tres líneas de melanoma humano (IBB Mel-J, A-375 y M8). Por otra parte, se estudió la expresión de VEGF inducida por estos receptores solubles. EphrinB2-Fc estimula la proliferación de células endoteliales (p<0,001) observando similares efectos mitogénicos en las líneas celulares de melanoma (p<0,01). Además, por primera vez se demostró que EphrinB2 induce la expresión de VEGF en forma dosis dependiente en las líneas de melanoma ensayadas. En ensayos

preliminares observamos que EphB4-Fc desencadena apoptosis de células de melanoma (p<0,01) probablemente interfiriendo con la interacción de EphB/EphrinB endógenas. Sugerimos que EphrinB2 actúa como una señal proangiogénica en dos niveles: estimulando la proliferación de células endoteliales e induciendo la expresión de VEGF en las células de melanoma, indicando que EphrinB2 podría ser un blanco farmacológico en melanoma.

0408 (537) FABRICACIÓN DE MICROARRAYS INVERTIDOS DE PROTEÍNAS PARA EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES OBTENIDOS A PARTIR DE MICRODISECCIÓN LASER DE BIOPSIAS DE CÁNCER COLORECTAL. J M Arriaga¹, E M Levy¹, S Morales Bayo², C Zucchini³, P De Sanctis³, L Valvassori³, A I Bravo⁴, M M Barrio¹, G Sycz¹, E Huertas⁵, J Mordoh^{1,6}, M Bianchini¹

¹Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA); ²Hospital Municipal Prof. Dr B. A. Houssay, Vicente López; ³Centro di Ricerca in Genetica Molecolare "Fondazione CARISBO", Dipartimento di Istologia Embriologia e Biologia Applicata, de la Università de Bologna (Italia); ⁴HIGA, Eva Perón, San Martín, Provincia de Buenos Aires; ⁵Instituto Médico Especializado Alexander Fleming, Ciudad de Buenos Aires; ⁶Fundación Instituto Leloir-IBBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires <jm_arriaga@yahoo.com.ar>

Modernas tecnologías como la *Microdisección Laser* (MDL) permiten capturar poblaciones celulares puras a partir de pequeñas biopsias. Sin embargo, la cantidad de material proteico que es posible obtener es muy limitada, por lo tanto se hace indispensable una herramienta que permita una significativa miniaturización del proceso de *screening* como son los *Microarrays Invertidos de Lisados Proteicos* (MILP). El objetivo de este trabajo consistió en la realización de los MILPs a través de la inmovilización de lisados proteicos provenientes de poblaciones celulares puras, obtenidas por MDL sobre 50 biopsias tumorales de colon. La MDL permitió separar de manera muy precisa los diferentes tipos celulares de interés (epitelio y estroma tanto tumoral como normal; células metastásicas) capturando cerca de 5.000 células en cada caso. Alrededor de 10 nl de cada muestra fueron sembrados por triplicado, utilizando el robot Micro Grid II (Biorobotic; Genomic Solutions), según un esquema de diluciones seriadas, sobre matrices de nitrocelulosa (FAST® Slides; Whatman S&S Protein) adheridas a un portaobjeto de vidrio. Esto generó un *array* con 1.088 *microspots* (diámetro entre 80-100 µm), incluyendo controles positivos (curva estándar) y negativos. Los lisados proteicos depositados en el *array* fueron identificados mediante un anticuerpo específico para α -actina. Para la detección utilizamos una estrategia cromogénica de amplificación de la señal (CSA, DAKO). La adquisición de las imágenes se realizó con un *scanner* óptico de alta resolución que permitió estimar la intensidad de señal proveniente de cada uno de los puntos. Relativizando estas señales con aquellas provenientes de los puntos de la curva estándar, fue posible estimar la cantidad de proteína presente en cada *spot*. Con alrededor de solo 5.000 células se pudieron fabricar más de 50 *arrays*; estos *chips* constituyen una herramienta de trabajo única para la cuantificación de la expresión de proteínas en el microambiente tumoral.

0409 (594) EL CISPLATINO REDUCE LA SÍNTESIS DE TESTOSTERONA A TRAVÉS DE UN MECANISMO QUE INCLUYE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA P450SCC MEDIADA POR ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO. M M Mori Sequeiros García¹, G Suarez¹, N Gomez¹, A Acquier¹, A Gorostizaga¹, L Brion¹, C F Mendez¹, C Paz¹

¹IIMHNO Dpto de Bioquímica Facultad de Medicina UBA <mercedesmori@yahoo.com.ar>

Carboplatino (Cp), oxaliplatino (Ox) y cisplatino (Cs) son drogas quimioterápicas de uso frecuente. Cada una de ellas exhibe diferente grado de toxicidad e involucra, en algunos sistemas, la liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Dado que la

administración de estos compuestos causa un descenso en los niveles plasmáticos de testosterona (T), el objetivo de este estudio fue determinar la toxicidad *in vitro* de estas drogas sobre la esteroidogénesis testicular y caracterizar el mecanismo involucrado. Se valoró por RIA la producción de T de células intersticiales de testículo de ratón incubadas con Cp, Ox o Cs (50 μ M, 5 h) en condiciones basales o bajo estimulación con hCG u 8BrAMPc. Sólo Cs inhibió la producción de T (ng/ml), tanto basal (9,0 \pm 2,8 vs. 5,1 \pm 1,6; control y Cs respectivamente) como la de células estimuladas (hCG=150,3 \pm 23,3; AMPc=126,9 \pm 35,4; hCG+Cs=106,6 \pm 22,0; AMPc+Cs= 71,0 \pm 15,0), $p < 0,05$. Se evaluó además la producción de T a partir de sustratos de las enzimas P450scc y 3 β -OH-esteroide DH: un análogo permeable del colesterol (22R-OH-esteroide, 22R) y pregnenolona (P5), respectivamente. Cs inhibió la síntesis de T sostenida a partir de 22R (22R=32,0 \pm 4,1; 22R+Cis=15,5 \pm 3,1), $p < 0,05$; pero no modificó la síntesis de T a partir de P5. ABAP, un compuesto generador de ROS, también disminuyó la síntesis de T a partir de 22R ($p < 0,01$). El antioxidante trolox (Tx) revirtió el efecto tanto de ABAP como de Cs sobre la síntesis de T a partir de 22R (22R+Cs+Tx=34,0 \pm 3,3), $p < 0,05$, sin modificar por sí solo la esteroidogénesis (22R+Tx=29,7 \pm 3,4). Estos Resultados indican que Cs ejerce una acción tóxica sobre la célula de Leydig. Esta acción se evidencia por la disminución en la síntesis de T a través de la inhibición del complejo P450scc mediada por ROS. Avala esta conclusión el hecho que el Cs además modificó parámetros relacionados con la defensa antioxidante en células de Leydig de la línea MA-10.

0410 (612) PESTICIDAS ORGANOCORADOS ACTIVAN LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DEL HER1 DEPENDIENTE DE C-SRC EN GLANDULA MAMARIA DE RATA. D Peña¹, C Pontillo¹, M A García¹, C Cocca², L Alvarez¹, V Lux Lantos³, I Frahm⁴, R Bergoc², D Kleiman¹, A Randi¹

¹Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Depto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA; ²Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.; ³Laboratorio de Neuroendocrinología, Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; ⁴Departamento de Patología, Sanatorio Mater-Dei, Buenos Aires, Argentina <defispitonisa@hotmail.com>

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado promotor de tumores hepáticos y mamaros en ratas. Demostramos que el HCB aumenta el número y grado de malignidad de tumores mamaros inducidos químicamente en ratas. La c-Src sinergiza con HER1 por su asociación física y fosforilación en Y845, que induce un aumento en la proliferación, migración y metástasis. Los estrógenos (E₂) activan efectores del camino de HER1, mediados por la activación de c-Src. El objetivo fue estudiar en ratas, el mecanismo de acción del HCB sobre la vía de señalización del HER1 analizando en glándula (GM) y tumores mamaros (T) inducidos por NMU: a) niveles de HER1 y su fosforilación en Y845, b) contenido y activación de c-Src, d) niveles de REá, e) niveles y activación de ERK 1-2 y f) niveles séricos de E₂ y progesterona. Grupos: Control, HCB(100 mg/kg) durante 60 días, NMU(50 mg/kg) 3 dosis y NMU-HCB. Se analizaron los niveles de expresión y activación de las proteínas por inmunoblot con anticuerpos contra formas totales y fosforiladas. Las concentraciones hormonales por RIA. El HCB: 1) aumenta la fosforilación en Y845 del HER1 en GM (128%, $p < 0,01$), mientras que en T la disminuye (82%, $p < 0,01$); 2) incrementa el contenido proteico de c-Src (140%, $p < 0,05$) en GM y en T (42%, $p < 0,05$); bajando su activación sólo en T (46%, $p < 0,001$), 3) aumenta los niveles de REá citosólico (106%, $p < 0,05$) y nuclear (210%, $p < 0,01$) en T, 4) disminuye la activación del ERK 1-2 citosólico (22%, $p < 0,01$) y aumenta la de ERK1-2 nuclear (53%, $p < 0,05$) en GM; en T disminuye la de ERK1-2 nuclear (83%, $p < 0,05$). Los E₂ circulantes disminuyeron sólo en el grupo NMU-HCB (58%, $p < 0,01$), mientras que la progesterona disminuyó en HCB (46%, $p < 0,01$) y aumentó en NMU-HCB (80%, $p < 0,05$). El HCB estimula la vía de señalización del HER1 en forma dependiente de c-Src en GM, pudiendo explicar la hiperplasia y el aumento en la proliferación ductal obser-

vados previamente. En T esta vía no estaría involucrada en el aumento de la malignidad reportado.

0411 (398) PÉRDIDA DE LA IMPRONTA GENÓMICA EN EL CÁNCER COLORRECTAL. M L Pellegrini¹, D Gomez², C Vaccaro³, M A Redal¹

¹Unidad de Medicina Molecular y Genómica del Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental (ICBME) Hospital Italiano; ²Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes.; ³Servicio de Cirugía General, Sección Coloproctología, Hospital Italiano <maria.pellegrini@hospitalitaliano.org.ar>

Los cambios epigenéticos -cambios heredables en el patrón de expresión génica mediados por mecanismos que no alteran la secuencia de bases del ADN- están involucrados en el desarrollo del Cáncer Colorrectal (CCR). Una de las características epigenéticas que se observa es la impronta genómica (IG) o silenciamiento específico de uno de los alelos parentales. El gen IGF2, factor de crecimiento de insulina tipo 2, promueve la proliferación celular y presenta IG, expresándose solo el alelo paterno. La pérdida de IG ocurre cuando se desregulan los mecanismos que mantienen al alelo materno silenciado y se inicia la expresión bialélica promoviendo la proliferación celular anormal. El objetivo del trabajo fue evaluar el estado de IG del gen IGF2 en muestras de pacientes con CCR. Se analizaron 33 muestras de sangre, mucosa normal y tejido tumoral de pacientes diagnosticados con un adenocarcinoma colorrectal estadio 1, 2 y 3, del Servicio de Cirugía. Se realizó la extracción de ADN y de ARN. Mediante PCR y digestión enzimática, se estudio el polimorfismo GGGCCC pos. 8765 del IGF 2, se analizó la expresión génica en las muestras heterocigotas (informativas) mediante RT-PCR. En sangre se obtuvieron 11 muestras informativas, 2 de las cuales mostraron pérdida de IG debido a que expresaban los 2 alelos. En mucosa se obtuvieron 10 muestras informativas (30.3%), 4 presentaron pérdida de IG (12 %). En tumor, 10 casos fueron informativos con 4 pérdidas de IG (12 %). En mucosa y tumor se observó pérdida de IG en el 45% de las muestras informativas, 2 presentaron expresión bialélica en mucosa y tumor, sugiriendo que la mucosa se encontraba en un periodo de cambio hacia un fenotipo maligno y 2 muestras presentaban pérdida de IG en tejido tumoral y no en mucosa, sugiriendo que se encontraban en un periodo menos avanzado. Se encontró pérdida de IG en sangre en el 6 % de las muestras informativas. Se propone a dicha característica epigenética como un posible marcador tumoral del CCR

ONCOLOGIA P2

0412 (100) EL CO-FACTOR TRANSCRIPCIONAL P300/CBP SE ENCUENTRA SOBREEXPRESADO Y EN UNA INUSUAL LOCALIZACIÓN CITOPASMÁTICA EN ADENOCARCINOMA MAMARIO HUMANO Y DE RATA. M E Fermento¹, N A Gandini¹, C A Lang¹, H V Maturi², E Agriello³, M M Facchinetti¹, A C Curino¹

¹Laboratorio de Biología Básica del Cáncer - Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca (INIBIBB) Centro Científico Tecnológico Bahía Blanca; ²Cátedra Anatómota Histología - Universidad Nacional del Sur; ³Area de Citometría - Servicio de Hematología - Hospital Interzonal Dr. Jose Penna <efermento@criba.edu.ar>

El p300 actúa como co-factor transcripcional de varias proteínas como el p53 y el receptor estrogénico. Evidencia reciente sugiere que esta proteína tendría un rol en la tumorigénesis. Dado que prácticamente no hay datos sobre la expresión de p300 en el cáncer de mama, el objetivo de este trabajo fue investigar la presencia y localización celular de esta proteína en un modelo en rata (inducido por DMBA) y comparar estos Resultados con aquellos obtenidos en biopsias quirúrgicas de tumores humanos. Se estudiaron por inmunohistoquímica (IHC) 5 tumores y 5 glándulas mamaras normales. Se observó "alta marcación" (más del 50 %

de células inmunomarcadas, CI) en todos los tumores y "baja marcación" (entre 10 % y 50 % de CI) en 4 glándulas normales, mostrando la quinta "marcación negativa" (menos del 10 % de CI). La expresión fue solamente nuclear en las 4 glándulas normales pero se detectó tanto en núcleo como en citoplasma en los 5 tumores. Similares Resultados se obtuvieron utilizando inmunofluorescencia en cultivos primarios de tumores y mamas normales. Para comparar el modelo de rata con el carcinoma mamario humano se estudiaron por inmunohistoquímica 31 carcinomas ductales y 5 hiperplasias mamarias. El p300 fue detectado en 2 hiperplasias y en el 85% de los tumores (más del 10% de CI). En el 80 % de las biopsias se detectó diferencia de expresión entre la zona tumoral (ZT) con "alta marcación" y las regiones adyacentes histológicamente normales (RA) con "baja marcación". En las RA el p300 fue detectado en núcleo mientras que en las ZT se observó expresión nuclear (30 % de los casos) y citoplasmática (70% de las biopsias). La sobreexpresión, y diferente localización, de esta proteína en los tumores con respecto a tejidos normales refuerza la hipótesis de su importancia en los procesos tumorigénicos. La similitud de los Resultados obtenidos entre los carcinomas mamaros en humanos y en ratas indica que este modelo es adecuado para la realización de futuros estudios.

0413 (101) ESTUDIOS MULTIVARIADOS DE MARCADORES DE PRONÓSTICO EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN A CÉLULAS NO PEQUEÑAS (NSCLC) ESTADÍO I Y II. L V Mauro¹, M L Dalurzo², M Nuñez², P F Vázquez¹, D Smith², J M Lastiri², M Simian¹, E D Bal de Kier Joffé¹, M G Pallotta², L I Puricelli¹

¹Área Investigación. Instituto de Oncología Angel H Roffo; ²Hospital Italiano de Buenos Aires <lvmauro@yahoo.com.ar>

A pesar de los esfuerzos para reducir la alta mortalidad asociada al cáncer de pulmón, entre 20%-30% de los pacientes NSCLC EI y EII evolucionan desfavorablemente. Nuestro objetivo fue estudiar, mediante inmunohistoquímica en cortes histológicos de tumores primarios de 73 pacientes NSCLC de EI y EII, la expresión de las siguientes moléculas agrupadas según su funcionalidad en: A) Moléculas de adhesión: E-Cadherina/â-Catenina y NCAM (Molécula de Adhesión Neuronal); B) Receptores de membrana: EGFR y TâRI (Receptor I de TGFâ); C) Receptores nucleares: estrogénicos (REâ y REâ), de progesterona (RP) y de ácido retinoico (RARâ y RARâ); y D) Otras moléculas: CRBP (Proteína Celular de Unión al Retinol) y p53. Los Resultados se asociaron con los datos clinicopatológicos de los pacientes, incluyendo supervivencia global (SVG), mediante Metodología estadísticas uni y multivariadas. Alrededor del 50% de los casos perdió la expresión de E-Cadherina y â-Catenina y el 22% expresó NCAM, marcador de diferenciación neuroendócrina. Los tumores NSCLC expresaron, en diferente proporción, los receptores de las hormonas sexuales y del ácido retinoico, así como CRBP. Además, casi el 60% de los tumores expresaron EGFR, el 26% expresó el TâRI y el 33% expresó p53. La expresión alta de RARâ a nivel citoplasmático, la pérdida de â-Catenina citoplasmática y de EGFR fueron marcadores independientes asociados a mal pronóstico. Los pacientes cuyos tumores perdieron simultáneamente REâ nuclear y EGFR mostraron la peor SVG (p<0,05). Estos Resultados indican que: 1) Estudios del perfil molecular tumoral, que incluyan a â-Catenina, RARâ, REâ y EGFR, permitirán identificar pacientes NSCLC de bajo estadio con mayor riesgo de mala evolución, 2) El tratamiento con anti-estrógenos o con diferenciadores derivados de la vitamina A, debería ser considerado como una opción terapéutica para los pacientes NSCLC, ya que estos tumores expresan varios componentes de estas vías.

0414 (117) ESTUDIOS DE LA EXPRESIÓN DE HO-1 Y VEGF EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA. M Ferrando¹, G Gueron¹, P De Luca², A De Siervi¹, E Vazquez¹

¹Departamento Química Biológica, FCEyN, UBA. CONICET; ²Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA, CONICET <mercedesferrando@gmail.com>

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más frecuentes entre los hombres, cuya metástasis se caracteriza por su predilección por el tejido óseo y por su naturaleza osteoblástica. Varios estudios involucran al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en la patofisiología de la metástasis ósea del cáncer de próstata. La hemo oxigenasa 1 (HO1), enzima limitante en la degradación del hemo, es una proteína clave en el control de la inflamación y recientemente demostramos que está asociada a la carcinogénesis prostática. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inducción de HO-1 sobre la regulación de genes relacionados con la metástasis del cáncer de próstata. Se utilizaron líneas de cáncer de próstata sensibles (LNCaP) e insensibles a andrógenos (PC3), en las cuales se indujo la expresión del ARNm de HO-1 con hemina y se analizó la expresión de marcadores de metástasis ósea como metaloproteasa 9 (MMP9) y osteopontina (OPN) y VEGF-C y VEGF-A, marcadores de linfangiogénesis y angiogénesis, respectivamente. El tratamiento con hemina aumentó (232%, P<0.05) la expresión de VEGF-A en PC3, mientras que en LNCaP la expresión de MMP9, OPN y VEGF-C disminuyeron significativamente (86%, 48%, 73% respectivamente, P<0.05). También comprobamos que HO-1 regula la actividad del promotor de VEGF-A. Además demostramos que LNCaP posee niveles basales significativamente superiores de VEGF-A y VEGF-C, mientras que PC3 posee niveles basales superiores de OPN y MMP9. En las células LNCaP el tratamiento con hemina produjo un significativo incremento 78% (P<0.05) en la expresión del antígeno prostático específico, que podría reflejar un desplazamiento hacia un grado de diferenciación celular mayor. Todos estos Resultados sugieren que la sobre-expresión de HO-1 estaría asociada a un fenotipo menos agresivo en cáncer de próstata.

0415 (226) GALECTINA-8 PROMUEVE LA ANGIOGÉNESIS A TRAVÉS DE UN INCREMENTO DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES. V M Cárdenas Delgado¹, L L Colombo², D O Croci³, G A Rabinovich³, I Frahm⁴, C Wolfenstein-Todel¹, M T Elola¹

¹Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica-UBA-CONICET; ²Instituto Roffo, Área Investigación; ³Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; ⁴Sanatorio Mater Dei <vmanuel_cd@yahoo.com.ar>

Estudios previos demuestran la participación de galectina-8 (Gal-8) en fenómenos de adhesión asociados a la diseminación tumoral. El objetivo general de este trabajo consiste en evaluar la participación de Gal-8 en procesos de angiogénesis. A tal fin, se inyectaron ratones BALB/c dorsolateralmente por vía subcutánea con 400 μ l de Matrigel con PBS (control negativo) o en combinación con el factor de crecimiento endotelial VEGF (100 ng/ml) (control positivo) o con distintas concentraciones (5, 10 y 20 μ g/ml) de Gal-8 recombinante libre de pirógenos. En cada animal, se inyectó de un lado el control negativo y del otro lado ya sea el control positivo o la muestra problema. Luego de 6 días, los ratones se sacrificaron, y se removieron las masas de Matrigel que se congelaron y cortaron en criostato. Las secciones fueron procesadas para inmunofluorescencia, detectando por microscopía confocal el factor de von Willebrand o CD31 como marcadores de células endoteliales. Los núcleos celulares se tiñeron con iodo de propidio. Se cuantificaron diez campos de cada preparado, obteniendo el número de células endoteliales/mm² en dos experimentos independientes. Los Resultados obtenidos demostraron la presencia de un intenso infiltrado de células endoteliales que migraron hacia el Matrigel de VEGF (58 \pm 4, p<0,05) y de Gal-8 (20 μ g/ml; 158 \pm 56, p<0,05) respecto al Matrigel control (26 \pm 1, p<0,05). Por otra parte, en estudios preliminares de inmunohistoquímica, hemos detectado la presencia de Gal-8 en endotelio vascular de tejidos normales y tumorales de próstata y mama humanos. Concluimos que Gal-8 actúa como un factor pro-angiogénico *in vivo* y se expresa en endotelio vascular, pudiendo estar implicada en la neovascularización en procesos neoplásicos e inflamatorios.

0416 (311) MODULACIÓN INMUNE DURANTE EL DESARROLLO TUMORAL DE UN MODELO MAMARIO MURINO ESTRÓGENO DEPENDIENTE M05. A N Motter¹, O Pontiggia¹, V Rodríguez¹, M Simian¹, S Klein¹

¹Instituto de Oncología Angel H Roffo <andreamotter@gmail.com>

Se estudió la actividad del sistema inmune sobre del desarrollo del tumor M05 hormono dependiente (HD) y su variante hormono independiente (HI) en dos etapas de evolución. 1- Evaluamos el rol del bazo en el crecimiento tumoral. Se realizaron esplenectomías (CX), previo y post trasplante tumoral sc con trocar de HD y HI. 2- Estudiamos el efecto de los esplenocitos (SP) de portadores de tumor HD y HI aislados en estadios temprano, 28 días, (28) y tardío, 56 días (56) de evolución, y de sus medios condicionados (MC) sobre la proliferación de la línea celular epitelial, derivada de M05-HD (LM05-E), sensible a Tamoxifeno (Tam). 3- Determinamos la presencia de citoquinas (CK) por array múltiple de CK (Ray Biotech), metaloproteasas (MMPs) y uPA en MC de M05-HD y HI (zimografía). Resultados: 1- La CX previa al trasplante incrementó el crecimiento tumoral ($p=0,0005$) vs Control (C) en ratones portadores de HD. La CX realizada al día 33 post-trasplante disminuyó significativamente su crecimiento ($p=0,05$). La CX no afectó el crecimiento del tumor HI. 2- Los SP de HD-28 disminuían la proliferación in vitro de LM05-E, mientras que HD-56 estimularon la proliferación celular ($p=0,01$). LM05-E tratadas con Tam en presencia de MC-56 mostraron menor porcentaje de muerte celular que C. 3- En los MC de M05-HD se identificó la presencia de IL-6, c-tack, GCSF, IL-12p70, IL-13, IL-17, IFN- γ , MCP1 y SCF; y en los MC de M05-HI: MIP3 β , TIMP1, VEGF. Asimismo se identificó un aumento de actividad de MMP 2 y 9 ($p=0,01$) y disminución de uPA ($p=0,05$) en HI vs HD. Conclusión: La esplenectomía modula de manera diferente el desarrollo de los tumores HD y HI. Los SP de tumores avanzados inducen mayor proliferación y resistencia endócrina de LM05-E. Los MC de tumores HD y HI muestran diferente perfil de CK y actividad MMPs. Nuestros Resultados muestran que existe una relación entre el sistema inmune y la adquisición de la hormono independencia.

0417 (324) ESTUDIO DE LA EXPRESION GENETICA Y ESTADO DE INTEGRACION DE HPV16 Y HPV18 EN LESIONES DE BAJO/ALTO GRADO Y CARCINOMAS CERVICALES. L C Girguly¹, J E Mauro², I Y Stella³, A Guglielminetti², K Eiguchi¹

¹Cátedra de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador; ²Servicio de Tocoginecología, Hospital Municipal Carlos G Durand. Cdad. Bs. As.; ³Cátedra de patología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador <lgirguly@yahoo.com.ar>

El cáncer cervical es la 2da causa de muerte en mujeres debida a cáncer, y se ha reconocido al Papilomavirus Humano (HPV) como agente etiológico del mismo, estando presente en al menos 70% de las mujeres activas sexualmente. HPV16 y HPV18, y la sobreexpresión de sus oncogenes E6/E7, sería alterada por el estado de integración viral. Dada la falta de criterios pronóstico, las lesiones provocadas por HPV son removidas quirúrgicamente a pesar del alto porcentaje de remisión espontánea, resultando en sobretratamientos. El estado de integración viral, al contribuir con la transformación neoplásica, podría servir como criterio pronóstico. **Objetivos:** Evaluar la expresión y estado de integración de HPV16 y 18 en lesiones de cérvix como marcador de progresión maligna. **METODOLOGIA:** se evaluaron CIN I n=18 (G1), CIN II/III n=19 (G2), Carcinomas n=32 (G3). Se detectó y tipificó los HPV, se analizó la expresión de oncogenes virales y el estado de integración por PCR-APOT. **Resultados:** Observamos ADN viral en 0.78 G1, 0.89 G2 y 0.97 G3; . Observamos mayores frecuencias de HPV16 en G2 (0.53) y G3 (0.64), mientras que las frecuencias de HPV18 fueron bajas en todos los grupos (0.19 G3), encontrándose coinfección en los tres grupos (<0.12). La expresión de oncogenes virales de HPV16 y/o 18 aumentó con el grado de lesión analizada (E7 HPV16: 0.10 G1, 0.29 G2, 0.59 G3;

E6 HPV18: 0.10 G1, 0.12 G2, 0.15 G3). Todas las muestras coinfectadas mostraron expresión de oncogenes. El genoma de HPV16 se encontró en la forma integrada o coexistente con la forma episomal, mientras que el genoma de HPV18 fue integrado. En las muestras coinfectadas, los genomas se encontraron integrados o coexistentes en ambas formas. **Conclusiones:** Observamos un aumento de expresión de oncogenes y del estado de integración relacionado con el grado de lesión. HPV18 sólo se encontró en la forma integrada. Podemos inferir que la integración viral podría ser un marcador de progresión maligna en lesiones cervicales.

0418 (352) ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LA PROGRESIÓN DE NEOPLASIAS DE MAMA INDUCIDAS POR EL VIRUS POLIOMA MURINO. S Simula¹, N Smud¹, N Sanjuan¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA <nasanjuan@gmail.com>

Hay evidencias inmunocitoquímicas de que las neoplasias de mama inducidas en el ratón por el virus Polioma están compuestas por poblaciones celulares con distinto grado de diferenciación a pesar de estar todas ellas inducidas por el oncogén viral mT. El objetivo de este trabajo fue estudiar ultraestructuralmente las características de la progresión de las lesiones mamarias inducidas por Polioma desde el estadio de hiperplasia atípica hasta el carcinoma desarrollado. Se inocularon subcutáneamente ratonas neonatas C3H BiDa con 10⁵ ufp de Polioma A2 y se sacrificaron a los 15, 40, 70 y 90 días post-infección (pi). Una de las glándulas N^o4 se fijó en formaldehído-glutaraldehído tamponado y se la procesó por el método de "montaje completo" (MC). La glándula colateral fue procesada para histología y parte del tejido fue congelado para aislamiento viral y Western blot. En cada tiempo pi se seleccionaron sectores de lesiones macroscópicas que fueron microdisecados y procesados para su inclusión en Epon 812. A los 15 días pi los ductos estaban compuestos por una doble hilera de células polarizadas y con uniones intercelulares estrechas. A los 40 días pi las células ductales continuaban polarizadas, con extensas microvellosidades apicales aunque habiendo perdido en parte la histoarquitectura con un cuadro de hiperplasia atípica. Esto fue más evidente a los 70 días pi. Los tumores presentaron muy escasas microvellosidades cortas, abundantes polisomas, anisocariosis, vacuolas secretorias y pérdida de la histoarquitectura y de las uniones intercelulares, con esbozos de microglándulas. En ningún caso se detectaron partículas de virus Polioma, que tampoco pudo ser aislado por cultivo a partir de los tumores, aunque en todos ellos se detectó la presencia de mT por Western blot. Se concluye que estas neoplasias son adenocarcinomas pobremente diferenciados del tipo intraductal y que carecen de virus infectivos en todos sus estadios.

0419 (470) LA INHIBICIÓN DE LA GTPASA RAC AUMENTA EL EFECTO ANTITUMORAL DE LA SIMVASTATINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO. G A Cardama¹, H G Farina¹, D F Alonso¹, D E Gómez¹, P Lorenzani Menna¹

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes <gcardama@gmail.com>

La familia de las Rho GTPasas está conformada por proteínas de cerca de 20 kDa que funcionan como interruptores de señales intracelulares, siendo los miembros más estudiados Rho y Rac. Estas proteínas regulan la dinámica del citoesqueleto de actina, afectando la adhesión al sustrato y migración celular. Las estatinas inhiben la síntesis de isoprenoides y colesterol, e interfieren la localización subcelular de la GTPasa Rho, que requiere de geranylgeranilo para su unión a la membrana celular. Por otro lado, las quimerinas estimulan la actividad GTPasa endógena de Rac1, llevándola a su estado inactivo. En este trabajo, exploramos los efectos antitumorales de la simvastatina sobre células cancerosas con niveles disminuidos de Rac-GTP. Se obtuvieron niveles bajos de Rac-GTP transfectando células F3II de carcinoma mamario murino con β 2-quimerina por lipofección estable. Al

sobreexpresar β 2-quimerina, las células tumorales fueron más sensibles a la simvastatina que las células sin transfectar, mostrando una mayor sensibilidad al desprendimiento del sustrato y un aumento significativo de la apoptosis ($p < 0,05$) luego del cultivo durante 24 h en presencia de la estatina en dosis no citotóxicas (5 a 20 μ M). Se estudió también la combinación de simvastatina con azatioprina, una droga que es convertida por el metabolismo celular en 6-tio-guanosina, que a su vez inhibe de manera específica a la proteína Rac. Valorada con el ensayo de MTT, la combinación de simvastatina con azatioprina aumentó significativamente el efecto antiproliferativo sobre células F3II (en % de inhibición, Simvastatina 5 μ M: 34 ± 7 , Azatioprina 25 μ M: 50 ± 7 , Simvastatina plus Azatioprina: 70 ± 5 ; $p < 0,01$). La combinación de una estatina, que afecta la señalización por Rho, con la disminución de los niveles de activación de Rac, por sobreexpresión de quimerinas o un inhibidor específico como la azatioprina, produciría un efecto antitumoral cooperativo sobre cultivos de células F3II de carcinoma mamario murino.

0420 (490) APOPTOSIS INDUCIDA POR LA ENTEROTOXINA E DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS, UN SUPERANTÍGENO T, EN CÉLULAS JURKAT. J Mundiñano ¹, D Lorenzo ¹, I Nepomnaschy ¹, I Piazzon ¹

¹ILEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina <jmundiniano@hotmail.com>

Los Superantígenos T (Sags) son proteínas de origen viral o bacteriano que son reconocidos por toda célula T portadora de una región variable beta ($V\beta$) específica, independientemente del resto de las regiones variables que conforman el receptor para el antígeno (TCR). Al interactuar con el TCR de linfocitos normales inducen la proliferación y posterior apoptosis de los clones reactivos. Aún no ha sido reportada la capacidad de los Sags de inducir apoptosis en linfomas o leucemias T. En nuestro laboratorio hemos demostrado que las células de linfomas/leucemias T murinas mueren por apoptosis frente a Sags específicos, y que el tratamiento de ratones portadores de linfomas T con Sags es capaz de prolongar significativamente la supervivencia de los mismos. En este trabajo investigamos si los Sags tienen la capacidad de inducir apoptosis en células de la línea celular humana Jurkat-establecida a partir de una leucemia T aguda- portadora de la región $V\beta 8$ en su TCR. Realizamos cultivos de células Jurkat en presencia o ausencia de células presentadoras de antígeno (CPAs) -células THP1 DR+ enfrentándolas a un Sag reconocido por la cadena $V\beta 8$ (SEE, enterotoxina E de *Staphylococcus aureus*), a uno no reconocido (SEB, enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*) o a PBS. Determinamos por citofluorometría la apoptosis mediante el uso de yoduro de propidio o anexinaV-7AAD. Observamos un importante aumento en los niveles de apoptosis frente a SEE en presencia de CPAs (%células anexinaV+: SEE: $43,8 \pm 5,6$; SEB: $13,5 \pm 1,1$; PBS: $13,5 \pm 0,6$) ($p < 0,001$). No encontramos aumentos en la apoptosis en ausencia de CPAs (% células anexina V+: SEE: $14,2 \pm 1,7$; SEB: $12,1 \pm 0,3$; PBS: $12,3 \pm 1,04$). En las condiciones utilizadas no se detectaron incrementos en los niveles de proliferación. Los Resultados sugieren que el superantígeno T SEE es capaz de inducir la apoptosis de células Jurkat. Se discute la posibilidad de la utilización de superantígenos como herramientas terapéuticas.

0421 (496) EFECTO DEL BLOQUEO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO BÁSICO (bFGF), CON ANTICUERPOS MONOCLONALES (AMS), SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL INDUCIDO POR DOS LÍNEAS DE MELANOMA HUMANO. A D Góngora ¹, M C Gómez ¹, A G Mladovan ¹, A Baldi ¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME. <adrian1976@hotmail.com>

El efecto antitumoral del bloqueo del VEGF con AMs ha sido demostrado en varios tipos tumorales pero poco se sabe de su efectividad sobre melanomas que expresan múltiples factores

angiogénicos, entre los que el VEGF y el bFGF son considerados los más importantes. Ha sido propuesto que las terapias antiangiogénicas deben focalizarse en el bloqueo de más de uno de estos factores. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la neutralización del bFGF y del VEGF con AMs sobre el crecimiento tumoral en dos líneas de melanoma humano (IIB Mel-J y A-375), implantadas en ratones atímicos y analizar si la eficacia de este bloqueo se relaciona con los niveles de expresión de estos factores *in vitro*. Mediante ensayos por ELISA sándwich, se cuantificó la expresión del bFGF y del VEGF en estas líneas en cultivo. Para el VEGF los valores fueron mayores ($p < 0,01$) en las IIB Mel-J (230 ± 30 pg/ml) que en las A-375 ($124,3 \pm 11,6$ pg/ml). En el caso del bFGF, los valores resultaron mucho más altos ($p < 0,01$) en las A-375 ($17,6 \pm 1,9$ ng/ 10^5 células) comparado con las IIB Mel-J ($1,8 \pm 0,3$ ng/ 10^5 células). Los experimentos *in vivo* se realizaron inoculando ratones atímicos con las dos líneas celulares en forma independiente. Se utilizaron AMs previamente desarrollados en el laboratorio y con probada actividad neutralizante específica *in vitro*. Cuando los tumores fueron palpables, los animales fueron inyectados (i.p.) dos veces por semana con AM anti-VEGF (10 μ g/ratón), anti-bFGF (200 μ g/ratón) y la combinación de ambos. Concordante con observaciones previas, el AM anti-VEGF causó una inhibición significativa ($p < 0,01$) sobre el crecimiento tumoral en ambos melanomas. Sin embargo, el tratamiento con el AM anti-bFGF no produjo una inhibición significativa para ninguna de las dos líneas, ni potenció el efecto del anti-VEGF. Se encontró relación entre los niveles de expresión *in vitro* y el efecto antitumoral de su bloqueo *in vivo* solo en el caso del VEGF.

0422 (521) CONGÉNERES DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBS) EN PLASMA Y RIESGO DE CÁNCER DE MAMA.

A S Ridolfi ^{1, 2}, S Burlando ², G Álvarez ¹, M E Rodríguez Girault ¹, M Olivera ¹, G González ², I Yohena ¹, V Olmos ¹, M I Sarchi ³, E Villamil Lepori ¹

¹Cátedra de Toxicología y Química Legal-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA; ²Instituto de Investigaciones Médicas Dr Alfredo Lanari; ³Cátedra de Matemáticas-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA <aridolfi@ffyb.uba.ar>

Los PCBs fueron usados como químicos industriales produciendo contaminación ambiental y humana. Algunos investigadores han sugerido asociación entre niveles de congéneres específicos de PCBs en sangre y tejido adiposo y riesgo de cáncer de mama mientras que otros no encuentran tal asociación. El objetivo de este trabajo es correlacionar los niveles plasmáticos de 17 congéneres de PCBs y riesgo de cáncer de mama de un estudio caso-control realizado sobre 92 mujeres con: tumores de mama malignos ($n=40$) y benignos ($n=22$), y mujeres controles sanas ($n=30$). Se empleó para la extracción de PCBs la técnica de Janak, K y col. mod., y posterior investigación por GC/ECD. Se utilizaron los congéneres 28, 52, 77, 99, 101, 105, 118, 126, 138, 153, 156, 169, 170, 180, 183, 187 y 189. Comparados con los controles, los casos de tumores malignos y benignos presentaron concentraciones medias significativamente más elevadas del PCB-99 ($p = 0,0002$). La media geométrica de la suma de los congéneres simil-dioxinas ajustada por edad, IMC, ocupación, residencia, hábito de fumar, consumo de alcohol fué significativamente más elevada en los casos de tumores malignos que en los benignos y controles ($p=0,005$), predominando los congéneres 105 ($p < 0,05$), 118 ($p < 0,05$) y el congéner no-orto-sustituido 126 ($p < 0,0001$). Se encontró significativa asociación entre la concentración total de los congéneres simil-dioxinas y riesgo de cáncer de mama (odds ratio (OR)=2,85, IC 95%: 1,12; 7,22) $p = 0,027$ ajustado por edad, IMC y ocupación. Los TEQs en los casos de tumores malignos fueron significativamente mayores respecto a los benignos ($p < 0,0001$) y también se encontró asociación entre TEQs y cáncer de mama (OR=1,11, IC 95%: 1,03; 1,20) $p = 0,003$ ajustados por todas las covariables. Los Resultados hallados en plasma revelan que la exposición a congéneres de PCBs simil-dioxinas aumentaría el riesgo de cáncer de mama, siendo los TEQs significativamente mayores en los casos de tumores malignos.

0423 (604) EL COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES RAC3 ES REGULADO POSITIVAMENTE POR SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA PROLIFERACION CELULAR. C V Alvarado¹, M F Rubio¹, G P Coló¹, S M Micenmacher¹, M Ruiz Grecco¹, C Escaris¹, M A Costas¹

¹Instituto de Investigaciones Médicas <cevra8@gmail.com>

RAC3 se encuentra sobreexpresado en diversos tumores contribuyendo a su desarrollo por distintos mecanismos que involucran una acción anti-apoptótica y proliferativa. En cuanto a su sobreexpresión, no en todos los casos se debe a amplificación génica y sería importante dilucidar qué mecanismos controlan sus niveles. La rapamicina es un inmunosupresor que demostró tener acción antitumoral, inhibiendo la vía mTOR (involucrada en el crecimiento y proliferación). Demostramos que células HEK293 estimuladas con TNF- α aumentan los niveles de RAC3 y que la inhibición de la vía AKT/mTOR disminuye su actividad anti-apoptótica. Se quiso determinar si ésta y otras cascadas de señales disparadas por citoquinas inflamatorias podrían también participar en el control de la expresión de RAC3. En este trabajo observamos que el aumento en los niveles de RAC3 en células HEK293 por estímulo con TNF- α fue inhibido significativamente tanto por la inhibición de la vía p38 con SB202190 20uM, como por Rapamicina 100nM y por Sulfazalacina 250uM (inhibidor de NF- κ B); mientras que el bloqueo de la vía AKT con Wortmannin no tuvo efecto. La participación de NF- κ B se confirmó además por transfección con un vector de expresión de la subunidad RelA de NF- κ B produciéndose un aumento significativo del 60 \pm 8% respecto de células transfectadas con vector vacío, mientras que en células estimuladas con TNF- α la transfección con I κ B α (mutante superrepresor de NF- β) bloquea totalmente la acción estimuladora de la citoquina. Por otro lado células de tumor de mama T47D que expresan normalmente altos niveles de RAC3 fueron tratadas con Rapamicina 50nM por 96hs observándose una disminución de RAC3 del 30 \pm 10% con respecto a las sin tratar. La expresión de RAC3 es regulada positivamente por NF- β e involucra al menos las vías mTOR y p38. Los Resultados obtenidos sugieren que sería factible el desarrollo de inhibidores farmacológicos de la expresión RAC3 que podría contribuir en la terapia antitumoral.

0424 (613) EL HEXACLOROBENCENO ESTIMULA EL CAMINO DE SEÑALIZACIÓN DEL HER1 VIA C-SRC EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HUMANA MDA-MB-231. C Pontillo¹, D Peña¹, M A García¹, C Cocca², L Alvarez¹, D Kleiman¹, A Randi¹

¹Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA; ²Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA <caroponti@hotmail.com>

El Hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado, consumido con los alimentos y acumulado en tejido adiposo. Observamos que el HCB aumenta el número y malignidad de tumores mamarios inducidos por NMU en ratas, como los niveles de c-Src. En cáncer de mama la c-Src y el HER1 forman un complejo en el que HER1 es fosforilado en Y845 por c-Src, induciendo proliferación, migración e invasión celular. Nuestro objetivo fue estudiar el mecanismo de acción del HCB en la línea celular MDA-MB-231 (-REa, +HER1 y +c-Src) sobre: a) la proliferación celular, b) los niveles del HER1 y su fosforilación en Y845, c) los niveles de c-Src y su activación, d) los niveles de ERK 1-2 y su fosforilación y e) su comparación con los efectos del EGF. Las células fueron hembraadas 24 hs con DMEM 0,5% de suero libre de estrógenos y luego tratadas con 0.005 mM HCB o 10 ng/ml EGF en curvas de tiempo (0,5, 15 y 30 min, 2 y 24 hs) para inmunoblot, o en curvas de dosis con HCB (0.005, 0.05, 0.5 y 5 mM) durante 15 min para inmunoblot y durante 24 hs para proliferación por conteo clonogénico e incorporación de BrdU. Nuestros Resultados mostraron que el HCB: no induce proliferación; estimula la fosforilación de Y845 del HER1 a los 5, 15 y 30 min (60%, p<0.05; 72,15%

, p<0.01 y 56,8%, p<0.05) y la activación de c-Src a los 5 y 15 min (83,8%, p<0.05). La activación del ERK 1-2 inducida por HCB en el tiempo fue similar a la del EGF, mostrando aumentos a 15 y 30 min (207,5%, p<0.05 y 382,2%, p<0.001). En las curvas de dosis con HCB (15 min), se observó aumento en la fosforilación de Y845 del HER1 con HCB 0.05 y 0.5 mM (66,2% y 81,8%, p<0.05); activación de c-Src con HCB 0.005 y 0.05 mM (154,5% y 151,8%, p<0.05); y una activación dosis dependiente del ERK 1-2 con HCB 0.05, 0.5 y 5 mM (124%, p<0.05; 175,5%, p<0.01 y 224,2%, p<0.001). El HCB activa la vía de c-Src/HER-1/ERK 1-2 en la línea celular MDA-MB-231 sin inducir proliferación celular, pudiendo quizás estar asociada a un incremento de la migración.

0425 (619) VALIDACIÓN DE LA SOBREEXPRESIÓN TUMORAL DE 18 GENES EN CÁNCER COLORRECTAL. J M Arriaga

¹, E M Levy¹, C Zucchini², P De Sanctis², L Valvassori², S Morales Bayo³, A I Bravo⁴, M M Barrio¹, G Sycz¹, M Aris⁵, E Huertas⁶, J Mordoh¹, M Bianchini¹

¹Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA); ²Centro Di Ricerca In Genetica Molecolare "Fondazione Carisbo", Dipartimento Di Istologia Embriologia E Biologia Applicata, de la Universidad de Bologna, Italia.; ³Hospital Municipal Prof. Dr B. A. Houssey, Vicente López; ⁴HIGA, Eva Perón, San Martín, Provincia de Buenos Aires; ⁵Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires; ⁶Instituto Médico Especializado Alexander Fleming, Ciudad de Buenos Aires <jm_arriaga@yahoo.com.ar>

El cáncer colorrectal, el tumor de mayor incidencia en Buenos Aires y el segundo a nivel mundial, está caracterizado por una marcada diferencia en la expresión génica con respecto a la mucosa intestinal normal. Dicha diferencia necesita ser mejor caracterizada, tanto para comprender mejor los mecanismos que llevan a la tumorigénesis, como para encontrar marcadores moleculares tumorales de utilidad en la práctica clínica. Para ello se realizó previamente en nuestro laboratorio un estudio de *cDNA microarrays* en el cual se encontraron 1.306 genes sobre o subexpresados >1,5 veces en el tumor, con respecto a la mucosa normal (p<0,001). El objetivo del presente trabajo es validar la sobreexpresión tumoral de 18 de estos genes, mediante qRT-PCR en 7 nuevos pacientes, de diferentes estadios tumorales. Los genes seleccionados fueron el IFN α , 6 canales de membrana, 4 genes de función desconocida, y 8 surgidos de un análisis de "display digital diferencial" (DDD), que revela aquellos genes sobreexpresados en las muestras de cáncer colorrectal utilizadas en el microarray con respecto a bases de datos de expresión de otros tejidos normales y tumorales. Tomando como valor de corte una sobreexpresión tumoral de =1,5 veces, de los pacientes estudiados se encontró sobreexpresión en: 6/7 para PAK6, GRHL1 y SLC2A1; 5/7 para IFN α , LNP, y GDA; 4/7 para SLC01A2, SLC22A11, SEL1 y SQSTM1; 3/7 para RABL3, F2 y TRIM74; 2/7 para SLC30A5 y TMEM56; 1/7 para SLC7A2 y SLC16A1; y 0/7 para TMEM130. A pesar del pequeño número de casos, 4 de los genes mostraron diferencia significativa (p<0,05). Para algunos de estos genes se validó su sobreexpresión a nivel epitelial por MDL y de proteína por WB e IHQ. Estos Resultados confirman la sobreexpresión tumoral de varios de los genes estudiados por *cDNA microarray*, y son de utilidad para seleccionar aquellos genes que ameritan un estudio en mayor profundidad en cuanto a su posible rol en la oncogénesis colorrectal y como posibles marcadores tumorales.

0426 (627) CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS CLONOGÉNICAS DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR) HUMANAS. G Sycz¹, E M Levy¹, A I Bravo², M Aris³, M M Barrio¹, J M Arriaga¹, M Bianchini¹, J Mordoh¹

¹Centro de Investigaciones Oncológicas (CIO-FUCA); ²HIGA Eva Perón, San Martín, Provincia de Buenos Aires; ³Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET <elevy@leloir.org.ar>

Actualmente se postula que dentro de un tumor existen distintas poblaciones celulares. Entre ellas, una subpoblación minoritaria de células con menor grado de diferenciación denominadas Células *Stem* Tumorales (CST), tiene la capacidad de autorrenovarse, dividirse ilimitadamente y dar lugar a células con distinto grado de diferenciación. Debido a que las CST tienen la capacidad de crecer en un medio libre de anclaje, la formación de colonias bajo estas condiciones puede ser empleada como un método para seleccionar CST-like. Existen actualmente dos potenciales marcadores proteicos de CST en CCR: CD133 y CD166, aunque hay aún evidencias contradictorias. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la expresión de las proteínas CEA, EGFR, CK20, CD133, CD166 y Ki67 en las colonias (células clonogénicas) como en las líneas celulares de origen HCT-116, DLD-1, CACO-2 y HT-29. Para ello se crecieron células en medio de cultivo con metilcelulosa 1,5% durante 7 días. Se observó que en las cuatro líneas analizadas la formación de colonias fue directamente proporcional a la cantidad de células plaqueadas. Las colonias fueron aisladas bajo microscopio de contraste de fases, y a partir de ellas se extrajo ARN total. Luego, por qRT-PCR se obtuvo en general una expresión significativamente mayor de los transcritos de Ki67, CD133 y CD166 en la línea de origen, con respecto a la colonia. Si bien aún resta evaluar la expresión proteica de los marcadores CD133 y CD166, estos Resultados no apoyarían a los mismos como candidatos de CST en el sistema de estudio. Finalmente, por inmunocitoquímica se determinaron los niveles de expresión de Ki67, CEA, EGFR y CK20 en células de las líneas de origen y en las colonias, observándose una expresión diferencial en algunos de ellos. La importancia del presente trabajo radica en la identificación de blancos moleculares en células clonogénicas contra los cuales podrían ir dirigidos nuevos agentes terapéuticos.

0427 (552) MODULACIÓN DE LAS POBLACIONES NKT I Y T REGULADORAS (TREG) DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA DURANTE LA EVOLUCIÓN DEL LINFOMA DE RATA L-TACB Y SU TRATAMIENTO CON CICLOFOSFAMIDA (CY). M.J.Rico¹, P.Matar¹, R.Giordano², O.G.Scharovsky¹

¹Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, UNR; ²Laboratorio Cibic <majorico@gmail.com>

Previamente demostramos que una dosis baja y única de Cy inhibe el desarrollo de metástasis e induce un cambio en el perfil de citoquinas de Th2 a Th1 y una disminución de las células T reguladoras innatas (CD4CD25Foxp3⁺) en ratas portadoras de L-TACB. Las células NKT coexpresan marcadores de células T y NK. Se han descrito dos poblaciones: NKT tipo I, que favorece la respuesta inmune antitumoral (RIA) y NKT II que suprime esta respuesta. Nuestro objetivo fue estudiar la población de células NKT I durante la evolución del linfoma L-TACB, su relación con las células Treg estudiadas en este modelo y su modulación por Cy. Se desafiaron ratas e singeneicas con el linfoma L-TACB s.c (día 0). En el día 14 los animales se distribuyeron en dos grupos: 1) Tratados: se inocularon con Cy vía i.p. (10 mg/kg de peso, dosis antimetastásica); 2) Testigos: se inocularon con solución fisiológica i.p. Se tomaron muestras de sangre periférica en los días 0, 7, 14 y 21, y se procesaron para la determinación por citometría de flujo de los marcadores linfocitarios CD161 y TCR. Se observó un aumento de las células NKT desde el día 0 al 7 (p<0,01). Este aumento coincide con el de las células CD4CD25Foxp3⁺ analizadas previamente. El porcentaje de las células NKT I en el día 14 disminuyó hasta el valor basal, a diferencia de las Treg que mantuvieron su valor. En el día 21, luego del tratamiento con Cy, las células NKT I no fueron moduladas mientras que las Treg retornaron al valor basal. Concluimos que durante las etapas tempranas del desarrollo tumoral (día 7) se observa una relación balanceada entre células CD4CD25Foxp3⁺ y NKT I, la que se modifica a favor de las Treg innatas (día 14), contribuyendo así al escape de la RIA y facilitando la progresión tumoral. El tratamiento con Cy, si bien modula negativamente las Tregs, no modifica las NKT I, las cuales no estarían involucradas en el efecto inmunomodulador antimetastásico de Cy.

ONCOLOGIA P3

0428 (42) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ACTINA Y E-CADHERINA INDUCIDOS POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA CON ALA EN CÉLULAS TUMORALES Y NORMALES. G.M.Di Venosa¹, L.Rodríguez¹, L.Mamone¹, A.Battle¹, A.Casas¹

¹Centro de Investigaciones Sobre Porphirinas y Porphirias (Cipyp), Conicet, Hospital de Clínicas Gral. José de San Martín <gabrieladivenosa@yahoo.com.ar>

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento antitumoral que se basa en la muerte celular luego de la aplicación de luz sobre células tumorales fotosensibilizadas. El ácido 5-aminolevulínico (ALA) se emplea como precursor de la Protoporfirina IX, que es un potente fotosensibilizador. Ha sido reportado que la TFD afecta la expresión de algunas proteínas de citoesqueleto como así también de otras involucradas en la adhesión celular. El objetivo de este trabajo es estudiar los cambios inducidos por la TFD con ALA sobre la expresión de actina y E-cadherina sobre una línea de mama normal y su contraparte transfectada con el oncogén H-Ras. Se emplearon la línea de epitelio mamario luminal normal HB4a, y su derivada HB4a-Ras, que es más resistente a la TFD que la parental. Luego de 1 h del tratamiento con ALA-TFD se observó un 15 ± 2 % de células vivas HB4a y un 30 ± 4% de HB4a-Ras, por tinción con azul Tripán y a ese mismo tiempo de observaron microscópicamente grandes alteraciones en la morfología celular. En cambio por el ensayo de MTT los valores más bajos de viabilidad se encuentran luego de 24 hs. Las células HB4a expresan un grueso anillo de actina cortical además de fibras de estrés ubicadas principalmente en la periferia celular, mientras que las células HB4a-Ras expresan actina en forma de agujas que protruyen desde la zona de actina cortical hacia el exterior, y además en forma de una fina malla en toda la célula. Luego de 24 hs de ALA-TFD, se vio en las HB4a sobrevivientes, una morfología similar a la de las HB4a-Ras, con reducción del anillo de actina cortical, mientras que en las HB4a el tratamiento indujo la formación de vesículas de actina superficiales. Por otra parte, la expresión de E-cadherina no sufrió cambios con el tratamiento. Los datos sugieren que en el presente modelo de células normales/tumorales, la TFD con ALA afecta el citoesqueleto de actina, independientemente de la resistencia al tratamiento, pero no afecta la adhesión célula-célula.

0429 (96) LA PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES BRCA1 REGULA SU PROPIA TRANSCRIPCIÓN A TRAVÉS DE UN MECANISMO MEDIADO POR LA VÍA DE RB/E2F1. P.De Luca¹, C.Moiola¹, G.Gueron¹, E.Vazquez¹, A.De Siervi¹

¹Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA, CONICET <paoladeluca81@yahoo.com.ar>

Las mutaciones germinales del gen BRCA1, un supresor de tumores, confieren un riesgo alto para el desarrollo del cáncer de mama, ovario y próstata. BRCA1 regula la respuesta al daño en el ADN, la progresión del ciclo celular, la apoptosis, la respuesta a hormonas esteroideas y el mantenimiento de la integridad genómica; sin embargo, se conoce muy poco acerca de la regulación transcripcional de BRCA1. En este trabajo determinamos que BRCA1 es el componente central en la regulación de su propio promotor. Utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y ensayo de genes reporteros, encontramos que BRCA1 se pega a su propio promotor en líneas celulares de cáncer de próstata (PC3) y de leucemia (Jurkat T) reprimiéndolo. Sin embargo, luego del tratamiento con agentes genotóxicos (UV o doxorubicina) BRCA1 se libera activando su propia transcripción y regulando otros genes importantes en la respuesta al daño en el ADN. Considerando que la proteína BRCA1 es una proteína coreguladora que no se une directamente al ADN sino a través de otros factores de transcripción, investigamos algunos componentes de la vía de Rb como posibles vínculos entre BRCA1 y su

propio promotor. Determinamos que el factor de transcripción E2F1 se mantiene unido al promotor de BRCA1 antes o después de la exposición a agentes genotóxicos, sin embargo la proteína Rb interacciona en ambas condiciones con la proteína BRCA1. Esto sugiere que BRCA1 se une y autorregula su propio promotor a través de las proteínas E2F1 y Rb. Estos hallazgos muestran un nuevo modo de regulación de la transcripción en respuesta al daño en el ADN en células tumorales que involucra la asociación de dos proteínas claves en el desarrollo tumoral. El esclarecimiento de este mecanismo facilitará el diseño de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

0430 (139) FACTORES SOLUBLES Y NO SOLUBLES PRESENTES EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DIFERENCIACIÓN ESTROMAL REGULAN DE MANERA DIFERENCIAL EL CRECIMIENTO Y LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS NORMALES Y TUMORALES.

*V Pistone Creydt*¹, *P A Sacca*¹, *J C Calvo*^{1,2}

¹Laboratorio de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET; ²Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA <vpistonec@yahoo.com>

El estroma es fundamental como soporte y regula el crecimiento de células epiteliales. El objetivo fue evaluar el efecto de factores solubles y no solubles de diferentes estadios de diferenciación estromal sobre la regulación del crecimiento y de la migración de líneas celulares epiteliales murinas normales (NMuMG) y tumorales (LM3). NMuMG y LM3 se crecieron sobre plástico o células 3T3-L1 (modelo estromal mamario) irradiadas en diferentes estadios de diferenciación (soporte estromal, SE) y se incubaron en presencia o ausencia de diferentes medios condicionados (MC). Los diferentes SE y MC fueron: preadipocitos 3T3-L1; poco diferenciado (Poco dif); y diferenciado a adipocitos (Dif). La proliferación se cuantificó por MTS y la migración por cicatrización de herida. La proliferación de NMuMG y LM3 sobre los tres SE aumentó luego de 24h y 48h de incubación respecto al control ($p < 0,05$). Cuando NMuMG se incubaron sobre los SE en presencia de MC de 3T3-L1 preadipocitos, Poco dif y Dif durante 24h se potenció la proliferación respecto al control ($p < 0,05$). En las mismas condiciones de crecimiento, la proliferación de LM3 no se modificó significativamente. Los tres MC de 3T3-L1 aumentaron la migración de LM3 ya que la herida se cerró en un $75 \pm 3\%$ (preadipocitos); $53 \pm 4\%$ (Poco dif) y $39 \pm 4\%$ (Dif) luego de 6h de incubación ($p < 0,05$). Cuando las LM3 se cultivaron sobre los tres SE solo hubo migración sobre el SE de preadipocitos ($33 \pm 3\%$, $p < 0,05$). No se observó migración de NMuMG cuando se cultivaron sobre los SE o cuando se incubaron con los MC. Podemos concluir que tanto los diferentes estadios de diferenciación del SE como los factores presentes en dichos soportes y los factores solubles regulan de manera diferencial la proliferación y migración de células mamarias normales y tumorales. Presentamos un modelo experimental que permite mantener las características del entorno fisiológico de las células epiteliales mamarias, tanto por los factores como por la estructura estromal *per se*.

0431 (177) EXPRESIÓN DE ESFINGOSINA QUINASA-1 EN CARCINOMA CELULAR ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO Y SU CORRELACIÓN CON EL TIEMPO DE SOBREVIVENCIA.

*C A Lang*¹, *M E Fermento*¹, *N A Gandini*¹, *H V Maturi*², *N B Sterin-Speziale*³, *V Patel*⁴, *S J Gutkind*⁴, *A C Curino*¹, *M M Facchinetti*¹

¹Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca, INIBIBB-CONICET; ²Laboratorio de Anátomo Histología, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca; ³Laboratorio de Biología Celular e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires; ⁴Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA <celang1981@hotmail.com>

La esfingosina quinasa-1 (SK-1) es una enzima clave del metabolismo de los esfingolípidos. Estudios recientes involucran a esta enzima en la tumorigénesis, aunque pocos trabajos han analizado su expresión en tumores humanos, y no hay registros de su expresión en carcinomas celulares escamosos de cabeza y cuello (HNSCC). Por ello, el objetivo de este estudio fue investigar la expresión de SK-1 en estos tumores y correlacionarla con parámetros clínicos. Se analizaron por inmunohistoquímica dos microarreglos de tejido conteniendo 246 muestras de HNSCC. El 45% de los tumores resultaron positivos para SK-1. No se hallaron correlaciones significativas entre la expresión de SK-1 y el grado de diferenciación ($P = 0.15$), el sitio primario del tumor ($P = 0.23$) o el país de origen ($P = 0.10$) (Test Chi Cuadrado y Mann-Whitney). En cambio sí se encontró correlación entre expresión positiva de SK-1 y menor tiempo de supervivencia ($P = 0.001$, Kaplan-Meier, Log Rank test) con diferencias significativas entre el tiempo medio de supervivencia correspondiente a los tumores SK-1 positivos y los negativos ($P = 0.02$). También se estudió la expresión de la enzima en 37 biopsias quirúrgicas incluidas en parafina detectándose expresión en el 48% de los tumores. La expresión estaba restringida casi totalmente a las células neoplásicas y fue prácticamente indetectable en las células del estroma tumoral. Este resultado fue confirmado por detección de ARNm mediante microdissección con captura láser y RT-PCR. Sorprendentemente algunas células mostraron expresión nuclear. En conclusión, SK-1 se expresa en aproximadamente la mitad de los HNSCC (45-48%) investigados y dicha expresión se limita a las células epiteliales del tumor. Además, la expresión de la enzima se correlaciona con el tiempo de supervivencia de los pacientes. Este resultado podría deberse al hecho que SK-1 disminuye la concentración de ceramida (pro-apoptótica) e incrementa la de esfingosina 1 fosfato (anti-apoptótica y pro-proliferativa).

0432 (180) ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN, EXPRESIÓN DE MART-1 Y GP100 E INFILTRADOS LINFOCITARIOS EN SUBPOBLACIONES CELULARES EN MELANOMAS PRIMARIOS.

*M Rodríguez Zubieta*¹, *M Colombo*¹, *J Mordoh*^{1,2}, *A I Bravo*³

¹Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina; ²Centro de Investigaciones Oncológicas – FUCA, Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina.; ³HIGA Eva Perón, San Martín, Prov. Buenos Aires, Argentina. <mrodriguez@leloir.org.ar>

Numerosas inmunoterapias para melanoma están dirigidas contra los antígenos (Ags) MART-1 y gp100, presentados en el contexto del haplotipo HLA-A*0201. La falta de remisión completa podría deberse a la ausencia de expresión de estos Ags en células tumorales, más aún si estas células tuviesen una ventaja proliferativa. Para este estudio, se analizó en ocho biopsias de tumores primarios la variabilidad en la expresión de MART-1 y gp100, la presencia de subpoblaciones con ventajas proliferativas, y la correlación entre la expresión de Ags e infiltrados linfocitarios. Se realizó inmunohistoquímica (IHQ) para MART-1 y gp100 y el marcador de proliferación Ki-67. Se estudió la presencia de linfocitos por tinción hematoxilina-eosina y por IHQ para CD3, CD8 y CD20. Debido a que se obtuvieron Resultados muy heterogéneos aún dentro del mismo tumor, se realizó un análisis detallado de las biopsias, delimitando áreas con diferencias cualitativas para lograr conteos representativos. Se detectó HLA-A*0201 en mononucleares de sangre periférica de 7/8 pacientes. Se encontró heterogeneidad en la expresión de Ags y en los niveles de proliferación dentro de las biopsias. En promedio, se observó $40.6 \pm 21.9\%$ de células MART-1/gp100 negativas y $59.4 \pm 21.9\%$ de positivas. Las células proliferantes variaron entre 1.6% a 47.6% de las células MART-1/gp100 negativas y de 5.8% a 22.4% de las positivas. Los infiltrados linfocitarios se localizaron preferentemente en la periferia de las áreas identificadas. La presencia de infiltrados linfocitarios intensos no se asoció al haplotipo HLA-A*0201. Demostramos en melanomas primarios la presencia de poblaciones negativas para Ags que poseen un nivel de proliferación similar a la población positiva. Previo al uso

de terapias dirigidas contra Ags asociados a melanoma, debería cuantificarse la presencia de dichos Ags en los tumores, ya que la existencia de poblaciones Ag-negativas en cantidad significativa podría determinar fracasos en los tratamientos.

0433 (249) AISLAMIENTO DE CÉLULAS ESTROMALES DE TEJIDO DE MAMA HUMANO Y DIFERENCIACIÓN A ADIPOCITOS. OBTENCIÓN DE SOPORTES ESTROMALES Y REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS NORMALES Y TUMORALES CRECIDAS SOBRE ELLOS. V Pistone Creydt¹, P A Sacca¹, J C Calvo^{1,2}

¹Laboratorio de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET; ²Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA <vpistonec@yahoo.com>

Las células estromales afectan el crecimiento y la capacidad metastásica de células tumorales. Los adipocitos son el tipo de células estromales predominantes en tejido mamario y regulan caminos metabólicos. El objetivo fue obtener cultivos primarios de células estromales de tejido adiposo normal de mama humano (CEMH), ensayar diferentes protocolos de diferenciación a adipocitos y evaluar la regulación de dichos soportes estromales sobre la proliferación de líneas celulares epiteliales normales (NMuMG, murina) y tumorales (LM3, murina; T47D humana). Obtuvimos CEMH de tejido de mama de pacientes que fueron operados por razones estéticas (consentimiento informado). Ensayamos varios protocolos de diferenciación a adipocitos y demostramos que incubando CEMH al 100% de confluencia por 3 días con 1*μ*M dexametasona y 500*μ*M MIX, seguidos por 7 días de incubación con 1*μ*M biotina y 2*μ*M insulina, las células se diferenciaron a adipocitos en un 70% respecto al control (CEMH 75% de confluencia, $p < 0,05$). Cuantificamos la cantidad de lípidos acumulados en adipocitos por tinción con Red Oil a DO_{490nm}. Luego evaluamos el efecto de los soportes estromales de CEMH sobre la proliferación de NMuMG, LM3 y T47D, por MTS. CEMH crecidas a 75% de confluencia o diferenciadas se irradiaron y sobre ellas se hicieron crecer las líneas epiteliales. A las 24h, la proliferación de las tres líneas celulares creciendo sobre CEMH 75% aumentó respecto al control ($p < 0,05$); mientras que sobre CEMH diferenciadas, solamente NMuMG mostró un aumento significativo ($p < 0,05$). Sin embargo, a las 48h las tres líneas celulares aumentaron su proliferación al crecer sobre este último soporte. Establecimos las condiciones para el mantenimiento y diferenciación a adipocitos de CEMH. Además, diferentes estadios de CEMH modularon diferencialmente el crecimiento de las células epiteliales. Presentamos un modelo que nos permitirá estudiar la interacción matriz-epitelio a partir de células estromales y/o epiteliales humanas.

0434 (308) INFLUENCIA DE LA CONFIGURACIÓN ESPACIAL DE CULTIVOS DERIVADOS DE MELANOMA ESPONTÁNEO CANINO SOBRE LA RESPUESTA A LA LIPOFECCIÓN CON GEN SUICIDA Y DE INTERFERÓN BETA. M L Gil Cardeza¹, M S Villaverde¹, G C Glikin¹, L M E Finocchiaro¹

¹Unidad de Transferencia Genética, Área Investigación, Hospital de Oncología <lourgilcardeza@hotmail.com>

Para validar el uso de esféroides como modelo predictivo de la respuesta tumoral *in vivo* se comparó la sensibilidad a la terapia génica de monocapas (2D) y esféroides (3D) de 13 líneas celulares (de altos y bajos repiques) derivadas de melanoma espontáneo canino (Ak, Bk, Br, Bt, Cl, Ds, Fk, Kg, Ll, Rd, Rk II, Sc, Tk). Inmediatamente después de la cirugía, los tumores fueron disgregados enzimática y/o mecánicamente y los explantos obtenidos fueron cultivados manteniendo una heterogeneidad celular similar a la original. Mediante MTS se ensayó la viabilidad celular a la lipofección con el gen interferón beta canino (cIFN-B) o con el gen suicida timidina kinasa del virus herpes simplex (HSVtk) seguida

por el agregado de concentraciones crecientes de la pro-droga ganciclovir (GCV: 0,01 a 1000 μ g/ml). Cuando las células fueron cultivadas en monocapa, 6 de 13 líneas (Ak, Bk, Kg, Rk II, Sc y Tk) mostraron valores de supervivencia (VS) (día 5) al sistema HSVtk/GCV menores al 50% para la dosis 10 μ g/ml GCV (respecto a B-Gal y 10 μ g/ml GCV); mientras que mediante la lipofección con el gen cIFN-B sólo 2 de 11 líneas (Ak y Rk II) lo hicieron. Cultivadas como esféroides, las células lipofectadas tanto con HSVtk como con cIFN-B no presentaron VS (día 12) menores al 50% debido al fenómeno de resistencia multicelular (MCR), sin embargo respondieron en similar medida a ambos tratamientos. Se encontraron 7 de 13 líneas dentro del rango VS entre 50 y 80% para el sistema HSVtk/10 μ g/ml GCV y 6 de 11 dentro del mismo rango para la lipofección del gen cIFN-B. Se determinó el índice MCR (iMCR) cómo: (% supervivencia 3D - % supervivencia 2D) / % supervivencia 2D. El iMCR resultó inversamente proporcional al % supervivencia 2D, probablemente debido al denominado "efecto de recrecimiento" descripto para tumores *in vivo*, donde, al morir las células de las capas externas del tumor, las células quiescentes de capas intermedias quedan expuestas y comienzan a dividirse "repopulando" el tumor.

0435 (320) ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DEL ONCOGEN RSPO3 EN GLÁNDULA MAMARIA. PARTICIPACIÓN LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN RUNX1 Y FOXP3. E Grasso¹, M N Kimberlin¹, L Castilla², E Kordon¹, N Rubinstein¹

¹LEGMA IFIBYNE; ²UMASS USA <narubinstein@yahoo.com>

Nuestro laboratorio estudia la actividad y regulación de un nuevo oncogen, RSPO3, el cual es capaz de inducir tumorigénesis mamaria. El análisis de la secuencia promotora de RSPO3 reveló la presencia de sitios putativos de unión para el factor de transcripción RUNX1 y la ausencia de sitios consenso para FOXP3. Se ha demostrado que mientras el primero juega un rol fundamental en el desarrollo de leucemias, el segundo actúa como supresor de tumores de mama al inhibir directamente la expresión de determinados oncogenes. Por otro lado, se ha reportado que FOXP3 inhibe la actividad de RUNX1 a través del contacto proteína-proteína. A partir de estos datos, nuestro objetivo fue determinar la participación de los factores de transcripción RUNX1 y FOXP3 en la regulación RSPO3 en células epiteliales mamarias murinas. Elegimos SCP2 como línea de mama normal y LM3 como línea de mama tumoral. Por RT-PCR, hallamos que LM3 expresa niveles de RSPO3 significativamente más altos que SCP2. A continuación, se realizaron ensayos de cambios de movilidad electroforética (EMSA) utilizando extractos nucleares de SCP2 y LM3 y una sonda correspondiente a un fragmento de la región promotora de RSPO3 conteniendo un sitio consenso para RUNX. Este análisis reveló un significativo retardo de la sonda radioactiva que fue más intenso en presencia de los extractos nucleares de LM3. Asimismo esta movilidad fue alterada por la co-incubación con un anticuerpo anti-RUNX1 lo que sugiere que la unión de esta proteína es la responsable de las diferencias observadas entre LM3 y SCP2. Por otro lado, análisis de RT-PCR y de Western blot revelaron que los niveles de mRNA y proteína de RUNX1 eran similares en ambas líneas celulares mientras que los niveles de Foxp3 fueron significativamente más altos en SCP2. Estos datos sugieren que en células tumorales mamarias la expresión de RSPO3 podría ser regulada por Foxp3 a través de su capacidad de modular la actividad transcripcional de RUNX1.

0436 (326) POLIMORFISMO 72-P53 COMO FACTOR DE RIESGO EN PACIENTES CON CARCINOMA DE CUELLO UTERINO INDUCIDO POR VPH. L C Girgulskey¹, J E Mauro², S Shayo², F Basilio², K Eiguchi¹

¹Cátedra de Bioquímica e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador; ²Servicio de Tocoginecología, Hospital Municipal Carlos G Durand <lgirgulskey@yahoo.com.ar>

Introducción: La proteína p53 es un oncosupresor que ha sido involucrado en el desarrollo de cáncer de distintos orígenes, sin embargo, su correlación con el desarrollo de cáncer cervical (CC) permanece controvertido. En el codón 72 del gen p53 emerge un polimorfismo que determina dos variantes, arginina (A) o prolina (P). Se ha sugerido que las mujeres homocigotas AA son hasta 7 veces más susceptibles a desarrollar cáncer cervical inducido por VPH, ya que éste alelo es más eficiente al inducir apoptosis y es la variante degradada con mayor facilidad por el oncogen viral E6. **Objetivo:** Estudiar la relación entre el polimorfismo del gen p53 y susceptibilidad a desarrollo de CC. **Metodología:** Se estudiaron muestras CIN I (G2 n=17), CIN II/III (G3 n=21), CC (G3 n=32) y muestras control (G1 n=17) derivadas del Htal. Municip. Durand. Se realizó diagnóstico histopatológico, determinación de genoma viral y genotipo p53. **Resultados:** observamos ADN viral en 15% G1, 65% G2, 89% G3 y 97% G4. Sin discriminar por grado de lesión observamos una alta frecuencia p53-AA en comparación con los genotipos AP y PP (0.68:0.23:0.09 p<0.01); ésta tendencia se mantuvo al tener en cuenta el grado de lesión, aunque no observamos diferencias significativas entre grupos. Al analizar los genotipos p53 en las lesiones positivas para ADN viral, observamos frecuencias alélicas AA G1:0.66, G2:0.40, G3:0.66, G4:0.50, y AP/PP de G1:0.33; G2:0.31, G3:0.18, G4:0.28. **CONCLUSIONES:** La frecuencia de infección con VPH se correlaciona con el grado de lesión analizada. La mayor frecuencia del alelo AA se correlaciona con la población analizada (75% Argentina y 25% países limítrofes). Sin embargo, no pudimos observar diferencias significativas entre las frecuencias AA y AP/PP por comparación entre grado de lesión o entre lesiones positivas para genoma VPH. Nuestros Resultados sugieren que la homocigosis AA del codón 72 gen p53 no se correlacionaría con el desarrollo de CC en la población analizada.

0437 (331) RELACIÓN ENTRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR Y LA REPLICACIÓN VIRAL EN NEOPLASIAS DE FOLÍCULO PILOSO INDUCIDAS POR EL VIRUS POLIOMA EN EL RATÓN. S Simula¹, A Aprile¹, N Sanjuan¹

¹DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, UBA <nasanjuan@gmail.com>

En una comunicación previa habíamos reportado que el virus Polioma murino puede inducir Pilomatrixomas en los cuales también replica. El objeto de este trabajo fue estudiar la localización de esos virus infectivos dentro de cada neoplasia y su relación con el grado de diferenciación de las células tumorales. Se inoculó 10⁵ UFP de Polioma A2 en ratones neonatos C3H BiDa y se diseccionaron 20 tumores a los 70 días post-infección, que fueron procesados rutinariamente para su inclusión en parafina. La presencia de virus completos se estudió por inmunomarcación de la proteína mayor de la cápside viral (VP-1) en cortes parafinados y se complementó con observaciones ultraestructurales. La proliferación celular se evaluó por inmunomarcación del antígeno PCNA en cortes adyacentes a los utilizados para la detección de VP-1. En las 20 neoplasias estudiadas se obtuvieron los mismos Resultados. Estos consistieron en la detección de PCNA en los núcleos de las células matriciales basaloides, que se fue negativizando progresivamente a medida que dichas células se transformaban en "células fantasma". Por el contrario, la presencia de VP-1 fue exactamente inversa: no era detectable en las células matriciales basaloides y sí lo era en las células tumorales más diferenciadas. Esto último fue confirmado por la observación ultraestructural de partículas virales. Se concluye que en estas neoplasias el virus va adquiriendo posibilidades de replicación a medida que avanza la queratinización celular, lo que indica que la expresión de los genes estructurales del virus está regulada por factores celulares. Es interesante destacar que en este modelo experimental Polioma se comporta de manera similar a lo que ocurre con el virus Papiloma Humano.

0438 (422) LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS REQUIEREN CÉLULAS ADICIONALES DE MÉDULA ÓSEA PARA CONSTI-

TUIR VACUNAS EFICIENTES CONTRA EL MELANOMA MURINO B16. J Mallerman¹, S Mac Keon¹, S Gazzaniga¹, J Mordoh², R Wainstok¹

¹Dep. de Quim. Biol, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; ²Fundación Instituto Leloir - IIBBA - CONICET <julimallerman@hotmail.com>

Se demostró que la vacunación con células dendríticas (CD) provenientes de médula ósea cargadas con células tumorales apoptóticas (CD/Apo) en ratones singéneos induce inmunidad a largo plazo contra el melanoma murino B16, dependiente de la acción combinada de linfocitos T CD4+ y CD8+ (J. Immunol. 2003; 171, 5940). Continuando con este trabajo, nuestro propósito fue evaluar si las CD son las responsables exclusivas de la protección, o si participan otras células de la médula ósea. Para ello, a partir de CDs inmaduras de 7 días de cultivo con GM-CSF se aislaron por selección positiva las CD CD11c+ y/o mPDCA+, utilizando columnas con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec). Del total de CDs obtenidas, las aisladas por selección positiva constituyeron 47 ± 11 %. Luego de la selección las células adheridas a la columna (CD+) y las eluidas (CD-) fueron caracterizadas a través de los marcadores CD11c, F480, CD14, CD80, CD86 y CD8a, observándose mayor expresión en las células adheridas. Las fracciones CD+ y CD- fueron cocultivadas con células apoptóticas de melanoma B16, originando vacunas CD+/Apo y CD-/Apo, respectivamente. Se inmunizaron s.c. tres grupos de 10 ratones cada uno con 4 dosis semanales de 2x10⁵ CD/Apo, CD+/Apo o CD-/Apo, y un grupo control recibió PBS. A la quinta semana se realizó el desafío con 13.000 células B16 viables. En todos los animales vacunados se observó un significativo retraso temporal en la aparición de tumores respecto del grupo control. La protección obtenida luego de 75 días fue: 50% CD/Apo, 20% CD-/Apo y 0% CD+/Apo y PBS, siendo la protección alcanzada sólo significativa con la vacuna CD/Apo (p=0,012). Se concluye que para obtener mayor protección antitumoral se requiere interacción entre las CD y otras células provenientes de médula ósea.

0439 (446) DISTRIBUCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS MOLECULARES DE UN COMPUESTO PEPTÍDICO INHIBIDOR DE LA CASEÍNA KINASA 2 (CK2) EN CÉLULAS TRANSFORMADAS POR PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV). F R Benavent Acero¹, Y Perera², B Acevedo², D E Gomez¹, D F Alonso¹, S E Perea², H G Farina¹

¹Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina; ²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba <ferbenavent@gmail.com>

La enzima CK2 es una serina-treonina quinasa implicada en múltiples funciones celulares, como así también en transformación y tumorigénesis. Si bien se desconocen los blancos moleculares precisos, una actividad elevada de CK2 ha sido asociada a transformación maligna y agresividad tumoral. Esta enzima es capaz de activar a la oncoproteína E7 en células infectadas con HPV. Debido a esto, CK2 se ha convertido en un blanco terapéutico novedoso para el tratamiento del cáncer. Previamente demostramos la actividad antitumoral del péptido CIGB-300 (P15-Tat) mediante su aplicación intralesional en tumores subcutáneos inducidos por células HeLa de carcinoma cérvicouterino humano en ratones atímicos. El compuesto fue diseñado para unirse específicamente a la enzima CK2 e inhibir su actividad. En este trabajo, investigamos el posible mecanismo de acción del CIGB-300, su biodistribución locorregional en el mismo modelo xenogénico y la inducción de apoptosis. Utilizando una variante peptídica unida a biotina y revelando con fluoresceína-estreptavidina, identificamos la presencia del compuesto en el tumor y ganglios linfáticos luego de una única dosis intralesional de 8 mg/kg. Se observó una marcación intensa hasta 12 h post-administración y la señal permaneció visible durante 24 h. Secciones de tumor derivadas de animales tratados con 5 dosis diarias de 40 mg/Kg evidenciaron un fuerte incremento de la apoptosis, detectada por la

técnica de TUNEL. Se estudió también la localización subcelular del CIGB-300 y la enzima CK2 sobre monocapas de células HeLa. Mediante microscopía confocal se identificó al compartimiento nucleolar como el principal sitio de acumulación intracelular del péptido, interactuando principalmente con B23/nucleofosmina, una proteína encargada de la biogénesis ribosomal que es fosforilada y activada por CK2. Los Resultados preclínicos obtenidos sugieren la potencial utilidad terapéutica del compuesto CIGB-300 en lesiones y tumores inducidos por HPV.

0440 (480) LA PROTEÍNA L DE PEPTOSTREPTOCOCCUS MAGNUS, UN SUPERANTÍGENO B, INDUCE LA APOPTOSIS DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA DAUDI, DERIVADA DE UN LINFOMA DE BURKITT. D Lorenzo¹, J Mundiñano¹, I Nepomnaschy¹, I Piazzon¹

¹ILEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina de Bs As <ldanu@hotmail.com>

Los superantígenos B (SAGs) son proteínas de origen viral o bacteriano que a diferencia de los antígenos convencionales son capaces de estimular a un alto número de linfocitos B ya que interactúan con las regiones constantes del receptor para el antígeno (BCR). Esta interacción genera la disminución de la expresión del BCR y la posterior apoptosis de las células B. La proteína L de *Peptostreptococcus magnus* (PpL) es un SAG B capaz de interactuar con los linfocitos B normales que expresen en su BCR la cadena liviana k. En nuestro laboratorio hemos demostrado que PpL es capaz de inducir la apoptosis de linfomas B murinos. En el presente trabajo se utilizó la línea celular humana Daudi, derivada de un linfoma de Burkitt, que expresa la cadena liviana k. Se realizaron cultivos a 48 h con diferentes dosis de PpL y se utilizaron los controles habituales con OVA. Se determinó por citometría de flujo (FACS), mediante la marcación con iodo de propidio (IP), que PpL es capaz de inducir hipodiploidía en las células Daudi en forma dosis dependiente (media±DS) PpL 50ug/ml: 8.7±0.1; PpL 100ug/ml: 20.7±0.6; PpL 150ug/ml: 68.3±9.7; PpL 200ug/ml: 87.6±1.2; OVA 50 ug/ml: 7.4±0.3; OVA 100ug/ml: 7.1±0.5; OVA 150ug/ml: 7.6±1.6; OVA 200ug/ml: 9.6±0.8; PBS: 6.7±0.6. Se determinó por FACS que PpL genera la disminución en la media de intensidad de fluorescencia del BCR (p<0,05). Para comenzar a evaluar la posible vía de apoptosis mediada por PpL se determinó por FACS el nivel de despolarización mitocondrial mediante la marcación con el colorante 3,3'-diitiloxocarbocianina, DiOC₂(3). Se obtuvieron aumentos significativos en el porcentaje de células DiOC₂(3)^{low} (media±DS) PpL: 53.0±6.1; OVA: 16.3±1.5; PBS: 14.1±0.7, (p<0.001). En el mismo ensayo se realizó la marcación con IP y se obtuvieron porcentajes de hipodiploidía similares a los porcentajes de células DiOC₂(3)^{low}. Estos Resultados sugieren que PpL es capaz de inducir apoptosis en las células Daudi estando la vía mitocondrial involucrada.

0441 (630) PARÁMETROS RADIOBIOLÓGICOS DE LA LÍNEA DE CARCINOMA PANCREÁTICO PANC-1: EFECTO DE LA HISTAMINA. N A Mohamad¹, G Cricco¹, S Saez¹, E Valli¹, A Gutiérrez¹, G Martín¹

¹Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires <noramohamad@argentina.com>

El cáncer pancreático no resecable puede tratarse con radioterapia, también usada como paliativa del dolor. Hemos demostrado que la histamina (HA) modula la proliferación de la línea de carcinoma pancreático humano Panc-1, la radiosensibilidad de células de carcinoma mamario humano y media el efecto del óxido nítrico (NO) sobre la proliferación de células Panc-1. El objetivo de este trabajo fue evaluar la potencial acción radioensibilizante de la HA sobre las células Panc-1 y el rol de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ROS-NOS) como mediadores de su efecto. Se estudió la acción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

sobre la proliferación de cultivos no irradiados mediante el ensayo clonogénico. Se observó un efecto antiproliferativo dosis dependiente, revertido por catalasa. Asimismo se observó por citometría de flujo con un colorante fluorescente específico un significativo aumento de los niveles intracelulares de H₂O₂ por HA. Para caracterizar la respuesta radiobiológica de las células se irradiaron cultivos control y tratados con HA con dosis de 0 a 10 Gy. Se realizaron curvas de sobrevida mediante ensayo clonogénico y se determinaron los parámetros de radiosensibilidad alfa, beta, relación alfa/beta y fracción de sobrevida a 2 Gy. Los mismos no fueron modificados por HA. Se determinó el efecto de la irradiación sobre los niveles intracelulares de H₂O₂ y NO por citometría de flujo con colorantes fluorescentes específicos. La irradiación aumentó su concentración. Sin embargo, pocos minutos después los niveles disminuyeron por debajo de los basales sin irradiar. Estas significativas respuestas no se afectaron por HA. Los Resultados muestran que la HA no afecta la radiosensibilidad de las células Panc-1 aunque regula la proliferación y el metabolismo de H₂O₂ y NO, sugiriendo que la radiación ionizante activa mecanismos celulares que involucran la disminución de los niveles de especies reactivas no siendo la HA capaz de contrarrestarlos.

0442 (639) INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DEL PROMOTOR DE IL-10 (-1082A/G) EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS VISCERALES EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO. E M Levy¹, E M von Euw¹, M Bianchini¹, M Aris², J M Arriaga¹, G Sycz¹, J Mordoh^{1,3,4}, M M Barrio¹

¹Centro de Investigaciones Oncológicas (CIO-FUCA); ²Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET; ³Instituto Médico Especializado Alexander Fleming; ⁴Fundación Instituto Leloir IIBBA-CONICET <estrellamlevy@yahoo.com.ar>

La incidencia del melanoma está en aumento, constituyendo en la actualidad el 4% de la totalidad de los tumores tanto en mujeres como en hombres. Cuando la enfermedad presenta metástasis viscerales el pronóstico clínico es pobre. Recientemente se ha comenzado a analizar la influencia de polimorfismos en los promotores de diversas citoquinas (IL-10, IL-6 e IFN-γ) en la susceptibilidad y/o progresión tumoral en cánceres humanos. Un polimorfismo en el promotor de IL-10 presenta los genotipos AA, AG y GG relacionados con baja, intermedia y alta secreción de la citoquina, respectivamente. La IL-10 posee un efecto dual ya sea anti-inflamatorio suprimiendo la maduración y migración de las células presentadoras de antígeno, o activador de efectores de la inmunidad innata como las células NK. En el presente estudio el objetivo fue analizar el polimorfismo (-1082A?G) en una población de pacientes con melanoma y correlacionar los genotipos con la progresión de la enfermedad. La determinación del genotipo se realizó por medio de PCR-RFLP a partir de DNA genómico de 46 pacientes utilizando primers específicos para un fragmento de 198 pb. El amplicón se digirió con la enzima MnlI que reconoce un sitio de corte para el genotipo AA y dos para el GG. Las frecuencias genotípicas fueron: GG 15%, AG 43.5% y AA 41.5%, ajustándose a las esperadas por Hardy-Weinberg (χ², p>0.05). Con un seguimiento medio de 71 ± 45.8 meses, los pacientes con el genotipo GG presentaron mayor proporción de metástasis viscerales (86%) que los AG (50%) y los AA (26%), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (χ², p<0.01). Asimismo, el tiempo a la progresión de estadio III a IV, fue menor para el genotipo GG sin alcanzar la significación estadística (p>0.05). Concluimos que el genotipo GG (alta producción de IL-10) se relaciona con mayor probabilidad de desarrollo de metástasis que comprometen órganos vitales y podría ser considerado como indicador de mayor agresividad de la enfermedad.

0443 (655) ESTUDIO DE CARCINOMAS ESPONTÁNEOS EN DOS LÍNEAS DE RATONES CON DISTINTA SUSCEPTIBILIDAD A LA CARCINOGENESIS ESPONTÁNEA DE

MAMA. C Suárez¹, G Piñero¹, E Roggero¹, L Hinrichsen^{1,2}

¹Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, U.N.R.; ²CIC-UNR <lhinrich@unr.edu.ar>

La comprensión de la base genética de la enfermedad humana es uno de los mayores desafíos de la investigación biomédica. El uso del modelo animal adecuado evita muchas de las dificultades inherentes a los estudios realizados en humanos, teniendo los modelos espontáneos la ventaja de posibilitar el estudio de la interacción entre múltiples genes propia de la enfermedad humana compleja. En humanos, la heterogeneidad genética y la enorme variación en la exposición a agentes medioambientales hace difícil identificar loci de susceptibilidad al cáncer; las líneas endocriadas ofrecen un modelo apto para reconocer estos loci. El objetivo de este trabajo fue analizar, en hembras de dos líneas endocriadas de la colonia CBI-IGE con distinta susceptibilidad a la carcinogénesis espontánea de mama, el desarrollo de otros tumores espontáneos, principalmente hígado y pulmón. La línea CBI+, *susceptible*, desarrolla tumor de mama antes de los 360 días de edad (mediana 243) con una incidencia alta (99.9%), y posee una variante del MMTV exógeno; CBI/C es *resistente* (mediana 504; incidencia 25.0%) y no posee MMTV exógeno. Los animales (n=26 por línea) se sacrificaron por sobre-exposición al éter cuando se observó deterioro físico; se tomaron muestras de pulmón, hígado, riñón y bazo que se procesaron con técnicas estándar para realizar el diagnóstico histopatológico. Las diferencias en la proporción de animales con tumor se analizaron con la prueba de Fisher. La línea CBI/C presentó un porcentaje alto de tumores espontáneos en hígado (16.7%) y pulmón (30.8%), mientras que la línea CBI+ mostró una incidencia baja de hepatocarcinomas (3%) y tumores pulmonares (5.7%) (p=0.012). Se han descrito loci de susceptibilidad como de resistencia a la carcinogénesis pulmonar; la interacción entre ellos determina el fenotipo del huésped. La línea CBI/C sería un aporte interesante para el análisis de dichos genes y/o sus interacciones, ya que el número de modelos murinos de cáncer de pulmón es escaso.

PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR O1

0444 (46) ANALISIS IN-VITRO DE SCAFFOLDS DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES CONTENIENDO VIDRIOS. J M

Fernandez¹, M Molinuevo², A Boccaccini³, M Cortizo¹, A Cortizo²

¹INIFTA, CCT La Plata, UNLP-CONICET; ²Bioquímica Patológica, Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP, La Plata; ³Departamento de Materiales, Imperial College London, Prince Consort Road, London SW7 2AZ, UK; ⁴INIFTA, CCT La Plata-UNLP-CONICET <jmfernandez@inifta.unlp.edu.ar>

La ingeniería de tejidos requiere el uso de scaffolds que sirven de matrices para la adhesión, crecimiento y diferenciación de las células, *in vitro* e *in vivo*. Estos scaffolds realizados con biomateriales, generalmente sustancias poliméricas de diversos orígenes, son reabsorbidos y reemplazados por matriz extracelular. Para el caso del tejido óseo, se requiere que el material posea cierta tenacidad así como también resistencia mecánica, para soportar los esfuerzos mecánicos que le imprimen los músculos. Hemos demostrado que scaffolds obtenidos a partir de poliésteres (poli-b-propiolactona (PPL) y poli-e-caprolactona (PCL)) y polifumaratos (polifumarato de diisopropilo (PFIP)) permiten el desarrollo y diferenciación de osteoblastos en cultivo y pueden ser degradados por células del tejido óseo. Para la mejora de las propiedades biomecánicas, suelen asociarse polímeros sintéticos y materiales inorgánicos (hidroxiapatita, vidrios, etc). Para ello, hemos sintetizado matrices de PPL, PCL y PFIP conteniendo partículas de vidrio bioactivo (Bioglass®) por el método de casting. La

proporción de vidrio bioactivo fue de 20% para los poliésteres y de 5% para el PFIP. Las características superficiales de las membranas, determinadas por microscopía electrónica de barrido, muestran que la adición de bioglass incrementa la rugosidad superficial de las membranas. Los ensayos de biocompatibilidad incluyen estudios de morfología (tinción con Giemsa), crecimiento (contenido de proteínas totales, Bradford) y diferenciación (colágeno y fosfatasa alcalina (FAL)) de osteoblastos UMR106 en cultivo, empleando como control platos plásticos de cultivo tisular. Encontramos que las células presentan una morfología normal y son capaces de proliferar en las membranas (PPL: 101±5; PCL: 122±1; PFIP: 94±9; Plástico: 100±16). Los osteoblastos presentaron niveles de actividad de FAL y colágeno comparables al control. Así, estos polímeros soportan adecuadamente el desarrollo y diferenciación osteoblástico.

0445 (83) MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS PROAPOPTOTICOS DE PTH EN LAS CÉLULAS INTESTINALES CACO-2. C R Gentili¹, N Calvo¹, A Russo de Boland¹

¹Laboratorio de Química Biológica Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia Universidad Nacional del Sur <cgentili@criba.edu.ar>

La hormona paratiroidea (PTH) participa en la remodelación ósea y actúa regulando la homeostasis del calcio. Previamente demostramos que PTH promueve la apoptosis en la línea celular Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano defosforilando el factor pro-apoptótico Bad. El objetivo de este trabajo es profundizar el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los efectos de PTH en estas células intestinales. Akt controla el balance entre supervivencia y apoptosis y fosforila el residuo Ser-136 de Bad. Demostramos mediante Western blot que PTH (10⁻⁸M, 48 hs) no modifica la expresión de Akt, pero disminuye la fosforilación de su Ser-473. Este efecto es revertido por el ácido okadaico (1nM), sugiriendo que PTH modularía a Akt mediante la activación de la serina-treonina fosfatasa PP2A. Además el inhibidor de PI3K, LY294002 (10 uM) suprimió totalmente la fosforilación de la Ser-473, demostrando que la activación basal de Akt es exclusivamente vía PI3K. Como la hormona disminuye la proliferación de las células Caco-2, los niveles proteicos de los reguladores del ciclo celular p53 y 14-3-3 fueron analizados por inmunocitoquímica y Western blot. PTH induce la expresión de 14-3-3 y no modifica p53. Por coimmunoprecipitación no se observó asociación entre 14-3-3 y el receptor de PTH1 en condiciones basales ni en células Caco-2 tratadas con la hormona, sugiriendo que 14-3-3 no regularía la localización subcelular del PTHR1. Sin embargo, PTH (48 hs) disminuyó la asociación basal de 14-3-3 con Bad, sugiriendo que Bad es previamente liberada de 14-3-3 para mediar los efectos de PTH. Estos Resultados sugieren que la inhibición de la vía PI3K/Akt y la proteína 14-3-3 son parte del mecanismo por el cual PTH induce apoptosis en las células Caco-2. La acción pro-apoptótica de PTH en las células de adenocarcinoma de colon sería de potencial interés en medicina para generar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del cáncer humano.

0446 (98) REGULACION DE LA PROLIFERACION DE CELULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES POR PROGESTERONA. P H Cutini^{1,2}, V Massheimer^{1,2}

¹Catedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca; ²CONICET <pcutini@criba.edu.ar>

Alteraciones en el perfil de crecimiento de células endoteliales (CE) y musculares lisas vasculares (CMLV) son respuestas adaptativas a la injuria vascular. Siendo estos eventos bioquímicos celulares susceptibles de regulación por esteroides ováricos, en-

tré ellos la progesterona (Pg), nos planteamos como objetivo investigar el efecto de Pg sobre la regulación de la proliferación de CMLV de origen murino, obtenidas por cultivo primario. Empleando la técnica de incorporación de [³H]-timidina, estudiamos el efecto de Pg sobre la proliferación de CMLV en cultivos sincronizados. Vimos que Pg estimula la proliferación a 24 h de tratamiento. El estudio dosis respuesta (1-100 nM) mostró que el mayor estímulo se observó con 10 nM Pg (66.7±3.7 vs 46.5±5.6 cpmX10³/mg prot; control vs Pg; p<0.001). El perfil temporal evidenció que el efecto mitogénico desaparece luego de 48-96 h de tratamiento. Habiendo demostrado previamente que, en tejido vascular, Pg activa en forma no genómica las vías mensajeras de PKC, MAPK y ciclooxigenasa (COX), estudiamos si el efecto mitogénico de Pg está relacionado con estas vías. Utilizando los inhibidores selectivos Chelerythrine (PKC), PD98059 (MAPK) e indometacina (COX), se observó una supresión total de la acción del esteroide en los tres casos (p<0.001; Pg vs Pg+inhibidores). Considerando el contacto directo entre CMLV y CE a nivel vascular, estudiamos si la acción proliferativa de Pg es afectada por las CE. Para ello, se midió la incorporación de timidina en CMLV incubadas con medio de cultivo proveniente de CE expuestas 24 h a 10nM Pg (condicionado). Observamos que el crecimiento de las CMLV tratadas con Pg fue inhibido estadísticamente en presencia del medio condicionado. Los Resultados presentados sugieren que el mecanismo de acción hormonal involucra la participación de PKC, MAPK y COX, y que Pg regula la proliferación de CMLV en forma directa sobre las células aisladas en cultivo ó indirecta a través de su acción condicionante sobre CE.

0447 (130) LA AUTOFAGIA PREVIENE LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR CERULEINA EN CELULAS ACINARES PANCREATICAS. D.Grasso¹, A Ropolo¹, A Lo Ré¹, R Pardo¹, M I Vaccaro¹

¹Dpto Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires <daniel.grasso@gmail.com>

VMP1 (Vacuole Membrane Protein) es una nueva proteína relacionada a la autofagia que es fuertemente activada en células acinares en respuesta a la pancreatitis aguda. En trabajos previos, demostramos que la expresión de VMP1 gatilla autofagia en células de mamífero y que VMP1 co-localiza con LC3, un marcador específico de autofagia, en la membrana de los autofagosomas inducidos por la pancreatitis. Nuestro objetivo fue estudiar el rol de la autofagia mediada por VMP1 en células acinares en respuesta al tratamiento con ceruleina (Cae). Tratamos células AR42J con dosis supramáximas de Cae en función del tiempo. Usando RT-PCR y Western blot demostramos que el tratamiento con Cae induce la expresión de VMP1 en células AR42J. El tratamiento también indujo autofagia, que fue demostrada por el reclutamiento de RFP-LC3 en estructuras puntuales y el análisis de LC3-I y LC3-II por Western blot. Usando la tinción con azul tripán, mostramos que el tratamiento con Cae conduce a la muerte del 50% de las células a las 5 h de tratamiento. Con el objetivo de saber si la expresión de VMP1 está directamente involucrada en la autofagia inducida por Cae, la expresión de VMP1 fue silenciada usando dos VMP1-siRNA diferentes. Encontramos que el silenciamiento de VMP1 impidió el desarrollo de autofagia inducida por Cae a la vez que disminuyó significativamente la sobrevivencia de las células AR42J bajo el tratamiento con Cae. Este efecto se revirtió al transfectar las células con un plásmido de expresión de VMP1. Los Resultados fueron confirmados utilizando células acinares aisladas de páncreas de rata tratadas con Cae y después de la inhibición de la autofagia con 3-metil adenina o cloroquina. Nuestros Resultados indican que la expresión de VMP1 media la autofagia inducida por Cae y sugieren que la autofagia previene la muerte de las células acinares en respuesta a la ceruleina.

0448 (189) PAPEL DE CALMODULINA (CAM) EN LA MUERTE HEPATOCELULAR POR APOPTOSIS INDUCIDA POR TERT-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBOOH): ROL DE PROTEIN

KINASA II DEPENDIENTE DE CAM (CAMKII). F.D Toledo¹, L M Perez¹, E J Ochoa¹, E J Sanchez Pozzi¹, M Roma¹

¹Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET) <toledo_fla@yahoo.com>

El estrés oxidativo hepatocelular induce la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM), con el consecuente escape de citocromo c (cit c) al citosol; éste activa la cascada proteolítica de caspasas que conduce a la muerte celular por apoptosis. Este fenómeno es facilitado por las elevaciones de Ca²⁺ citosólico secundarias al estrés oxidativo, pero los factores que explican esta dependencia son desconocidos. En este estudio, indagamos la participación de la vía de señalización Ca²⁺/CaM/CaMKII en dicho mecanismo, exponiendo hepatocitos aislados al agente pro-oxidante tBOOH (500 iM). tBOOH elevó el Ca²⁺ citosólico aprox. 26 veces (p< 0.001) e incrementó la liperoxidación (+723%; p<0.01) y la relación GSSG/GSH (+131%; p<0.01). La formación de PTPM inducida por tBOOH, estimada por la despolarización de membrana mitocondrial medida con tetra-metil rodamina como parámetro subrogado, fue prevenida por BAPTA (50 iM; quelante de Ca²⁺ intracelular), W7 (100 iM; inhibidor de CaM) y KN62 (10 iM; inhibidor de CaMKII), en una magnitud similar a la prevenida por el bloqueante de PTPM ciclosporina A (5 iM) (aprox. -30%, p<0.025). tBOOH incrementó el % de células exhibiendo fluorescencia de membrana asociada a FITC-anexina V, un indicador de apoptosis. Tanto W7 como KN62 previnieron significativamente este proceso (Control: 6±1, tBOOH: 50±4*, tBOOH+W7: 8±1†, tBOOH+KN62: 14±2%*†; *p<0.05 vs Control, †p<0.05 vs tBOOH). La liberación a citosol de cit c mitocondrial, medida por Western blotting en fracciones citosólicas, fue aumentada por tBOOH (+40%; p<0.05), y este aumento fue prevenido por W7 y KN62 (p<0.05). Concluimos que las elevaciones de Ca²⁺ mitocondrial provocadas por estrés oxidativo producen apoptosis por la vía mitocondrial (intrínseca) a través de la apertura de PTPM y liberación de cit c, y que la vía de señalización Ca²⁺/CaM/CaMKII sería un factor clave en la inducción de dicho proceso.

0449 (462) LOS GLUCOCORTICOIDES RETRASAN LA INVOLUCIÓN MAMARIA POST-LACTANCIA A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE LOS FACTORES STAT5A Y STAT3. P Y Bertucci¹, A Quaglino¹, A Pozzi², E C Kordon¹, A Pecci¹

¹Legma, IFIBYNE-CONICET, FCEyN, UBA; ²IFIBYNE-CONICET, Dpto BBE, FCEyN, UBA <paolabertu@hotmail.com>

Los glucocorticoides controlan la supervivencia y la apoptosis de manera dependiente del tipo y contexto celular. En la glándula mamaria la administración de estas hormonas previenen la involución post-lactancia por mecanismos aún desconocidos. Con el objeto de analizar estos mecanismos se utilizaron ratones hembra Balb/c en estadio de lactancia, involución e involución tratados con Dexametasona (Dex) a distintos tiempos. Se evaluaron los niveles de apoptosis mediante la determinación del grado de fragmentación del ADN por electroforesis en gel de agarosa; la actividad de la Caspasa-3 (Casp-3) por inmunohistoquímica y los niveles de proteínas pro-apoptóticas (como Bax) y anti-apoptóticas (como Bcl-2 y Bcl-XL). También se determinaron los niveles del receptor de glucocorticoides (GR) por Western blot, la actividad y localización de los factores STAT5A y STAT3 por análisis de los niveles de fosforilación e inmunohistoquímica respectivamente y los niveles de ARNm de β -caseína y de la citoquina lif (principal inductor de la involución) por RT-PCR. Los Resultados mostraron que el tratamiento con Dex inhibe la fragmentación del ADN, al menos hasta las 72 horas de iniciado el proceso de involución y que retarda la activación de la Casp-3, la disminución de los niveles proteicos de Bcl-XL, la disminución de relación de los ARNm bcl-XL/bcl-XS y el aumento de los niveles de Bax respecto al estadio de involución sin tratamiento. También se encontró que la Dex mantiene los niveles de GR y la activación del STAT5A y en consecuencia, la expresión de β -caseína mientras que re-

trasa la inducción de I κ B y la activación de STAT3. Los Resultados sugieren que los glucocorticoides mantienen el estado de diferenciación que caracteriza al estadio de lactancia y retrasan la inducción y activación de los principales factores que desencadenan la involución post-lactancia.

0450 (497) AMITOSIS Y ASINCRONISMO ENTRE CARIOCINESIS Y CITOCINESIS DE LOS MIOCITOS DURANTE EL DESARROLLO CARDÍACO OVINO POST NATAL. D Fornoni¹, P Cabeza Meckert², R Laguens²

¹Fundación Favaloro; ²Fundación Favaloro, CIC Pcia Bs As <dvfornoni@yahoo.com.ar>

Con el fin de indagar los mecanismos de replicación post natal de miocitos cardiacos en una especie de gran tamaño, se aislaron miocitos del ventrículo izquierdo (VI) del miocardio ovino. Se determinó el número de núcleos por miocito, el volumen celular, la presencia de hiperploidía y la expresión de marcadores de proliferación (Ki67 y PCNA) en grupos de 4 a 6 corazones de animales de 15, 30, 45 y 60 días y 2 años de edad. Los Resultados están expuestos en la Tabla. Hasta los 60 días el número total de miocitos por VI se incrementó gradualmente, en tanto que a los dos años fue un 66% mayor. ($p < 0,001$). El volumen fue similar a los 15 y 30 días, aumentó a los 45, y a partir de los 60 días no sufrió modificaciones. El porcentaje de miocitos con 4 núcleos descendió entre los 15 y 30 días, para elevarse los 45 días ($p < 0,001$), con variaciones opuestas del porcentaje de mononucleados. No hubo variación en el porcentaje de binucleados. La ploidía nuclear reveló un porcentaje de miocitos poliploides de 13% entre los 15 y 30 días, con caída significativa a partir de los 45 días ($p < 0,01$). Los marcadores de proliferación PCNA y Ki-67 presentaron dos picos de expresión, a los 15 y 45 días, siendo negativos en los demás grupos. El índice mitótico, (histona H3), fue < 3 mitosis/ 10^5 núcleos a los 15 días, sin positividad en los demás grupos ($p < 0,005$). Estos Resultados indican crecimiento hiperplásico en el desarrollo cardiaco, producto de división nuclear amitótica, generándose $> 70\%$ de nuevos núcleos entre los 30 y 45 días, con citocinesis asincrónicas hasta la adultez.

Edad	Vol. μ^3	Miocitos $\times 10^6$	Núcleos $\times 10^6$	1núcleo %	4núcleos %	% poliploidía	PCNA %	ki67 %
15 días	15241.97	2.01	4.18	13.20	14.13	13.60	0.2443	0.0082
30 días	15850.25	2.09	3.83	27.07	4.96	13.05	0.0083	0.0015
45 días	19056.18	2.30	5.19	8.54	17.08	6.75	0.1648	0.0086
60 días	23622.68	2.48	5.28	16.35	14.89	7.91	0.0041	0.0000
2 años	24984.70	3.34	5.63	40.48	4.40	2.48	0.0000	0.0000

0451 (533) ALTERACIONES ANATOMOPATOLÓGICAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO TRATADO CON LÁSERES DE BAJA POTENCIA Y SU REPERCUSIÓN A NIVEL MITOCONDRIAL EN MIOPATÍA INDUCIDA EN RATAS. N Servetto¹, D Cremonesi^{2,3}, M Moya^{1,3}, V Campana^{1,3}

¹Cátedra de Física Biomédica - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba; ²I Cátedra de Patología - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Córdoba; ³Carrera de Medicina. Universidad Nacional de La Rioja <natiservetto@hotmail.com>

Se estudió el efecto antiinflamatorio y trófico de la terapia de bajo nivel de energía (LLLT) en un modelo experimental de miopatía a través del análisis histomorfométrico de músculo, mitocondrias y actividad enzimática mitocondrial. Se utilizaron 48 ratas hembras, cepa Wistar, en 6 grupos: control, con miopatía, 2 grupos con miopatía y LLLT de He-Ne y con Arseniuro de Galio (As.Ga) y 2 grupos solo irradiados con cada láser. La miopatía se indujo por inyecciones de adrenalina (0.05mg/rata/día) en un punto, 5 días. LLLT se realizó 7 días sobre la zona afectada. El estudio histológico se realizó por microscopía óptica y electrónica; la actividad enzimática mitocondrial por espectrofotometría y se aplicó ANOVA: test de Fisher y de Pearson ($p < 0.05$). Las inyecciones de adrenalina

generaron un proceso inflamatorio evidenciado por infiltrado inflamatorio mononuclear en relación a las fibras musculares destruidas, marcada citólisis, pérdida de regularidad de disposición de miofibrillas y alteración mitocondrial. La irradiación del Láser de He-Ne y de As.Ga por sí solas no provocó cambios a nivel tisular y mitocondrial. Las alteraciones estructurales en músculo y mitocondrias producidas en la miopatía (Grado III y IV de alteración mitocondrial) sufrieron una regresión significativa ($p < 0.001$) cuando fueron tratadas con cada láser (Grado I y II). La cantidad de mitocondrias no varió en los diferentes grupos. Las áreas mitocondriales que aumentaron ($p < 0.05$) en las miopatías, adquirieron su tamaño normal luego del LLLT. La actividad enzimática del complejo IV aumentó ($p < 0.01$) en el grupo de animales solo irradiados con láser de He-Ne lo que nos lleva a pensar que el fotorreceptor de este láser se encuentra en dicho complejo. Los Resultados demuestran el efecto antiinflamatorio y trófico de LLLT en miopatía inducida, demostrado por la evolución histológica muscular y mitocondrial, sin encontrar diferencias significativas entre el láser de He-Ne y As.Ga.

PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR P1

0452 (164) EVALUACIÓN DE MATRICES MIXTAS DE QUITOSANO Y POLI-E-CAPROLACTONA EN INGENIERÍA DE TEJIDO ÓSEO. C Berghoff¹, M S Cortizo¹, A M Cortizo²

¹Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT-La Plata, CONICET-UNLP; ²Bioquímica Patológica, Departamento de Cs. Biológicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP <carla_berghoff@yahoo.com.ar>

Las tendencias actuales en ingeniería de tejido óseo están dirigidas al desarrollo de matrices biocompatibles con características físicas y mecánicas adecuadas para la reconstrucción del hueso. Asimismo deben poseer propiedades para transportar agentes osteogénicos con capacidad para mejorar la velocidad y eficiencia de la regeneración ósea. Uno de los polímeros naturales más utilizado es el quitosano, cuyas propiedades mecánicas pueden ser mejoradas por mezcla con polímeros sintéticos. Preparamos y caracterizamos matrices mixtas de quitosano (Q) y poli- ϵ -caprolactona (PECL) con o sin alendronato (10%w/w) (QE y QEA respectivamente). Las matrices, se obtuvieron por casting de mezclas de composición 25:75 (Q:PECL) previamente disueltas en ácido acético. La caracterización superficial de las películas se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM). La evaluación de biocompatibilidad se llevó a cabo mediante estudios de morfología y crecimiento celular (observación y conteo celular por tinción con Giemsa), y diferenciación (fosfatasa alcalina, FAL) de osteoblastos UMR106 en cultivo, empleando como control platos plásticos. Las matrices presentaron una superficie heterogénea en todos los casos. Nuestros Resultados muestran que las células presentan una morfología normal y son capaces de proliferar bien sobre las matrices (QE: $22,5 \pm 2,0$; QEA: $23,0 \pm 2,7$; Plástico: $50,5 \pm 3,5$ número de células/campo, $n=10$). No se observaron efectos del alendronato sobre la proliferación celular pero sí sobre la diferenciación de osteoblastos crecidos sobre las matrices conteniendo alendronato, (QE: 115 ± 8 , QEA: 44 ± 3 ($p < 0,01$), Plástico: 100 ± 8 % control), bajo estas condiciones las células mostraron una menor expresión de este marcador osteoblástico. **Conclusiones:** las matrices preparadas con PECL y Q muestran buena biocompatibilidad, sin efectos tóxicos, pero la inclusión de 10%w/w de alendronato produjo un efecto inhibitorio de la diferenciación osteoblástica.

0453 (274) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN POR HORMONA TIROIDEA DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE SERTOLI (CS). M F Riera¹, M N Galardo¹, E H Pellizzari¹, S B Meroni¹, S B Cigorraga¹

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET) <fernandariera@hotmail.com>

Se conoce que triodotironina (T3) detiene la proliferación de CS inmadura inducida por FSH. Este efecto estaría mediado por el incremento en los niveles de los inhibidores del ciclo celular de la familia CIP/KIP, p21 y p27. Se desconoce si T3 es capaz de regular los niveles de expresión de los inhibidores del ciclo de la familia de INK4. Por otro lado si bien se ha observado en distintas líneas celulares que el mecanismo de acción de T3 involucra además de la interacción con receptores nucleares la activación de señales de transducción, tales mecanismos no han sido explorados en CS. El objetivo del trabajo fue determinar si en CS T3 regula la expresión del inhibidor del ciclo p19^{INK4d}(p19), activa la quinasa activada por AMP (AMPK) y la vía de fosfatilinositol-3-quinasa/proteína quinasa B (PI3K/PKB). Se incubaron por 48 hs cultivos de CS de 8 días de edad en condiciones basales o con 500nM T3 en ausencia o presencia de 100 ng/ml FSH. El análisis de los niveles de ARNm de p19 por Northern Blot reveló que T3 solamente incrementa el p19 en presencia de FSH (FSH+T3: 2.1±0.3* veces de estímulo vs FSH, X±DS, n=3, * p< 0.05). Por otro lado, se incubaron cultivos de CS por 5, 15 y 30 minutos en ausencia o presencia de T3 500nM y se determinaron los niveles de fosforilación de AMPK y PKB por Western blot. Se observó que T3 incrementa los niveles de AMPK fosforilada mientras que disminuye los de PKB fosforilada. Observamos además que la incubación con el activador farmacológico de AMPK (AICAR 1mM) en presencia de FSH incrementa los niveles de expresión de p19 (AICAR+FSH: 2.4±0.6* veces de estímulo vs FSH, X±DS, n=3, * p< 0.05.) En conjunto estos Resultados sugieren que T3 en CS además de aumentar los inhibidores del ciclo de la familia CIP/KIP para detener la proliferación celular, incrementa con el mismo fin los niveles del inhibidor del ciclo celular p19^{INK4d} probablemente a través de la activación de AMPK.

0454 (318) EFECTO DE TRIFOSFATO DE ADENOSINA (ATP) SOBRE MODELO DE PRENEOPLASIA HEPATICA EN RATA. C D De La Vega Elena ¹, A V Frontini ¹, P Presentado Larrey ¹, A Roca ¹, M Cuffia ¹, M Secchi ¹, I Rechiman ¹, L García ¹, V Nicolich ¹, G Pisani ², M Alvarez ², C Carrillo ², P Schwarzbaum ³, G Venera ^{1 3}

¹Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR-CONICET); ²Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET); ³Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA <cddelavega@yahoo.com>

Evidencias experimentales indican que en mamíferos el ATP presente en el intersticio y plasma, en concentraciones suficientemente altas puede actuar como citotóxico tumoral por mecanismos no bien conocidos. El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto del ATP exógeno en estadios tempranos de tumorigénesis en un modelo de iniciación-promoción de hepatocarcinoma de rata. Para ello se procedió a la inmunomarcación de focos preneoplásicos (FP) Ratas macho Wistar adultas (n=24) se dividieron en grupos (G). G1: modelo de iniciación-promoción utilizando dietilnitrosamina (DEN, iniciador, 2 dosis i.p. 150 mg/kg) en la 1^o y 3^o semanas; en las 4^o, 5^o y 6^o semanas se administró vía gástrica 2-acetilaminofluoreno (2-AAF, promotor, 20 mg/kg) 4 días consecutivos durante 3 semanas; G2: modelo más inyección i.p. de ATP (100 mg/kg peso) 4 días por semana durante la iniciación-promoción; G3: control; G4: control de ATP. La tinción inmunohistoquímica de cortes de tejido hepático se realizó mediante la técnica de estreptavidina-biotina-peroxidasa, utilizando el anticuerpo contra la forma placentaria de la glutatión S-transferasa (rGST-P), el marcador más efectivo para FP. Se utilizó videomicroscopía para cuantificar el total de áreas de FP (mm²), el número de FP por cm² de sección y calcular FP como porcentaje del hígado según el modelo modificado de Saltkyov. Las ratas que recibieron ATP (G2) presentaron un aumento significativo con respecto a G1 tanto del área relativa de FP (mm²/cm²) (1,306±0,215 vs. 0,526±0,114; p<0.01) como del

número/cm² de sección hepática (1238,4±161,4 vs. 458,6±60,4; p<0.005). El G4 que recibió sólo ATP no mostró diferencias significativas con respecto a G3 (Anova de una vía y Test de Tukey). En G2 se observó mediante HE, degeneración hidrónica, focos con infiltrado mononuclear y mayor tamaño nuclear comparados con G1. Los Resultados indican que el ATP exógeno tiene un efecto pro-tumoral en este modelo de hepatocarcinoma.

0455 (414) CITOTOXICIDAD Y PERMEABILIDAD DE RIBOFLAVINAS EN TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD).. A V Juárez ¹, C Leimgruber ¹, S Gutierrez ¹, E Haggi ², A Torres ¹, P Pons ¹

¹ Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.; ²Unidad Académica Río Gallegos. Universidad Nacional de la Patagonia Austral. <vickyjua@hotmail.com>

La TFD es un método que mediante la activación lumínica de un fotosensibilizador (FS) localizado selectivamente en determinadas células genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen su muerte. En la actualidad este método es efectivo para tratar distintas patologías pero la droga utilizada es muy costosa. **Objetivo:** Búsqueda de un FS de bajo costo y de buena penetración para posibilitar la aplicación de la TFD a un mayor número de pacientes. La riboflavina (RF-H) por su alto potencial redox, podría utilizarse como FS en lesiones superficiales. Con la finalidad de constatar la generación de ROS por la RF a $\lambda=475\text{nm}$ se utilizó 3OH piridina, droga que se descompone en presencia de ¹O₂. Se acetiló la riboflavina (RF-L) para mejorar la absorción a través de la piel in vivo y se verificó el daño celular generado por la acción de ambas RF en células dispersas de tejido hipofisario de ratas. *In Vivo:* Se realizaron 10 aplicaciones de TFD con RF-H y RF-L sobre epidermis de las patas de ratas Wistar midiendo el grosor de la capa cornea con el programa Image Tool. *In Vitro:* G1: control, G2: iluminadas 30', G3: tratadas con FS, G4: tratadas con FS e iluminadas 30'. Se midió viabilidad celular con azul de Tripano y se analizó la respuesta por microscopía electrónica (ME) y fotónica de alta resolución. **Resultados:** La absorbancia de la 3OH piridina decayó de 0,5 a 0,37 en 2' demostrando la generación de ¹O₂. El tratamiento produjo una reducción del 33% en el espesor de la capa cornea en las patas tratadas con RF-L y del 24% en las tratadas con RF-H. La viabilidad celular fue significativamente menor en el G4 de ambas RF. El análisis por ME demostró muerte celular por dos mecanismos: apoptosis y necrosis. **Conclusión:** La RF-L ha demostrado poseer mayor capacidad de penetración en el tejido epidérmico que la RF-H, y producir daño severo y muerte celular en células dispersas. Por lo tanto podría ser propuesto como fotosensibilizador de bajo costo.

0456 (425) MACRÓFAGOS ALVEOLARES EXPUESTOS A NITRATO DE URANILO: EVALUACIÓN DEL CLNA Y NAHCO3 COMO DISOLVENTES DEL URANIO PARA LA DETERMINACIÓN DE DIFERENTES PARÁMETROS METABÓLICOS. N.S Orona ¹, P Mandalunis ², A Ubios ², D Tasat ^{1 2}

¹Centro de Estudios en Salud y Medio Ambiente- Escuela de Ciencia y Tecnología-UNSAM; ²Cátedra de Histología, Facultad de Odontología, UBA <naorona@gmail.com>

El uranio empobrecido (DU) es un metal pesado utilizado en aplicaciones militares e industriales. En la guerra del Golfo, se utilizaron por primera vez proyectiles revestidos con DU debido a su poder de penetración. Su efecto tóxico sobre la salud es aún controversial, siendo de particular interés su acción sobre el sistema inmune. A tal fin evaluamos en macrófagos alveolares (MA) expuestos a dosis crecientes de nitrato de uranio (NO₃U) (12.5-200iM) disuelto en CINA 0.9% o en NaHCO₃ 100mM, la viabilidad

celular, fagocitosis, generación de radicales libres y apoptosis. La incorporación intracelular de NO_3U se verificó utilizando 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (Br-PADAP). La viabilidad celular disminuyó cerca de un 50% cuando los cultivos de MA se expusieron a 25iM NO_3U en CINa o a 50iM NO_3U en NaHCO_3 . Se produjo reducción de la fagocitosis, en relación a los cultivos controles (C) para dosis de 50iM NO_3U (C: 61.8% vs 47.2%) y 100iM NO_3U (C: 52.8% vs 35.2%) según estuviera en CINa o en NaHCO_3 ($p < 0.05$). La generación de anión superóxido (O_2^-) mostró, en ambos casos, una respuesta bifásica. Para dosis bajas se observó aumento de O_2^- respecto de sus controles. Sin embargo, para 50iM NO_3U (C: 36.5% vs 21.5%) o 100iM NO_3U (16.9% vs. 22.5%) disuelto en CINa o NaHCO_3 respectivamente se observó inhibición en la producción de O_2^- ($p < 0.05$). En ambos casos los MA expuestos a 100iM NO_3U presentaron cromatina compactada y circunscripta a la cara interna de la envoltura nuclear o presencia de cuerpos apoptóticos (C: 10.1% vs 43.7% NO_3U en CINa; C: 27.8% vs 64.1% NO_3U en NaHCO_3). En conclusión, para todos los parámetros metabólicos evaluados, el efecto tóxico del NO_3U se observó a menores concentraciones cuando se disolvió en CINa. Debido a la mayor intensidad de color del Br-PADAP presentada en los MA, sugerimos que este comportamiento podría deberse al grado de solubilidad del NO_3U en el medio, mejorando la disponibilidad e incorporación del mismo a la célula.

0457 (453) MALNUTRICION PROTEICA CRONICA Y SU RELACION CON HEPATOCARCINOGENESIS QUIMICA EN RATON. V J Caballero¹, J R Mendieta¹, A M Giudici¹, R D Conde¹, A N Chisari¹

¹Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional de Mar del Plata - CONICET <vcaballe@mdp.edu.ar>

La proliferación celular inducida por químicos es controlada principalmente por los mecanismos de apoptosis y necrosis. La malnutrición puede favorecer su desarrollo. En este trabajo se examinó la susceptibilidad a hepatocarcinogénesis de ratones sometidos a ciclos de dieta sin proteínas ni aminoácidos (SP) con intervalos de realimentación Normal (N), frente a la administración de diethylnitrosamina (DENA). Ratones hembra adultos Balb/C fueron divididos en 4 grupos: 1) SP->N, ratones sometidos a 3 ciclos de 5d con SP seguidos de 5d realimentación N; 2) SPI->NI, ídem a 1 con doble IP de 0.2mg/g DENA (1ª dosis 23 días antes de comenzar el tratamiento, 2ª dosis 5 días antes del sacrificio); 3) (N) ratones continuamente alimentados con dieta completa; 4) NI, ídem a 3 pero con doble IP 0.2mg/g DENA. Para evaluar apoptosis se midió la actividad de caspasa 3 en el extracto hepático. Se observó una mayor actividad en ratones SP->N ($4.8 \pm 0.6^*$) y menor para SPI->NI ($2.1 \pm 0.4^*$), diferentes significativamente de N (3.3 ± 0.3). Como parámetro relacionado con una mayor síntesis de DNA, se analizó el nivel de mRNA de cMyc. Los Resultados mostraron un aumento significativo en los animales SPI->NI ($6.3 \pm 0.7^*$) con respecto a N (3.6 ± 0.4). Dado que el 99-100% de los nódulos preneoplásicos son glutatión-S-transferasa P1 positivo, se analizó su expresión por RT-PCR. La misma aumentó en SP->N ($4.1 \pm 0.2^*$) y SPI->NI ($3.2 \pm 0.6^*$) con respecto a N (2.4 ± 0.2). Los animales NI no mostraron diferencias significativas con respecto a N en ninguno de los análisis realizados. (* $p < 0.05$). Estos Resultados sugieren que los animales sometidos a una malnutrición proteica crónica controlan el desarrollo de células anormales mediante un aumento de la apoptosis. Por otra parte, dicho proceso se inhibiría en presencia de un inductor de tumor, incrementando la proliferación celular y la expresión de oncogenes como cMyc. Es decir, aumentando la susceptibilidad al desarrollo de preneoplasias. Financiado CONICET y UNMdP

0458 (542) LA DISRUPCION DE LA VIA SUPRESORA DE TUMORES P16INK4A-CDK4-PRB Y LA INMORTALIZACION MEDIADA POR TELOMERASA ES SUFICIENTE PARA

INICIAR LA MALIGNIZACION DE CELULAS EPITELIALES PRIMARIAS DE LA MUCOSA ORAL. G L Sanchez¹, J Brahim², J S Gutkind¹, A Molinolo¹

¹Oral and Pharyngeal Cancer Branch, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, Maryland 20892, USA; ²National Institutes of Health, National Institute of Dental and Craniofacial Research, Bethesda, MD 20892, USA <grisanchez@yahoo.com.ar>

El carcinoma pavimentoso de cabeza y cuello (CPCC) es la sexta patología neoplásica en el mundo desarrollado y la cuarta en países en vías de desarrollo. La sobrevivida a 5 años ha presentando sólo cambios marginales en las última 3 décadas. Considerando a la inmortalización celular como un evento temprano en el proceso de, nuestro modelo podría ser una herramienta útil en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la transformación celular. 80 muestras de mucosa oral de donantes sanos fueron colectadas luego de la extracción voluntaria de terceros molares permanentes retenidos en adultos jóvenes sanos (18 ± 5) (protocolo NIDCR, NIH #06-D-0144) estas muestras fueron procesadas para el desarrollo de cultivos celulares primarios. Posteriormente parte de las muestras fueron inmortalizadas con retrovirus a partir de plásmidos que expresan telomerasa(hTERT) y ciclina dependiente de la quinasa 4 (CDK4), se conservó una muestra del cultivo primario de cada línea como control. 10 líneas celulares fueron infectadas con una variedad mutante de CDK4 (R21) resistente a la acción de p16^{INK4A}(mut CDK4). Posteriormente 2×10^6 células hTERT-Cdk4/hTERT mutCdk4 y no infectadas de 4 diferentes donantes fueron inoculadas en ratones inmunodeprimidos (nude). Se desarrollaron cultivos primarios de los queratinocitos y fibroblastos con una eficiencia superior al 90%. Luego de 3 meses en cultivo las células coinfectadas con mutCDK4 y hTERT, comenzaron a manifestar cambios asociados a malignización. 65 (60-90) días posteriores a la inoculación de los ratones con las células immortalizadas con mutCdk4 con 100 días en cultivo, desarrollaron tumores, histologicamente compatibles con carcinomas, el resto de los ratones inoculados con las demás líneas celulares no presentaron neoplasias en los 8 meses de seguimiento. Mediante inmunohistoquímicas y Western blot se estableció el origen epitelial, y la activación de las vías de AKT, P16, P53, habitualmente involucradas en el CPCC.

0459 (597) ACCIÓN DE LA ERITROPOYETINA FRENTE A LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR HIPOXIA EN CÉLULAS DE ORIGEN NEURONAL. S Wenker¹, M E Chamorro¹, D Vittori¹, D Vota¹, A Nesse¹

¹Departamento de Química biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA-CONICET <swenker@qb.fcen.uba.ar>

La deficiencia de oxígeno es un factor de estrés que induce múltiples respuestas. A nivel celular, la exposición a hipoxia puede inducir una desregulación metabólica con pérdida de la homeostasis y muerte celular. La eritropoyetina (Epo) es una citoquina pleiotrópica originalmente definida por su rol en la eritropoyesis. El hallazgo de receptores específicos en tejidos no hematopoyéticos, expandió su acción biológica y farmacológica. Si bien la Epo constituye un factor de protección celular frente a estímulos apoptóticos, poco se sabe acerca de la modulación de su acción. El objetivo de este trabajo es estudiar la acción antiapoptótica de Epo sobre células neuronales SH-SY5Y, bajo distintas condiciones de diferenciación, expuestas a condiciones de hipoxia (O_2 : 5-7%). En células indiferenciadas, la hipoxia (H) indujo a) cambios morfológicos (microscopía electrónica) con pérdida de adhesión celular y disminución de neuritogénesis, b) significativa disminución de la viabilidad celular (MTT) en forma tiempo-dependiente (H-16h $71 \pm 9\%$, H-24h $28 \pm 15\%$; $p < 0.05$ vs. C) y c) aumento significativo de apoptosis determinado por tinción con

Hoechst (H16 $27 \pm 2\%$ vs. C $P < 0,05$) y clivaje de PARP. La diferenciación celular por ácido retinoico (AR) aumentó la resistencia a la apoptosis inducida por hipoxia (AR-H16h $7 \pm 2\%$ vs. H16h $p < 0,05$), atribuido, probablemente, a la regulación positiva de Bcl-2. El pretratamiento con Epo (9 h, 25 U/ml) previno los efectos de la exposición a hipoxia (MTT: H $71 \pm 7\%$, E/H $100 \pm 29\%$; $P < 0,05$; Apoptosis: H $28 \pm 1\%$, E/H $7 \pm 2\%$; $P < 0,001$). Este efecto resultaría de una acción antagonista a la inducida por hipoxia a nivel de la regulación de Bcl-xL. El postratamiento con Epo luego de 2 h de hipoxia simultáneamente con la reoxigenación revirtió parcialmente el daño celular inducido por hipoxia/reoxigenación. La acción diferencial de la Epo frente a la muerte celular inducida por hipoxia o hipoxia/reoxigenación sugiere distintos mecanismos involucrados en ambos procesos.

0460 (598) EFECTOS DEL PLOMO SOBRE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y NIVELES PLASMÁTICOS DE MALONDIALDEHÍDO. A E Piñeiro¹, P N Quiroga¹, A H Sassone¹, J A Navoni¹, M E Ducatelli¹, M Carretero¹, O E Roses¹, C M López¹

¹Cátedra de Toxicología y Química Legal-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA <apineiro@ffyub.uba.ar>

En estudios previos demostramos que el plomo (Pb) (1000 ppm) aumentó la actividad enzimática antioxidante y produjo un marcado efecto genotóxico. Como objetivo nos planteamos evaluar la variación de la actividad de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y los niveles de malondialdehído (MDA) a concentraciones de plomo en sangre (PbS) alrededor de 30 µg/dl, punto de corte en el ámbito laboral. Se utilizaron 60 ratas Wistar machos adultos de 264 ± 40 g. Los animales fueron divididos aleatoriamente en dos grupos: control (C) y tratados (T2, T4, T6). El grupo T recibió acetato de Pb (500 ppm de Pb) en el agua de bebida durante 2, 4 y 6 meses. El grupo C recibió agua destilada durante los mismos períodos. Se obtuvieron muestras de sangre anticoaguladas con heparina, se separaron los plasmas y el paquete globular. Las muestras fueron conservadas en freezer a -18 °C hasta su procesamiento. La cuantificación de Pb se realizó por absorción atómica-atomización electrotermic. Las actividades de CAT y SOD se midieron según técnica. El MDA se midió por HPLC. Se aplicaron los tests estadísticos de Student, ANOVA, Mann-Whitney y Welch. Los niveles de Pb en sangre en el grupo T fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo C ($p < 0,0001$). La concentración promedio fue $39,0 \pm 6,5$ µg/dl vs $4,6 \pm 1,9$ µg/dl, respectivamente. Con respecto a C, los picos máximos de actividad de CAT y SOD se observaron a los 4 meses de tratamiento ($2,71 \pm 0,56$ vs $2,17 \pm 0,42$ pm/mg prot.; $1,63 \pm 0,34$ vs $0,80 \pm 0,22$ USOD/mg prot., respectivamente) ($p < 0,05$), mientras que el MDA aumentó a partir de los 6 meses (65% respecto a los 2 meses) ($p < 0,05$). La variación de la actividad antioxidante observada indicaría que la estrategia de defensa del organismo es dependiente del PbS y del tiempo de contacto con el Pb, dado que a los 6 meses la respuesta protectora de ambas enzimas disminuyó significativamente, aumentando los niveles plasmáticos de MDA.

0461 (601) EL HEXACLOROBENCENO ES UN INDUCTOR DE APOPTOSIS EN HÍGADO DE RATAS. M L Giribaldi¹, F A Chiappini¹, A Randi^{1,2}, V H Tomassi², D L Kleiman de Pisarev^{1,2}, L Alvarez¹

¹Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.; ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. <lauragiribaldi@hotmail.com>

El hexaclorobenceno (HCB), es un contaminante ambiental ampliamente distribuido. Es inductor de enzimas microsomales hepáticas (CYP450 1A1) y promotor de cáncer hepático en animales. Es inmunotóxico, neurotóxico e induce disfunciones endocrinas en humanos. Muchas enfermedades resultan de la

pérdida de la respuesta integrada a estímulos como mitógenos, citoquinas y hormonas. El TGF- $\beta 1$ es una citoquina que regula la proliferación, diferenciación y apoptosis. El TGF- $\beta 1$ puede activar proteína kinasa. La desregulación de la apoptosis es un importante componente de la hepatocarcinogénesis. Demostramos previamente que en hígado de rata, el HCB altera la vía de señalización de REGF, los niveles de proto-oncogenes, la actividad de c-Src y de la enzima Ornitina Decarboxilasa. Aumenta la proliferación celular y desencadena apoptosis independientemente de la vía mitocondrial. Dado que el HCB altera mecanismos de regulación del crecimiento, nuestro objetivo fue profundizar el estudio de su efecto sobre parámetros reguladores de la apoptosis, en hígado de ratas Wistar tratadas con HCB (0,5; 5; 50 y 500 mg/Kg). Evaluamos: 1-La vía apoptótica extrínseca (niveles y actividad de caspasa 8 por Westernblot), 2-Reguladores del crecimiento celular, TGF- $\beta 1$, por RT-PCR y niveles de p53, por inmunohistoquímica. 3-Niveles de JNK fosforilada y total, por Westernblot. Se observó: 1) un aumento en la expresión de caspasa 8 (134 y 169%), $p = 0,01; 0,001$, con HCB (0,5 y 5) respectivamente; 2) aumento en la expresión de TGF- $\beta 1$ (67, 178 y 314%), $p = 0,05; 0,01; 0,001$, con HCB (5, 50 y 500) y de CYP1A1 (88,50y38%), $p = 0,01; 0,05; 0,001$, con HCB (5, 50 y 500) y aumento de p53 (157 y 128%), $p = 0,01; 0,05$, con HCB (0,5 y 5); 3) aumento en los niveles de JNK-P/JNK de (175 y 150%), $p = 0,01; 0,001$, con HCB (0,5 y 5). Conclusión: El HCB induce apoptosis involucrando la vía de receptores de muerte. El TGF- $\beta 1$ y la activación de JNK y p53 estarían relacionadas con la apoptosis e inhibición del ciclo celular.

0462 (609) DESARROLLO DE MATRICES POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES CONTENIENDO HIDROXIAPATITA: OSTEOCOMPATIBILIDAD IN VITRO. J M Fernandez¹, M Molinuevo², M Cortizo³, A Cortizo²

¹INIFTA, Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP.; ²Bioquímica Patológica, Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP. 47 y 115 (1900) La Plata; ³INIFTA, CCT-La Plata, UNLP-CONICET <jmfernandez@inifta.unlp.edu.ar>

La ingeniería de tejidos permite la reparación de tejido óseo dañado empleando scaffolds porosos que sirven como matrices para el desarrollo y diferenciación celular, in vitro e in vivo. Estos scaffolds, realizados a partir de biomateriales poliméricos, poseen la capacidad de ser reabsorbidos y reemplazados por matriz extracelular. En el tejido óseo, se requiere que el scaffold posea características biomecánicas que soporten la tracción muscular. Previamente, hemos demostrado que scaffolds obtenidos a partir de poliésteres (poli-b-propiolactona(PPL) y poli-ε-caprolactona(PCL)) y polifumarato (polifumarato de diisopropilo (PFIP)) son biocompatibles con células del tejido óseo. Con el fin de mejorar las propiedades biomecánicas y osteogénicas suelen asociarse polímeros sintéticos y materiales inorgánicos (hidroxiapatita (HAP), vidrios, etc.). En este caso, hemos sintetizado PBPL, PECL y PFIP conteniendo en su estructura partículas de HAP obtenidas a partir de hueso de vaca. Las membranas conteniendo 10% w/w de HAP respecto al polímero, se obtuvieron por el método de casting y fueron analizadas por microscopía visible y electrónica de barrido con el fin de determinar sus características superficiales y la distribución de HAP. Encontramos que la HAP se distribuye uniformemente en los polímeros, formando parte de su estructura e incrementando la rugosidad de las membranas. El crecimiento osteoblástico sobre las membranas conteniendo HAP fue menor que las membranas de polímero solo y el plástico. La diferenciación celular fue evaluada por medio de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL) y el depósito de colágeno tipo I. La actividad de FAL disminuye para los polímeros conteniendo HAP; mientras que se incrementa la producción de colágeno (PBPL: 212 ± 29 ; PCL: 124 ± 13 ; PFIP: 84 ± 0). En conclusión, estos estudios preliminares Resultados sugieren que las matrices sintetizadas son biocompatibles aunque resta evaluar si la proporción HAP / polímero influencia la biocompatibilidad.

REPRODUCCION O1

0463 (73) TESTOSTERONA (T) Y DIHIDROTESTOSTERONA (DHT), A TRAVÉS DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS, REGULAN DIFERENCIALMENTE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA 2 (COX2) EN CÉLULAS DE LEYDIG (CL) DEL HÁMSTER. M E Matzkin^{1,2}, S I Gonzalez Calvar^{1,2}, A Mayerhofer³, R S Calandra⁴, M B Frungieri^{1,2}

¹IBYME, CONICET; ²Medicina, UBA; ³LMU, Munich, Alemania; ⁴IMBICE, La Plata <maeugmatzkin@hotmail.com>

Hemos descripto que la isoforma inducible de la enzima ciclooxigenasa (COX2), clave en la síntesis de prostaglandinas (PGs), no se expresa en testículos de ratones, ratas, cerdos, monos o humanos fértiles. En cambio, COX2 se expresa en testículos de pacientes infértiles (Frungieri y col, PNAS 2002; 99:15072) y en células de Leydig (CL) de hámsteres Dorados adultos. Además, PGF2 α inhibe la producción de testosterona (T) en CL del hámster (Frungieri y col, Endocrinology 2006; 147:4476). Este trabajo investigó la regulación de COX2/PGF2 α en el testículo del hámster, especie con ciclos reproductivos anuales foto-dependientes. Se evaluó por inmunohistoquímica, RT-PCR, Western blot e inmunoensayos, la expresión de COX2 y la producción de PGF2 α . En hámsteres puberales y adultos expuestos a fotoperíodo normal (FN, 14h luz/día) con niveles séricos normales de LH, T y DHT, se observó expresión de COX2 en CL. En cambio, en hámsteres prepúberes mantenidos en FN y adultos expuestos a fotoperíodo corto (8 h luz/día) por 16 semanas con bajos niveles séricos de LH, T y DHT, no se detectó COX2. Estudios *in vitro* realizados en CL de hámsteres demostraron que la expresión de COX2 y la producción de PGF2 α es inducida por hCG y T ($P < 0.05$), mientras que DHT no afecta a COX2. El rol inductor de hCG y T sobre COX2 fue bloqueado por el antiandrógeno bicalutamida, indicando que la acción de LH resulta de su rol estimulador sobre la producción de T y no de un efecto directo sobre COX2. También se detectó la presencia del receptor de andrógenos en CL del hámster. En resumen, COX2 se localiza en CL del hámster y su expresión es regulada por T durante el desarrollo sexual y la transición fotoperiódica regresión-reactivación. Aunque DHT se une al mismo receptor de andrógenos que T, no altera la expresión de COX2. Así, T induciría a COX2/PGF2 α mientras que, a través de un mecanismo regulatorio de retro-alimentación, COX2/PGF2 α inhibirían la producción de T en CL.

0464 (263) EFECTO DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON FACTORES DE CRECIMIENTO INSULINO SÍMILES (IGFS) SOBRE LA RESPUESTA A GONADOTROFINA CORIÓNIC HUMANA (HCG) EN CULTIVO TESTICULAR HUMANO PREPUBERAL (THP). M Costanzo¹, E Berensztein¹, M S Baquedano¹, N Saraco¹, R H Domanico², M M Murano², M A Rivarola¹, A Belgorosky¹

¹Hospital de Pediatría J.P. Garrahan; ²Área Farmoquímicos Naturales, Instituto Nacional de Tecnología Industrial <marianacostanzo@gmail.com>

En estudios previos se caracterizó el patrón de expresión de IGF1, IGF2, del receptor tipo1 de IGFs (IGFR1) y del receptor de insulina (IR), en THP de tres grupos de edad (GR): GR1 neonatal, GR2 activación testicular postnatal, y GR3 prepubertad temprana, y los efectos de IGF1 en cultivo primario, sobre: la proliferación y apoptosis celular, la expresión de la enzima P450sc y secreción de testosterona (T). Se propuso que el sistema IGFs estaría involucrado en la diferenciación funcional de la célula de Leydig en el THP (Berensztein Ped Res 2008). En este estudio se analizaron los efectos del estímulo crónico con IGFs sobre la respuesta al estímulo agudo con hCG. Se obtuvieron THP de necropsias, que fueron agrupados y procesados para su cultivo según lo previamente publicado. La pre-incubación crónica con IGF1 aumentó significativamente la secreción de T en respuesta

al estímulo agudo con hCG (396 \pm 133% del basal; media \pm ESM; n=7 cultivos; $p < 0,05$). Además, en un cultivo del GR1 observamos que IGF2 aumentó significativamente la secreción de T en ausencia de otros estímulos (175 %, $p < 0,05$), la expresión de las enzimas 3beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 y 17alfa hidroxilasa por RT-PCR tiempo real, al día 6 de cultivo (5,7 y 8,2 veces respectivamente; 2^{-DDCT}) y la respuesta de T al estímulo con hCG (237%, $p < 0,05$). Este último efecto fue bloqueado en presencia del inhibidor selectivo de IGFR1, picropodofilina. Estos Resultados apoyan la hipótesis de que el sistema IGFs modula la diferenciación funcional de las células de Leydig en el THP.

0465 (252) ADENOSINA ACTÚA COMO COMUNICADOR INTERCELULAR POR MECANISMOS QUE INVOLUCRAN SU INGRESO A LA CÉLULA. M N Galarido¹, M F Riera¹, E H Pellizzari¹, C M Sobarzo², B Denduchis², L Lustig², S B Cigorraga¹, S B Meroni¹

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET); ²Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires <smeroni@cedie.org.ar>

Las señales extracelulares controlan los procesos metabólicos de la célula y el crecimiento y diferenciación de los tejidos. Se interpreta clásicamente que la respuesta biológica a dichas señales es el resultado de la unión a sus receptores específicos, sin embargo, podrían existir mecanismos alternativos. Nos propusimos analizar posibles acciones de adenosina (A) no mediadas por unión a receptores purinérgicos. Como modelo experimental se utilizó el cultivo de células de Sertoli (CS) estimuladas con A (1mM) o con un análogo de A que no entra a la célula pero se une al receptor, ciclohexiladenosina, (CHA 0,1 mM). Los Resultados se expresan como X \pm DS, n=3, * $p < 0,05$ vs basal (B). Se observó que A pero no CHA aumenta la producción de lactato (B: 4,2 \pm 0,7; A: 9,5 \pm 1,3*; CHA: 4,1 \pm 0,5 ig/ig ADN), la incorporación de glucosa a la célula (B: 415 \pm 21; A: 620 \pm 32*; CHA: 422 \pm 18 dpm/ig ADN) y el ARNm de GLUT1, MCT4 y LDH A (GLUT1: 2,8 \pm 0,7*; MCT4: 2,2 \pm 0,5*; LDH A: 2,9 \pm 0,8*, veces de estímulo vs B). A también activó AMPK (kinasa activada por AMP) ya que se evidenció un incremento en la fosforilación de su sustrato, acetil-CoA carboxilasa. Dado que en una línea celular AMPK ha sido relacionada con la formación de uniones estrechas (UE) y que en CS las UE son esenciales para la formación de los compartimientos basal y apical del túbulo seminífero, se decidió analizar por inmunofluorescencia el efecto de A y CHA sobre la localización de Zonula Occludens-1 (ZO-1), proteína asociada a UE. La disminución del calcio extracelular por agregado de EGTA 1,8 mM a las monocapas produjo internalización de ZO-1. La incubación simultánea con A pero no con CHA mantuvo la localización de ZO-1 en la periferia celular, efecto que fue bloqueado por la presencia de los inhibidores de adenosina kinasa (iodotubercidina 10 nM) y de AMPK (Compound C 20 iM). Los Resultados demuestran que A puede regular la funcionalidad y la polaridad celular luego de su ingreso a la célula y de la activación de AMPK.

0466 (260) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT EN EL NUEVO ROL DE VEGFA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS FOLICULARES OVÁRICAS. D Abramovich¹, F Parborell¹, G Iruستا¹, M Tesone¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET <abramovich@dna.uba.ar>

VEGFA es uno de los principales factores involucrados en la angiogénesis ovárica, expresándose junto con su receptor (FLK1) en células de granulosa (CG) y teca (CT). En estudios previos mostramos que la administración de un inhibidor de VEGFA (Trap) intrabursa en ovario de rata produce un aumento en la apoptosis de células foliculares, provocando una disminución en el número de folículos periovulatorios y un aumento en el número de folículos

atrésicos. En otros tejidos, se observó que el VEGFA está involucrado en la inhibición de la apoptosis y en el aumento de la proliferación celular a través de la vía de señalización PI3K/AKT. **Objetivo:** Evaluar si la inhibición de VEGFA afecta la proliferación de las células ováricas y estudiar si la vía de PI3K/AKT está involucrada en este proceso. Ratas prepúberes tratadas con eCG fueron inyectadas con un inhibidor de VEGFA (Trap) en un ovario y el contralateral fue inyectado con hlgG (control). Los ovarios fueron extraídos a las 4, 8, 12 o 48 hs y procesados para inmunohistoquímica del factor de Von Willebrand y de PCNA. Folículos antrales (300-450 μ m) aislados por microdissección se utilizaron para Western blots. El grupo Trap mostró una disminución en la fosforilación de AKT (4h control: $0,48 \pm 0,09$, 4h Trap: $0,27 \pm 0,09$; $p < 0,05$; 8 h control: $0,69 \pm 0,19$; 8h Trap: $0,23 \pm 0,04$; $p < 0,05$) y de BAD (4h control: $2,30 \pm 0,53$, 4h Trap: $1,62 \pm 0,64$; $p < 0,05$; 8h control: $0,88 \pm 0,18$, 8h Trap: $0,47 \pm 0,12$; $p < 0,05$) a las 4 y a las 8 hs post inyección y una disminución en la expresión de PCNA en CG y CT (CG: control: $55,84 \pm 3,05\%$; Trap: $36,40 \pm 2,37\%$; CT: control: $46,63 \pm 2,95\%$; Trap: $27,33 \pm 3,12\%$; $p < 0,01$). No se observaron diferencias a las 12 o 48 hs. Tampoco hubo diferencias en el grado de vascularización ni en la expresión de Flk1. **Conclusión:** El bloqueo in vivo de la acción de VEGFA en el ovario produce una disminución en la proliferación de las células foliculares y la vía de PI3K/AKT estaría involucrada en este mecanismo.

0467 (9) ANEXINAS EN LA INTERACCIÓN ESPERMATOZOIDE-OVIDUCTO. J M Teijeiro ^{1,2}, G G Igotz ³, P E Marini ^{1,2}

¹IBR-CONICET; ²FAC CS BIOQ Y FARM. UNR; ³DEPARTMENT OF BIOMEDICAL SCIENCES. CORNELL UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE ITHACA. NEW YORK <teijeiro@ibr.gov.ar>

El oviducto es un órgano dinámico, que en mamíferos regula las funciones de las gametas. La interacción entre el espermatozoide y el oviducto genera un reservorio que selecciona espermatozoides con ciertas características. En cerdos (*Sus scrofa*), purificamos y caracterizamos SBG (Sperm Binding Glycoprotein), una proteína de oviducto, que estaría involucrada en un tipo de selección negativa de espermatozoides. En el presente trabajo, aislamos otra proteína de oviducto de cerdo que interacciona con membranas periacrosomales de espermatozoides en columnas de cromatografía de afinidad. El análisis de espectrometría de masa (LC/MS-MS) permitió identificar a anexina A2 como componente mayoritario de la banda de mayor peso molecular resuelta en geles de poliacrilamida y dos componentes minoritarios anexina A1 y A5. La presencia de las tres proteínas en oviducto de cerdo fue corroborada mediante western blot y su localización establecida por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos. Basados en estos Resultados y en publicaciones previas que proponen a las anexinas como candidatas a receptores de espermatozoides en vaca (*Bos taurus*), planteamos que estas proteínas están involucradas en la interacción entre los espermatozoides y el oviducto que lleva a la formación de un reservorio, siendo anexina A2 la principal isoforma que une espermatozoides.

0468 (387) BÚSQUEDA DE SERIN PROTEASA EN ESPERMATOZOIDES DE MAMÍFEROS A TRAVÉS DE PROTEÓMICA. G P Tejón ¹, A Cesari ¹

¹Instituto de Investigaciones Biológicas, UNMdP <acesari@mdp.edu.ar>

Las serin proteasas (SP) tienen un rol importante en la fertilización, ya que este proceso es afectado en presencia de inhibidores específicos. Se han reportado en citosol, fracción soluble del acrosoma, membrana plasmática y membranas acrosomales de espermatozoides (Ez) de varias especies de mamíferos, relacionándose su localización con su función y mecanismo de regulación. Su estudio se ha basado en estrategias bioquímicas de purificación y clonado a partir de la expresión de sus transcritos en el

testículo. Con el objetivo de identificar a través de la proteómica, las SP de Ez de ratón presentes en membrana y en la fracción soluble, se realizó un fraccionamiento subcelular y se utilizó una columna de afinidad de p-amino-benzamida agarosa con el fin de enriquecer en SP cada una de las fracciones. Las proteínas eluidas fueron separadas en geles de poliacrilamida en 1D. Para la identificación se utilizaron dos estrategias: a) se analizó por espectrometría de masa (MS/MS) la calle completa de las eluciones obtenidas para cada una de las fracciones subcelulares seccionada en 24 fragmentos; b) las proteínas teñidas por nitrato de plata se cortaron y se analizaron por MS. Las proteínas fueron identificadas contrastando con la base de datos de *Mus musculus* mediante el programa MASCOT y los Resultados fueron analizados en búsqueda de dominios conservados (Specialized BLAST, NCBI) y homología con SP (MEROPS). Se identificaron 3 SP en la fracción de proteínas de membrana de Ez de ratón que no habían sido reportadas anteriormente en testículo ni en células germinales y 3 proteínas con baja homología con SP. Curiosamente, no se identificó ninguna SP reportada en Ez de ratón. En cambio, en ambas fracciones subcelulares se identificaron 5 inhibidores de SP y 3 proteínas con dominios de afinidad por SP. Esto podría explicarse por la formación de complejos macromoleculares que incluyen SP e inhibidores, los cuales constituirán la base de la regulación de la proteólisis.

0469 (450) IMPACTO DE LA DIETA EN LA BIOLOGÍA DE LA GAMETA MASCULINA: EFECTO DEL COLESTEROL Y ACEITE DE OLIVA. E Saez Lancellotti ¹, P Boarelli ¹, S Espínola ¹, F Cerutti ¹, A Hualpa ¹, M Fornés ¹

¹IHEM <mfornes@fcm.uncu.edu.ar>

Una dieta rica en grasas saturadas puede desencadenar el desarrollo de hipercolesterolemia (aumento sanguíneo de colesterol), lo cual contribuye a la aparición de arteriosclerosis y de enfermedades cardiovasculares. Se ha propuesto que variaciones en la dieta conllevan a cambios de membrana plasmática con consecuencias en la fisiología celular. Nuestro modelo involucra como célula blanco al espermatozoide (E). El presente trabajo busca establecer los efectos de las dietas hipercolesterolémica (HC) y mediterránea (enriquecida con aceite de oliva) (MD) en E de conejo. Las dietas específicas se generaron suplementando el alimento balanceado para conejos con grasa vacuna (16%) o aceite de oliva extra virgen de producción local (14%). En el modelo HC la colesterolemia aumenta significativamente ($p > 0,05$) ($121,8 \pm 5,3$ mg/dl vs control $20,4 \pm 2,7$ mg/dl). Estos cambios generales pueden verse reflejados a nivel celular-espermático como variaciones en la distribución lipídica subcelular, menor motilidad total ($53,6 \pm 5,9$ % vs control $72,4 \pm 3,4$ %) y disminución significativa ($p > 0,05$) del porcentaje de E que experimentan reacción acrosomal (20% respecto del control). Cuando la dieta se encuentra enriquecida con aceite de oliva, mejora la integridad de la membrana plasmática y aumenta significativamente ($p > 0,05$) el índice de reacción acrosomal (66% respecto del control). Las diferentes dietas no provocan cambios significativos en parámetros como peso de los animales (control: $3,94 \pm 0,5$ kg; HC: $3,77 \pm 0,33$ kg; DM $3,81 \pm 0,56$ kg), libido y características físicas del semen. En conclusión, los Resultados muestran que la alta ingesta de grasas saturadas afecta negativamente las características seminales de conejos. La composición lipídica y funciones específicas de E son sensibles a la manipulación dietaria. Estos estudios indicarían que el enriquecimiento del régimen con aceite de oliva está asociado a una mejora en la calidad seminal.

0470 (182) AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA OVIDUCTAL HUMAN QUE INTERACTÚA CON LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS. C M Zumoffen ¹, A Caille ¹, M J Munuce ¹, M Cabada ², S Ghersevich ¹

¹Laboratorio de Estudios Reproductivos Área Bioquímica Clínica Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas Universidad Nacional de Rosario; ²Área de Biología, Instituto de

*Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR -CONICET)
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas Univer-
sidad Nacional de Rosario. <czumoffen@hotmail.com>*

Previamente hemos detectado una proteína de 79 kDa en el medio condicionado (MC) de cultivo de tejido oviductal humano (TOh) que podía unirse a espermatozoides humanos (Esp). Nuestro objetivo fue aislar e identificar dicha proteína, estudiar su presencia en MC, fluido oviductal nativo (FOn) y su inmunolocalización en TOh. El TOh de pacientes premenopáusicas fue cultivado a 37 °C y 5 % CO₂ en DMEM/Ham F12 por 24 h, seguido por una incubación con [³⁵S]-Met (30 iCi/ml), para obtener las proteínas sintetizadas *de novo*. Al terminar la incubación se colectaron los MC. El FOn se recuperó lavando el interior de las trompas con medio DMEM/Ham F12. Se preparó una cromatografía de afinidad con extractos de membrana de Esp móviles (swim up) de muestras de donantes normozoospermicos (n=4), acoplados a un soporte de Sepharosa 4B, en la cual se sembraron los MC. Las fracciones proteicas eluidas se analizaron por SDS-PAGE (10%) y la banda correspondiente a una proteína de 79 kDa se investigó por LC-MS/MS. Mediante anticuerpos específicos, la presencia de la proteína identificada fue estudiada por Western blot (WB) en FOn, MC y homogenado de TOh, y fue inmunolocalizada en cortes de TOh. Se encontraron al menos 5 bandas de [³⁵S]-Met-proteínas (127 kDa, 94 kDa, 79 kDa, 17 kDa y 15 kDa) en el eluido de la cromatografía. La banda proteica de 79 kDa fue identificada como lactoferrina humana (hLF). La presencia de hLF fue confirmada por WB en FOn, MC y TOh. La hLF se observó fundamentalmente en la región apical de las células epiteliales del TOh. En el presente trabajo varias proteínas con capacidad de interactuar con el Esp fueron detectadas. Una de estas proteínas (79 kDa) fue identificada como hLF e inmunodetectada en FOn, MC y TOh. En el TOh la hLF se localizó preferentemente en el epitelio oviductal. Estos Resultados apoyan la hipótesis que algunas proteínas oviductales interactúan con los Esp y podrían modular la función del Esp y/o el proceso de fecundación. PICT 0115092 FONCyT

REPRODUCCION O2

0471 (2) LA EXPRESIÓN DE LEPTINA EN CÉLULAS PLACENTARIAS ES REGULADA POR ESTRADIOL. Y P Gambino¹, J L Maymó¹, V Sánchez Margalet², J C Calvo¹, C L Varone¹

¹DPTO QUÍMICA BIOLÓGICA FCEN UBA; ²HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN MACARENA, SEVILLA; ³INSTITUTO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL <yesupao@yahoo.com.ar>

La leptina es una hormona proteica que cumple importantes funciones en la reproducción y en el embarazo. Esta proteína y su receptor se detectaron en varios tipos celulares involucrados en la gestación, y se sugiere que la misma participa en el desarrollo embrionario y en la implantación. Sin embargo, aún no se conoce completamente cómo se regula su expresión en placenta en condiciones normales o patológicas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del estradiol sobre la expresión de leptina, empleando explantos de placentas humanas normales a término y la línea celular trofoblástica BeWo. Por western blot se observó que al incubar los explantos placentarios con 1 nM de estradiol la expresión de leptina aumentó 4±1 veces (p<0,01). Este efecto es dosis y tiempo dependiente y es inhibido en presencia de 10 nM del antagonista ICI 182,780, confirmando la especificidad de la inducción. En células BeWo se obtuvieron Resultados similares. Se evaluó la regulación de la actividad del promotor de leptina mediante ensayos de transfección transiente. En presencia del vector conteniendo la región promotora desde -1951pb río arriba del gen reportero luc, una dosis de 100 nM de estradiol incrementa la actividad promotora de leptina en un máximo de 4,4±1,1 veces (p<0,05). Este efecto es dosis dependiente y se ve inhibido en presencia de ICI 182,780. La inducción por estradiol se pierde al utilizar la región promotora de hasta -1546pb, pero se conserva al emplear la región desde -1951 a -1847 pb. Esta regula-

ción está sustentada por la identificación de elementos en este promotor relacionados con la acción de estradiol. Por otro lado utilizando el análogo estradiol-BSA, se determinó que el efecto del estradiol podría involucrar al receptor ER y a receptores de membrana. Estos Resultados muestran que el estradiol participa en la regulación de la expresión de leptina placentaria y refuerza la idea de la importante función de la leptina en el diálogo endometrio-embrión.

0472 (276) PARTICIPACIÓN DE VIP EN LA VENTANA PERIPLANTATORIA EN SITIOS DE IMPLANTACIÓN NORMALES Y EN PROCESO DE REABSORCIÓN EN RATONES NOD. V I Roca¹, L Larocca¹, M Calafat¹, R Ramhorst², M Farina³, C Perez Leiros¹

¹LABORATORIO DE INMUNOFARMACOLOGÍA, DEPTO. DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FCEN-UBA; ²LABORATORIO DE INMUNOFARMACOLOGÍA, DEPTO. DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FCEN-UBA, Laboratorio de Inmunogenética, FMED-UBA; ³LABORATORIO DE FISIOLÓGIA DE LA PREÑEZ Y EL PARTO, CEFyBO-FMED-UBA <vroca@qb.fcen.uba.ar>

El éxito de la preñez esta asociado a un estado tolerogénico hacia antígenos fetales. En él participan diversos mediadores, hormonas y citoquinas. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) podría tener un rol como mediador, ya que induce inmunotolerancia y estimula el crecimiento embrionario. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) son un buen modelo para estudiar la preñez en un contexto autoinmune. En trabajos anteriores, describimos una alteración de la señalización y falta de respuesta al VIP en el útero de hembras NOD de 16 semanas, junto con un aumento de citoquinas Th1 en suero. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de VIP y otros mediadores en la ventana perimplantatoria en sitios de implantación normales y en proceso de reabsorción. Hembras NOD y BALB/c (control) de 16 semanas preñadas fueron sacrificadas en el día 9 de gestación y se obtuvieron muestras de suero y explantes de sitios de implantación (SI). Se determinó progesterona (P) por RIA, expresión de Foxp3 y LIF por western blot y de VIP por RT-PCR. Observamos un índice de reabsorción de 32 % en hembras NOD, junto a una menor concentración sérica de progesterona (ng/ml; X ± SEM: NOD 8,5±1,2, BALB/c 28,9 ±5,7 p<0,01). En hembras NOD, observamos una disminución de la expresión de Foxp3 y LIF en explantes de SI en proceso de reabsorción vs. explantes normales y menor progesterona sérica (ng/ml; X ± SEM: NOD Reabsorbido 3,2±0,2 vs NOD p<0,05). VIP aumento la expresión de ambos en sitios normales de hembras NOD. Evaluamos los niveles de mRNA de VIP en explantes de SI. Los ratones NOD presentan una disminución de la expresión de VIP en sitios normales comparados con sitios reabsorbidos (p<0,05). Concluimos que en el proceso de reabsorción embrionaria en los ratones NOD se encuentran disminuidos la expresión de Foxp3, LIF y VIP en los SI y la progesterona en suero

0473 (443) REGULACIÓN DE AQP9 EN PLACENTAS HUMANAS MEDIANTE INSULINA E HIPOXIA. M Castro Parodi¹, V Dietrich¹, B Maskin², M Farina³, A E Damiano¹

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.; ²Hospital Nacional Prof Dr Alejandro Posadas; ³CEFyBO-CONICET <macmor@yahoo.com.ar>

La Preclampsia (PE) es un desorden hipertensivo exclusivo de la gestación humana, de etiología desconocida caracterizada por una invasión superficial del trofoblasto dando lugar a un tejido relativamente hipóxico que lleva a una sobre-expresión del factor inducible por hipoxia HIF-1. Estas alteraciones pueden afectar las funciones de transporte del sincitiotrofoblasto (STh). Previamente, reportamos que la expresión proteica de AQP9 esta aumentada 2,5 veces en placentas preeclámpticas, pero es ineficiente en

el transporte de agua. Se sabe que el gen de AQP9 posee un elemento de respuesta negativo a la insulina que podría modular su expresión. Nuestro propósito es determinar si la hipoxia y la insulina modulan la expresión de AQP9 en PE. Para ello, dosamos insulina plasmática en mujeres embarazadas con y sin PE y los comparamos con la expresión de AQP9 en Sth. Además, cultivamos explantos de placenta normal y preecláptica, en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia/reoxigenación, con distintas dosis de insulina, y evaluamos la expresión y localización de AQP9. La mujeres que desarrollan PE presentan un aumento en la concentración plasmática de insulina (19 ± 6 vs 8 ± 1 uUI insulina/mL, $n=25$, $p<0,05$), sin embargo, a pesar de la hiperinsulinemia, la expresión de AQP9 está aumentada significativamente en el Sth. Por otra parte, los explantos normales tratados con insulina muestran una disminución dosis dependiente de la expresión de AQP9, mientras que explantos de placentas preeclápticas no revelan modificaciones significativas ($n=5$, $p<0,05$). Los explantos de placentas normales cultivados en condiciones de hipoxia, muestran una disminución del 40% de los niveles proteicos de AQP9 ($n=5$, $p<0,05$) que revierte con la reoxigenación. Estos Resultados sugieren que la insulina y la hipoxia/reoxigenación modularían la expresión de AQP9, ejerciendo un efecto sinérgico en la PE.

0474 (197) DESEQUILIBRIO EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE RECEPTORES ESTEROIDES EN OVARIOS DE OVINOS TRATADOS PRENATALMENTE CON ANDRÓGENOS AROMATIZABLES Y NO AROMATIZABLES. H H Ortega¹, N R Salvetti¹, V Padmanabhan²

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral;
²Department of Pediatrics and the Reproductive Sciences Program, University of Michigan <hortega@fcv.unl.edu.ar>

Las hormonas esteroides juegan un rol importante en la función ovárica y los receptores a través de los que cumplen sus acciones varían su expresión de acuerdo al desarrollo, estadio folicular y tipo celular en el que se encuentran. La alteración en la expresión de los receptores afecta la formación y diferenciación folicular. En este estudio, utilizando un modelo experimental de administración prenatal de testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT) en hembras ovinas, se propuso como hipótesis que el exceso de andrógenos prenatales altera la progresión en la expresión proteica de receptores hormonales. Se usaron hembras ovinas Suffolk preñadas, las que fueron inyectadas con 100 mg (IM, dos veces por semana) de propionato de testosterona o dihidrotestosterona (andrógeno no aromatizable) desde el día 30 al 90 de la gestación. Se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión de los receptores de estrógenos (RE) á, REâ, de andrógenos (RA), y de progesterona (RP) en fetos (días 90 y 140), animales pospuberales (10 meses) y adultos (21 meses, solamente en el grupo tratado con testosterona). La exposición prenatal a T y DHT indujo un aumento selectivo en la expresión de los RA en las células del estroma y granulosa en los ovarios fetales a los días 90 y 140 de gestación. En los animales de 10 y 21 meses tratados con T se observó además un incremento del REâ y una disminución en el REâ. No hubo diferencias en la expresión del RP en ninguno de los grupos estudiados. Estos hallazgos nos permiten concluir que el incremento en los RA es el primer paso en el desarrollo ovárico alterado en las hembras tratadas con T y DHT prenatalmente. Por otra parte, la manifestación posnatal de la disfunción ovárica se observa en el desequilibrio de la expresión proteica de RE/RA, influenciada diferencialmente por la exposición a andrógenos/estrógenos, lo que lleva a un microambiente folicular con dominancia de andrógenos, hecho que culmina en la persistencia folicular.

0475 (221) FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF): NUEVO ROL DE SUPERVIVENCIA

EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE RATA. G Irusta¹, D Abramovich¹, F Parborell¹, M Tesone¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET <girusta@dna.uba.ar>

VEGFA es uno de los principales factores involucrados en la formación de nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo folicular en el ovario. Este factor ejerce su acción a través de su receptor principal KDR (VEGFR2 o FLK1). Además, VEGFA es un factor de supervivencia en células endoteliales y miocitos, y es citoprotector en neuronas disminuyendo la apoptosis y estimulando la neurogénesis. En el ovario, VEGFA actúa como un factor de supervivencia en folículos ováricos de bovinos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de VEGF en folículos ováricos de rata. Se realizaron experimentos *in vitro* para los cuales se inyectaron ratas prepúberes (23-25 días) con DES (diétilstilbestrol) durante tres días consecutivos. Se aislaron folículos antrales por microdissección y se incubaron en ausencia de estímulos (Basal) o en presencia de FSH (20ng/ml) o VEGFA (50ng/ml o 100 ng/ml). Se extrajeron proteínas para la realización de Western blot de las proteínas PCNA y caspasa-3 y además se extrajo ADN para medir su fragmentación (ladder) en geles de agarosa. En los folículos incubados en presencia de VEGFA100 (100 ng/ml) se observó un aumento significativo en el contenido de la proteína PCNA respecto a los folículos incubados en ausencia de estímulos (Basal: $0,38 \pm 0,09$ vs VEGFA100: $1,04 \pm 0,22$, $p<0,05$). Tanto FSH como VEGFA50 (50ng/ml) disminuyeron significativamente el clivaje de caspasa-3 comparado a folículos incubados en condiciones basales (B: $0,58 \pm 0,05$; FSH: $0,27 \pm 0,05$; VEGFA50: $0,26 \pm 0,04$; $p<0,05$). Además, FSH y VEGFA disminuyeron significativamente la fragmentación apoptótica de ADN respecto a las condiciones basales de incubación (B: $216,7 \pm 17,54$; FSH: $107,1 \pm 7,24$; VEGFA50: $139,5 \pm 12,4$; VEGFA100: $118 \pm 24,7$; $p<0,05$). Conclusión: estos Resultados sugieren que VEGFA se comportaría como un factor de supervivencia en folículos ováricos de rata, aumentando la proliferación de las células foliculares y disminuyendo su apoptosis.

0476 (247) EFECTOS LOCALES DE ESFINGOSINA 1 FOSFATO (S1P) EN LA LUTEÓLISIS INDUCIDA POR PROSTAGLANDINA F2ALFA EN RATAS PREÑADAS. S F Hernandez¹, M C Peluffo^{2,3}, G Irusta¹, R L Stouffer³, M Tesone¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET;
²Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET;
³Oregon National Primate Research Center-OHSU <hernandez@dna.uba.ar>

La apoptosis ha sido relacionada con la regresión del Cuerpo Luteo (CL) en distintas especies. La Esfingosina 1 Fosfato (S1P) posee un papel importante en la proliferación celular, supervivencia y apoptosis. **Objetivo:** determinar si el agente antiapoptótico S1P bloquea la acción luteolítica de la PGF2â en la rata. Se utilizaron ratas preñadas inyectadas intrabursa con S1P (10 mg/ovario) o vehículo (control) en el día 19 de preñez. Dos hs después se inyectaron los 2 grupos con PGF2â y los animales se sacrificaron a las 4, 24 y 36 hs. Se aislaron los CLs para determinar la fosforilación de AKT por ELISA y medir el contenido tisular de progesterona luteal mediante RIA. Además, se midió la actividad de caspasas involucradas en los eventos iniciales (caspasa -2, -8, -9) y finales (caspasa-3) de la apoptosis, se cuantificó el número de células apoptóticas mediante la técnica de TUNEL y se evaluaron estructuras celulares por microscopía electrónica (ME). Se observó un aumento significativo en los niveles de fosforilación de AKT en el grupo S1P (C: $19,5 \pm 0,2$ vs S1P: $24,7 \pm 0,8$ U/ml; $p<0,05$). La progesterona luteal mostró una tendencia a aumentar luego de 24 hs en el grupo S1P. La actividad de las caspasas -2, -3 y -8 disminuyó respecto del grupo control ($p<0,05$), no observándose diferencias en la actividad de la caspasa-9. Se observó una disminución en el porcentaje de células apoptóticas en

los CLs del grupo S1P comparado al grupo control (C: 3.2 ± 0.3 vs S1P: 0.3 ± 0.1 ; $p < 0.001$). Las imágenes de ME a las 36 hs de sacrificio revelaron parámetros de muerte celular por apoptosis en CL aislados del grupo control, por el contrario, no se observaron estructuras apoptóticas en CLs del grupo S1P. Conclusión: Estos Resultados sugieren que en roedores S1P bloquea la acción luteolítica de PGF-2a en los estadios finales de preñez a través de la inhibición de la apoptosis luteal.

0477 (288) LA EXPOSICION NEONATAL A BISFENOL A (BPA) ALTERA LA DINAMICA FOLICULAR EN LA CORDERA. Q Rivera¹, J Varayoud², H A Rodríguez², C E Di Mauro¹, M Muñoz deToro², E H Luque²

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora.; ²Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. <enriquehluque@aol.com>

La exposición a perturbadores endocrinos con actividad estrogénica (xenoestrógenos) puede afectar el desarrollo del ovario y provocar alteraciones endocrinas. Nuestra hipótesis propone que la exposición postnatal temprana de corderas a xenoestrógenos afecta el desarrollo folicular. Se expusieron corderas (vía sc) desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta DPN14 a dosis bajas de Dietilstilbestrol (DES) (5 ig/kg), BPA (50 ig/kg), vehículo (C). El DPN30 se extrajeron los ovarios, se pesaron e incluyeron en parafina. En cortes seriados se determinó la dinámica folicular y la expresión inmunohistoquímica de Receptores de estrógenos á (REá), Andrógenos (RA), Ki-67 (marcador de proliferación celular) y p27 (inhibidor de cdk asociado a arresto celular). El BPA disminuyó el peso del ovario ($p < 0.05$) sin cambiar el nº total de folículos. Las corderas expuestas a BPA y DES mostraron menor nº de folículos primordiales y mayor nº de folículos de transición y primarios ($p < 0.05$). Las corderas expuestas a BPA presentaron incremento de folículos antrales atrésicos y de la expresión de p27. Además, las corderas expuestas a BPA tuvieron mayor proliferación de las CG y de la teca ($p < 0.05$) en los folículos antrales. Por último, observamos que el BPA aumentó la incidencia de folículos poliovulares (C= 4.24 ± 1.1 vs BPA= 18.22 ± 3.9 , $p < 0.05$). No se detectó expresión de REá en los ovarios de ningún grupo. Se observó expresión de RA en ovocitos, células de la granulosa (CG) y estromales, sin diferencias entre los grupos. La inducción de la transición de folículos primordiales a primarios junto con el incremento en la proliferación de CG/teca provocado por la exposición a BPA, son alteraciones semejantes a las descritas en el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP); patología endocrina muy frecuente en la mujer. La similitud entre los efectos ováricos de la exposición a BPA y los del SOP, podría contribuir a explicar el aumento en la incidencia de esta patología ginecológica.

0478 (301) INFLUENCIA DEL SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA EN EL PRIMER CICLO ESTRAL.

C G Escudero^{1,2}, S Delgado^{1,2}, A Anzulovich^{1,2}, A Rastilla^{1,2}

¹LABIR; ²UNSL <carlaescudero@hotmail.com>

Es sabido que el ovario (O) de mamíferos es influenciado por factores neurales. La mayoría de las fibras que constituyen una de las vías de inervación, hacen sinapsis en el ganglio celiaco (GC), alcanzando el ovario a través del nervio ovárico superior (NOS). El objetivo del trabajo fue estudiar la acción de Noradrenalina (NA) y Acetilcolina (Ach) en GC sobre la liberación ovárica de androstenediona (A₂), estradiol (E₂) y la expresión de la P450 aromatasa (P450 arom), durante el primer ciclo estral

(proestro, estro y diestro II) en la rata. Se usó el sistema ex-vivo 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 Krebs-Ringer 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. La liberación de las hormonas se midió por RIA. Al final de la incubación, los ovarios fueron separados del sistema para determinar la expresión de la P450 arom por Real Time PCR. Estadística: Student con significancia ($p < 0.05$) respecto al control. Resultados: A₂ aumentó con ambos neurotransmisores en proestro y estro. En diestro aumentó también la liberación de A₂ con NA, mientras que Ach mostró un efecto inhibitorio. En cuanto a la liberación de E₂, aumentó en el diestro con NA y en el proestro y diestro con Ach. En todos los estadios se observaron diferencias en la expresión P450-Aromatasa entre controles y estimuladas, siendo NA estimuladora en el proestro y Ach estimuladora en estro y diestro. Por lo tanto la influencia neural directa participa en la fisiología ovárica en el primer ciclo, a través de estímulos adrenérgicos y colinérgicos provenientes del GC, de acuerdo a la etapa del mismo. Lo que indicaría que el efecto observado sobre la fisiología ovárica se debe no sólo a la liberación de esteroides ováricos sino también a la influencia del sistema nervioso periférico.

REPRODUCCION 03

0479 (458) LAS CÉLULAS DEL CUERPO LÚTEO COMO PRESENTADORAS DE ANTÍGENO DURANTE LA LUTEOLISIS. MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS B7.1 Y B7.2 POR HIPERANDROGENISMO Y TRATAMIENTO CON METFORMINA.. V A Sander¹, A B Motta¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO)- Universidad de Buenos Aires (UBA)/ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) <valeriasander@hotmail.com>

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es un orden caracterizado por hiperandrogenismo, oligo-anovulación y asociado a alteraciones inmunológicas. La Metformina (M) se usa en el tratamiento de SOP pero sin un completo conocimiento de su mecanismo de acción. Dado que la presentación antigénica es fundamental en la luteólisis (L) y que en otros sistemas la molécula co-estimuladora B7.1 regula la vía de las caspasas en la célula presentadora de antígeno y se relaciona con respuestas Th1 (eventos citotóxicos) nuestro objetivo fue estudiar el efecto del hiperandrogenismo en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II, las moléculas B7.1 y B7.2 y la apoptosis (A) en la L y el posible rol del tratamiento con M. Ratas prepúberes Wistar recibieron i.p. 10 UI de eCG y 10 UI de hCG 48 h después, día 0 : ovulación, L: día 14. En los días 12 y 13 el grupo (D) fue inyectado con dehidroepiandrosterona (D: 60 mg/kg peso sc), el grupo (D+M) recibió D y M (M:50 mg/kg peso oral), el grupo (M) recibió sólo M y el grupo C vehículos. En el día 14 se sacrificaron los animales y se evaluó en células ováricas la expresión de MHC II, B7.1 y B7.2 y la A por citometría de flujo. Ni la expresión de MHC II ni la proporción de células que presentaban B7.1 y B7.2 variaron. La expresión de B7.1 fue mayor en D (26 ± 4 % vs C: 6 ± 2 %, $p < 0.05$) y la de D+M (19 ± 2 %) similar a C. La de B7.2 en D (5.8 ± 0.3 , $p < 0.01$), en D+M (7.8 ± 1.4 , $p < 0.05$) y M (8.4 ± 1.9 , $p < 0.05$) fue menor que C (15.4 ± 1.4). La A fue mayor en D (30 ± 2 % vs C: 24 ± 2 % $p < 0.01$) mientras que en D+M y M semejantes a C. Dado que la apoptosis y la expresión de B7.1 solo fueron mayores en D y revertidos en D+M, mientras que la de B7.2 fueron menores en D y D+M respecto de C y la de MHC II no se modificó, concluimos que la hiperandrogenización aumenta la

apoptosis ovárica probablemente via el aumento de la expresión de B7.1. La M restablece los niveles de B7.1 y revierte la apoptosis.

0480 (500) EVALUACIÓN DEL ESTADO ENDOMETRIAL DE PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIOS POLIQUÍSTICOS (SOP) NO RESPONDEDORAS AL TRATAMIENTO CON METFORMINA. E. Elia¹, E. Lombardi², C. Pustovrh³, G. Di Girolamo², L. Devoto³, A. Motta¹

¹CEFYBO-CONICET-UBA; ²Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA; ³Instituto de Investigaciones Materno Infantil (IDIMI), Hospital San Borja Arriarán, Universidad de Chile <evelinmariel@hotmail.com>

El 82% de las mujeres que sufren abortos recurrentes padecen SOP. En el tratamiento del SOP, frecuentemente se usa Metformina (M), droga que en muchos casos permite el embarazo exitoso pero cuyo mecanismo de acción se desconoce. El objetivo fue evaluar el estado endometrial de pacientes SOP que no habían respondido al tratamiento con M dado que no lograron embarazo. Se tomaron muestras de sangre y de endometrio, previa firma de consentimiento. Al grupo control (C: n=8) se le realizó laparoscopia para diagnóstico de patología no ovárica. Otro grupo fue SOP (n=10) y el tercer grupo fueron mujeres SOP tratadas con M (1500 mg/día) (SOP+M: n=8). En mujeres SOP los niveles de LH eran mayores que los C y M lo revirtió (C:4.1±2.8; SOP:13.7±3.1; SOP+M:6.9±2.2mUI/ml; P<0.01). No hallamos alteraciones en los niveles de FSH, Prolactina, Androstenediona ni Glucemia. Al analizar la histología uterina, por tinción con hematoxilina-eosina encontramos en los endometrios SOP escaso edema en el estroma, glándulas de tipo tubuladas estrechas con vacuola subnuclear y epitelio glandular de tipo pseudoestratificado. El grupo SOP+M tenía glándulas que adquirirían cambios secretorios: secreción glandular y vacuola subnuclear desplazada hacia la superficie luminal. El número de núcleos apoptóticos, evaluado por incorporación de fluoresceína-12-dUTP al ADN (TUNEL) en los endometrios SOP (0.019±0,002; P<0.05) fue superior a los C (0.01±0,0006) y SOP+M (0.013±0,001) los revirtió. Concluimos que: La histología endometrial del grupo SOP se halla detenida en fase proliferativa. Los niveles de apoptosis endometrial en el grupo SOP se encuentran aumentados. El grupo SOP+M que representa a mujeres no respondedoras a M revierte la apoptosis endometrial y presenta cambios de la histología hacia estadios secretorios pero que no son suficientes para lograr la implantación (patrón similar al observado en mujeres con fallas de implantación sin patología ovárica).

0481 (351) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN AGONISTA DE GnRH EN EL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS) DESARROLLADO EN ROEDOR. S. F. Hernandez¹, L. Scotti¹, M. Tesone^{1,2}, F. Parborell¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; ²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A. <hernandez@dna.uba.ar>

El Síndrome de Hiperestimulación Ovárica (OHSS) es una complicación iatrogénica ocasionada por la inducción de la ovulación en tratamientos de fertilización asistida, que involucra una sobreproducción de hormonas esteroideas y sustancias vasoactivas como el VEGF. Estos factores contribuyen al aumento de permeabilidad vascular y a la formación de quistes ováricos. El objetivo del presente estudio fue analizar el efecto *in vivo* de un agonista de GnRH (LA) en un modelo de OHSS desarrollado en roedor sobre la esteroidogénesis, el desarrollo folicular y formación del cuerpo lúteo (CL), la apoptosis ovárica y la expresión de VEGF. Se utilizaron ratas hembras prepúberes y se dividieron en 3 grupos. El grupo control fue inyectado con PMSG (10 UI) y luego de 48 hs con hCG (10 UI) para inducir la ovulación. El grupo OHSS fue inyectado con altas dosis de PMSG (50 UI/día) duran-

te 4 días y luego de 24 hs se le inyectó hCG (25 UI). El grupo OHSS+LA recibió además LA (100 ig/kg/día) desde el primer día de PMSG y luego de 24 hs de la última inyección, se inyectó hCG (25 UI). Las ratas de sacrificio 48 hs después de la inyección de hCG. Se observó un aumento de la progesterona y el estradiol sérico en el grupo OHSS con respecto al grupo control (p<0,001) y el LA disminuyó los niveles de estos esteroides (p<0,001). En cortes histológicos en el grupo OHSS+LA hubo un aumento en el % de folículos antrales tempranos respecto al grupo OHSS (p<0,05). Además, en el grupo OHSS+LA se observó una disminución en el % de CL en formación (CLf) respecto al grupo OHSS (p<0,001). En el grupo OHSS+LA se observó un aumento de células apoptóticas (TUNEL) en los CLf con respecto al grupo OHSS (p<0,001). Mediante IHQ, se observó una disminución de la intensidad para VEGF en el grupo OHSS+LA comparado al grupo OHSS. En conclusión, estos Resultados sugieren que el LA inhibe la esteroidogénesis, el desarrollo folicular y luteal, y aumenta la apoptosis en CLf en un modelo de roedor de OHSS.

0482 (386) EXPRESIÓN DE COMPONENTES DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO ANÁLOGOS A INSULINA (IGF) EN EL OVARIO BOVINO: RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA. F. Rey¹, F. Rodríguez¹, N. S. Alfaro¹, N. R. Salvetti¹, C. G. Barbeito², H. H. Ortega¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral; ²Instituto de Patología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata <frey@fcv.unl.edu.ar>

La enfermedad quística ovárica bovina constituye uno de los principales desórdenes reproductivos que padece la hembra bovina de alta producción láctea. Teniendo en cuenta que el sistema de factores de crecimiento análogos a insulina (IGF) se encuentra implicado en el crecimiento y diferenciación de folículos ováricos, la hipótesis de nuestro trabajo plantea que alteraciones en la síntesis o en la actividad de los componentes de este sistema podrían estar involucradas en la patogenia de la enfermedad. Se tomaron muestras de quistes (>2cm) en animales con la enfermedad, y de folículos grandes (>1 cm), medianos (0,5-1 cm) y pequeños (<0,5 cm) de ovarios sin alteraciones patológicas. Se evaluó la expresión de ARNm de IGF-II mediante RT-PCR utilizando cantidades constantes de ARNm en todos los grupos y utilizando GAPDH como normalizador. Mediante hibridación *in situ* se determinó la población de células que expresan ARNm de IGF-II, utilizando una sonda de oligonucleótidos biotinilada. Además, se evaluó la actividad de las proteínas de unión a IGF-II (IGFBP) por *ligand blot*, luego de separar las proteínas por SDS-PAGE no reductor. Los Resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de ARNm de IGF-II en estructuras quísticas respecto a folículos controles de mayor tamaño (p<0.05). Dicha expresión se localizó principalmente en células de la granulosa de los diferentes folículos. Por otro lado, se determinó una significativa disminución de la expresión de IGFBPs en quistes respecto a folículos controles (p<0.05), que podría deberse a una variación de IGFBP-3. Podemos concluir que en quistes, la disminución de ARNm de IGF-II y el patrón alterado de IGFBPs podrían afectar la biodisponibilidad de IGF-II. Consecuentemente, las células foliculares podrían modificar su respuesta a las gonadotropinas alterando el crecimiento, la esteroidogénesis y la regulación del eje hipotálamico-hipofisario-gonadal, llevando al desarrollo de la enfermedad.

0483 (582) EL HIPERANDROGENISMO INDUCE UN ESTADO INFLAMATORIO, OXIDATIVO Y APOPTOTICO EN EL OVARIO DE RATONES PREPÚBERES ALTERANDO SU FUNCIONALIDAD. D. Belgorosky¹, V. A. Sander², A. B. Motta²

¹CEFYBO; ²Laboratorio de Fisiopatología Ovárica, CEFYBO, UBA- CONICET <d_belgo@hotmail.com>

El síndrome del ovario poliquístico (SOP), caracterizado por hiperandrogenemia, anovulación y alteraciones en el sistema inmune, es una de las enfermedades endocrinológicas más comunes en mujeres premenopáusicas. El objetivo fue evaluar si el hiperandrogenismo induce un estado inflamatorio, pro-oxidante, apoptótico y una infiltración de linfocitos T alterada que afecte la esteroidogénesis ovárica. Se utilizó un modelo de SOP inducido en ratones hembras prepúberes BALB/c por hiperandrogenización con dehidroepiandrosterona (D: 60 mg/kg peso, sc) durante 10 días y se comparó con el grupo control (C) inyectado con vehículo (aceite). Por radioinmunoensayo vimos que D induce efectos pro-inflamatorios, ya que incrementa los niveles de PGE ovárica (SOP: 1100±110 vs C: 600±60 pg/mg de proteína; P<0.0001) y pro-oxidante ya que aumenta el índice de peroxidación lipídica (SOP: 2000±125 vs C: 800±130 umol malondialdehído/g tejido; P<0.0001). Asimismo, D incrementó los niveles de CD8+T (citotóxicos) que infiltraban al ovario (SOP: 80±4% vs C: 50±3%; P<0.0001) y disminuyó los CD4+T (helper) (SOP:20±4%vs C:50±3%; P<0.0001) evaluado por citometría de flujo. Por Anexina V y citometría de flujo se detectó un aumento del 75% en el grado de apoptosis en células ováricas tratadas con D. Finalmente, los animales prepúberes presentaron un aumento en la producción de estradiol (E) por D (SOP:25±3 vs C:5±2 ng/ml de suero; P<0.0001), y no presentaron modificaciones en los niveles de progesterona (P) (SOP:3,5±0,2 vs C:3,6±0,2mg/ml suero). Concluimos que el hiperandrogenismo provoca un estado pro-inflamatorio, pro-oxidativo, pro-apoptótico y afecta el subtipo linfocitario (que modulará la producción local de citoquinas) en el ovario prepúber. En estas condiciones se vería afectada la actividad de la enzima P450 aromatasas (dado que los niveles séricos de E aumentan y no los de P) generando una deficiente maduración folicular

0484 (87) LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A ALTERA LA DIFERENCIACIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA DURANTE LA GESTACIÓN. L Kass¹, V L Bosquiazzo², M Durando¹, E H Luque¹, M Muñoz deToro¹

¹Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral; ²Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral <l.kass@fbc.unl.edu.ar>

El tratamiento *in utero* con bajas dosis de bisfenol A (BPA) altera la morfología de la glándula mamaria (GM) e incrementa su susceptibilidad al desarrollo tumoral; sin embargo, el efecto del BPA sobre la funcionalidad de la GM es poco conocido. Nuestro objetivo fue evaluar si la exposición a bajas dosis de BPA altera el desarrollo morfológico y funcional de la GM durante la gestación. Hembras preñadas de la cepa Wistar se trataron en el agua de bebida con a) 0.25mg/l o 0.0025mg/l de BPA, b) 0.025mg/l de dietilstilbestrol (DES) o c) 0.001% etanol (vehículo), desde el día 9 de gestación (D9) hasta el destete. Las crías expuestas perinatalmente a BPA o DES no presentaron diferencias con respecto a los controles en el peso al nacer ni al destete, en los ciclos estrales, ni en la edad a la pubertad. Cuando las crías hembras alcanzaron los 90 días de edad, se colocaron con machos de fertilidad comprobada y se sacrificaron a los D18 y D21. Al momento del sacrificio, se extrajo la GM y se evaluaron parámetros generales de fertilidad (número de cuerpos lúteos, sitios de implantación y sitios de reabsorción). Los grupos tratados con BPA y DES presentaron una mayor frecuencia de animales con sitios reabsorbidos comparados con el control. En la GM se evaluó por inmunohistoquímica la incorporación de bromodeoxiuridina (marcador de proliferación celular) y la expresión de alfa-lactoalbúmina (marcador de diferenciación alveolar). El tratamiento perinatal con BPA o DES no modificó la proliferación de las células alveolares. Sin embargo, la expresión de alfa-

lactoalbúmina, en el D21 de gestación fue menor en los animales tratados con BPA versus los controles. El tratamiento perinatal con BPA alteró la diferenciación mamaria evidenciándose este efecto cuando la GM experimenta los cambios histofuncionales de la gestación. Estas alteraciones podrían modificar la cantidad y/o calidad nutricional de la leche y en consecuencia la nutrición de las crías.

0485 (451) MODIFICACIONES INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE HEXARELINA (ANÁLOGO DE GHRELINA) SOBRE LOS PROCESOS DE FERTILIZACIÓN Y DESARROLLO PRE Y POSTNATAL EN UN MODELO MURINO. E M Luque¹, P B Puechagut¹, L M Vincenti¹, G Stutz¹, M E Santillán¹, R D Ruiz¹, M Fiol de Cúneo¹, A C Martini¹

¹Cátedra de Fisiología Humana Facultad de Ciencias Médicas UNC <eugenialu@gmail.com>

Ghrelin (Ghr) es un nexo entre la reproducción y el balance energético. No se conoce si afecta la calidad de las gametas, la fertilización y/o la gestación. Hipótesis: "Ghr es capaz de alterar la calidad de las gametas, su preparación para la fertilización y ésta última, así como el desarrollo embrionario y fetal provocando modificaciones que perduran en el desarrollo postnatal temprano." Se realizaron tres experimentos en ratones o sus gametas a los que se trató con Hexarelina (Hex), análogo de Ghr y se evaluó: 1) el efecto de la adición *in vitro* de Hex (10⁻⁵, 10⁻⁷ y 10⁻⁹M) sobre: a) la calidad espermática (motilidad -M-, vitalidad y reacción acrosomal -RA- espontánea) y la capacitación (RA inducida con progesterona) a los 3, 20 y 120 min respectivamente y b) el índice de fertilización *in vitro* (FIV). 2) en hembras preñadas e inyectadas con Hex (200 µg/kg/día) durante los primeros 3 días de gestación: la presencia y el desarrollo de embriones a las 60 hs de la ovulación. 3) el crecimiento y desarrollo corporal (evolución del peso, erupción de incisivos, separación del pabellón de la oreja, apertura de ojos) y parámetros neurobiológicos (evasión de la caída, geotaxia negativa y enderezamiento en superficie) y de maduración sexual (descenso testicular, separación balanoprepucial y apertura vaginal) de crías de hembras inyectadas con Hex (200 µg/kg/día) durante: a) toda la preñez y b) el 1º, 2º o 3º tercio de la preñez. Hex *in vitro* disminuyó M en todas las concentraciones y tiempos ensayados; sólo se alcanzaron diferencias significativas a los 3 min (control: 71.8±1.5, n=6 vs Hex 10⁻⁷M: 53.1±4.4, n=5; p<0.05, ANOVA). La misma tendencia se detectó en FIV. Hex no afectó el desarrollo embrionario *in vivo*. Resultados preliminares sugieren que la inyección de Hex a hembras preñadas, acelera el desarrollo corporal y neurobiológico de las crías. El análogo de Ghr empleado ejerció efectos diversos de acuerdo a la vía y la etapa del proceso reproductivo en que se administró.

0486 (442) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE UN ANÁLOGO DE GHRELINA SOBRE LA FISIOLÓGIA REPRODUCTIVA DE RATONES MACHOS Y HEMBRAS. P B Puechagut¹, E M Luque¹, A C Martini¹, G Stutz¹, M E Santillán¹, M Fiol de Cúneo¹, R D Ruiz¹, L M Vincenti¹

¹Cátedra de Fisiología Humana - Facultad de Cs. Médicas - Universidad Nacional de Córdoba <puechagut.patricia@gmail.com>

La participación en el control de la fisiología reproductiva de mensajeros implicados en la homeostasis de los nutrientes (Ej.: ghrelin) es tema de actual interés. **Objetivo:** investigar los efectos de la administración crónica de hexarelina (HEXr - análogo sintético de ghrelin) a ratones adultos, sobre parámetros reproductivos. Se emplearon ratones *Albino swiss*, inyectados (sc) con 100 (HEXr D1) ó 200 (HEXr D2) µg/kg/día de HEXr y sus controles (C) con solución isotónica de ClNa 0.9 % (machos: 53 días; hembras: 30 días, más los primeros 6 días de la preñez).

En ambos sexos se evaluó: capacidad fertilizante *in vivo* (% de preñez y número de crías); en machos: concentración, motilidad, vitalidad, respuesta al shock hipoosmótico, formas acodadas y/o con gota citoplásmica y estado acrosomal de espermatozoides epididimarios; en hembras: continuidad de los ciclos estrales, relación N° de fetos/ N° de cuerpos lúteos. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la calidad ni la actividad funcional de los espermatozoides, detectamos una tendencia (no estadísticamente significativa) a la reducción en el índice de preñez (77,4%, n=22; 62,5%, n=12 y 64,7%, n=17 en C, HEXrD1 y HEXrD2 respectivamente). En hembras no se modificaron los ciclos estrales, el índice de preñez, el tamaño de las camadas ni el porcentaje de ovocitos fertilizados. HEXrD2 inyectada durante la preñez temprana provocó disminución significativa en la relación N° de fetos/ N° de cuerpos lúteos, respecto a C (73,61±12,41, n=8 y 100,00±0,00, n=4 respectivamente; p < 0.05, ANOVA). Conclusión: en las condiciones experimentales empleadas, HEXr no modificó la calidad espermática, pero la tendencia a disminuir el índice de preñez indicaría que el péptido podría modificar la conducta sexual. En hembras, la reducción del número de fetos en útero, podría deberse a una falla en la implantación embrionaria, provocada por el tratamiento con el péptido durante el primer tercio de la preñez.

REPRODUCCION O4

0487 (89) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A SOBRE LA DINÁMICA CELULAR UTERINA EN RATAS ADULTAS. V L Bosquiazzo¹, J G Ramos², L Kass², J Varayoud², M Muñoz deToro², E H Luque²

¹Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad del Litoral; ²Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional del Litoral <vlbosqui@fbc.unl.edu.ar>

El tracto reproductivo en desarrollo es sensible a los perturbadores endocrinos. Se ha demostrado que la exposición neonatal al xenoestrógeno bisfenol a (BPA) resulta en efectos adversos sobre órganos reproductivos que se manifiestan en la adultez. El objetivo del presente trabajo fue estudiar si la exposición pre y postnatal a bajas dosis de BPA y dietilstilbestrol (DES) afecta la dinámica celular de los diferentes compartimientos tisulares del útero en la rata adulta. Ratas preñadas (Wistar) fueron tratadas a través del agua de bebida con 0.001% de etanol (grupo control), BPA (0.25mg/l o 0.0025mg/l) y DES (0.025mg/l) desde el día 9 de gestación hasta el destete. En las crías hembras, se determinó el momento de la apertura vaginal, como parámetro de pubertad y el patrón de los ciclos estrales. A los 3 meses de edad, los animales fueron sacrificados en estro y se diseccionaron los cuernos uterinos que fueron incluidos en parafina. Dos horas antes del sacrificio se les inyectó bromodeoxiuridina (BrdU) para cuantificar por inmunohistoquímica la proliferación celular en cada uno de los compartimientos celulares uterinos (epitelio luminal y glandular, estroma subepitelial y región muscular). Para la identificación *in situ* de células en apoptosis se utilizó la técnica de TUNEL. En los animales expuestos a BPA y DES no se afectó la edad de la apertura vaginal ni el patrón del ciclo estral. La apoptosis celular no presentó cambios entre animales expuestos a xenoestrógenos y controles. En las hembras expuestas a BPA o DES se observó una disminución significativa en la incorporación de BrdU en epitelio glandular en comparación a las ratas controles. Los Resultados demostraron que la exposición perinatal a BPA y DES alteró la dinámica celular del epitelio glandular uterino. Debido a que las glándulas uterinas y sus secreciones son críticas para el control de la implantación y el desarrollo embrionario, estos Resultados podrían explicar posibles causas de subfertilidad femenina.

0488 (155) EFECTO NEURAL DE ANDROSTENEDIONA SOBRE LA REGRESIÓN LUTEAL. S Vallcaneras¹, M Casais¹, A C Anzulovich², A M Rastrilla¹

¹Lab. Biol. de la reprod.(LABIR) FAC QCA., BQCA. Y FARMACIA-UNSL— CHACABUCO 917-SAN LUIS; ²Lab. de Cronobiología (IMIBIO-SL, CONICET, UNSL)— CHACABUCO 917-SAN LUIS <ssvallca@unsl.edu.ar>

En nuestro laboratorio, trabajando con ratas al final de la preñez y usando el sistema integrado *ex vivo* ganglio celíaco- nervio ovárico superior-ovario (GC-NOS-O) demostramos que androstenediona (A₂) en GC es capaz de mantener elevada la liberación de progesterona (P) ovárica, manifestando efecto luteotrófico indirecto vía neural. En el presente trabajo, nuestro objetivo fue: investigar si el efecto luteotrófico de A₂ desde el GC también se manifiesta en el día 4 posparto cuando la regresión luteal se halla avanzada. El sistema se incubó en una cubeta con dos compartimientos, en uno de ellos se colocó el GC, en el otro el ovario y ambos permanecieron conectados por el NOS. El sistema se preincubó por 30 min. en baño metabólico a 37°C con atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂ en 2 ml de buffer Krebs Ringer-glucosa-albúmina (0.1 mg/ml) a 37°C; cuando finalizó el tiempo de preincubación se consideró tiempo 0. En el compartimiento ganglionar se adicionó A₂ (10⁻⁶M). Los grupos controles fueron sistemas GC-NOS-O sin tratamiento con A₂. A los 30, 60, 120 y 180 min. de incubación, en el líquido del compartimiento ovárico se determinó P, A₂ y estradiol (E) por RIA y óxido nítrico (NO) mediante reacción de Griess y a los 180 min., en el tejido ovárico, se determinaron las actividades de 3b-HSD y de 20a-HSD (enzimas de síntesis y de degradación de P respectivamente) por método espectrofotométrico y la expresión del ARNm de aromataza por PCR en Tiempo Real. Los Resultados fueron: A₂ en GC no produjo cambios significativos en la liberación de P ni en las actividades enzimáticas de 3b-HSD y de 20a-HSD, disminuyó la liberación de nitritos, aumentó la liberación de A₂ y E y disminuyó la expresión del ARNm de aromataza ovárica. Se aplicó Anova I seguido de Tukey Test con una significancia estadística de p<0.05. La acción luteotrófica de A₂, vía neural, no se observó en el día 4 posparto y su efecto modulador en esta etapa se manifestó a favor de la fisiología ovárica.

0489 (163) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA AL PESTICIDA ENDOSULFÁN SOBRE EL DESARROLLO DEL ÚTERO Y LA FERTILIDAD DE LA HEMBRA. J Varayoud¹, J G Ramos¹, V L Bosquiazzo¹, M Muñoz deToro¹, E H Luque¹

¹Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral <varayoud@fbc.unl.edu.ar>

El útero es altamente sensible a los perturbadores endocrinos. La exposición a estos compuestos durante el desarrollo puede afectar la expresión de genes uterinos como el gen homeótico Hoxa-10 y el receptor de estrógenos alfa (ERα), produciendo consecuencias a largo plazo en la histofisiología del órgano. Nos propusimos evaluar si la exposición neonatal a endosulfán, pesticida ampliamente utilizado en nuestro país, afecta la expresión uterina de Hoxa10, ERα y la fertilidad de ratas hembra. Se inyectaron crías (Wistar) vía sc aceite de maíz (control), Dietilstilbestrol 0.2 ug/kg/día (DES), Endosulfán 6 ug/kg/día (Endo6) y 600? ug/kg/día (Endo600), desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta el DPN7. Se obtuvieron úteros de animales sacrificados el DPN8 y DPN21, los que fueron incluidos en parafina, y utilizados para determinar por inmunohistoquímica la expresión de Hoxa10 y ERα. En DPN80 otro grupo de hembras tratadas fue sometido a un test de fertilidad empleando machos de fertilidad comprobada. Se determinó: porcentaje de animales preñados, número de cuerpos lúteos (CLs), sitios de implantación y de reabsorción. En DPN8 y 21, las hembras tratadas con Endo600 mostraron un aumento en la expresión de Hoxa-10 y ERα (p<0.05), DES presentó cambios

opuestos. Por inmunofluorescencia detectamos alta co-expresión de ambas proteínas en el estroma uterino. El porcentaje de animales preñados y el número de CLs/rata ($X=12$) no fue diferente entre los grupos. Las hembras expuestas a xenoestrógenos mostraron una disminución significativa en el número de sitios de implantación (Endo600: 6.9 y DES: 7.2 *versus* control: 12.2; $p<0.05$), sin cambios en el número de sitios de reabsorción. La desregulación en la expresión de Hoxa-10 y ER α , en respuesta a la exposición neonatal a endosulfán es un evento crítico durante el desarrollo uterino y podría estar asociado con el menor número de implantaciones. Esto podría explicar la subfertilidad detectada en hembras.

0490 (244) EFECTO DE DIETAS RICAS EN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS SOBRE LA ACTIVIDAD METALOPROTEÁSICA SÉRICA Y PLACENTARIA EN LA RATA DIABÉTICA GESTANTE. M Sosa¹, R D Higa¹, M Kurtz¹, A S Jawerbaum¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos <mariasosa_83@hotmail.com>

Estudios previos realizados en ratas diabéticas gestantes mostraron anomalías en la actividad metaloproteásica placentaria, vinculadas al anómalo entorno pro-inflamatorio intrauterino que afecta al desarrollo feto-placentario. El objeto de este estudio fue evaluar el efecto de dietas ricas en ácidos grasos insaturados, capaces de activar a los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) sobre la actividad de las metaloproteasas (MMPs) 2 y 9 en tejido placentario y suero proveniente de ratas sanas y diabéticas. La diabetes se obtuvo por administración neonatal de estreptozotocina (90 mg/kg). Los animales preñados sanos y diabéticos fueron alimentados desde el día 0.5 al día 13.5 de gestación con dieta estándar, dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva, o dieta estándar suplementada con 6% de aceite de cártamo. En el día 13.5 de gestación se estudió mediante zimografía la actividad de MMP2 y MMP9 en el suero y el tejido placentario. Los tratamientos dietarios efectuados no modificaron la glucemia materna, la ingesta calórica, ni el peso feto-placentario. En el suero de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar se observaron incrementos en la actividad de MMP2, proMMP2 y proMMP9 ($p<0.05$). Los tratamientos dietarios redujeron tanto la actividad sérica de proMMP2 (aceite de oliva, $p<0.01$) como de MMP9 y proMMP9 (aceites de oliva y cártamo, $p<0.01$). En el tejido placentario de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar se observaron incrementos en la actividad de MMP2, proMMP2 y MMP9 ($p<0.05$). Los tratamientos dietarios con aceites de oliva ($p<0.05$) y cártamo ($p<0.01$) regularon negativamente la actividad placentaria de MMP2 y proMMP2. Se concluye que los tratamientos dietarios con aceites ricos en ácidos grasos insaturados capaces de activar PPARs poseen efectos benéficos a nivel placentario debido a su capacidad de reducir la elevada actividad metaloproteásica, y que este efecto resulta también evidente a nivel sérico.

0491 (167) EXPOSICIÓN NEONATAL A PERTURBADORES ENDOCRINOS Y SU EFECTO EN EL OVARIO DE LA RATA. H A Rodríguez¹, N Santambrosio¹, M Muñoz de Toro¹, E H Luque¹

¹Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral <harodrig@fcb.unl.edu.ar>

Nuestra hipótesis propone que el ovario de la rata durante la etapa posnatal temprana es un órgano sensible a la acción de los perturbadores endocrinos (PE). Previamente demostramos que dos PE, el dietilstilbestrol (DES) y el bisfenol A (BPA), alteran la dinámica folicular disminuyendo el número de folículos primordiales (lo que representa el potencial reproductivo de la hembra) y estimulando la activación folicular. En el presente trabajo completamos este estudio evaluando la expresión de moléculas asocia-

das al proceso de foliculogénesis. Se expusieron ratas hembras Wistar por vía sc desde el día posnatal 1 (DPN1) hasta DPN7 con: DES 20 ig/kg (DES20), DES 0.2 ig/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 picosirius-hematoxilina se determinó el porcentaje de cada población folicular y se evaluó por inmunohistoquímica la expresión de receptor de andrógenos (RA) y de progesterona (RP), Ki-67 (antígeno asociado a proliferación celular), y p27 (inhibidor de cdk asociado a activación folicular e inducción de atresia). El índice de apoptosis se determinó por el método TUNEL. DES20, DES0.2 y BPA20 presentaron menor cantidad de folículos primordiales y un incremento de folículos primarios. En DES20 la expresión de RA disminuyó en todas las poblaciones foliculares. En BPA0.05 observamos mayor proliferación en los folículos activados. La expresión de p27 se incrementó en todas las poblaciones foliculares en DES20, DES0.2 y BPA20. La expresión de RP y el índice de apoptosis no fueron modificadas por ninguno de los tratamientos. Los Resultados permiten confirmar nuestros Resultados previos que DES y BPA alteran la dinámica folicular y demuestran que ambos PE producen sobreexpresión de la proteína p27. Esto sugiere que una posible vía de acción de ambos PE en el ovario es la alteración del desarrollo folicular dependiente de p27.

0492 (246) ROL DE LOS ANDRÓGENOS EN EL DESARROLLO DE TERATOMAS OVÁRICOS EN RATONES TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE HCG. B Gonzalez¹, L D Ratner¹, M Poutanen², I Huhtaniemi³, R S Calandra^{1,4}, S B Rulli¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET); ²Dept. of Physiology, Univ. de Turku, Finlandia; ³London Imperial Colledge, Londres, UK; ⁴IMBICE, La Plata <gonzalez@dna.uba.ar>

La hipersecreción crónica de la gonadotropina coriónica humana (hCG) en ratones transgénicos (TG) induce la producción de niveles elevados de esteroides gonadales y el desarrollo de tumores de ovario de tipo teratoma entre las 6 y 8 semanas de edad. Estos tumores se originan de ovocitos activados espontáneamente dentro del ovario, dando lugar a tejidos derivados de las tres líneas germinales, imitando el desarrollo embrionario en forma desorganizada. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el rol de los andrógenos en el desarrollo tumoral. Se realizaron implantes del antiandrógeno Flutamida (F) (pellets de 20mg) en hembras TG de 9 días de edad, y se sacrificaron los animales a las 4, 6 y 8 semanas de edad. Los Resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con F produjo una alteración en el desarrollo tumoral, evidenciado por un menor peso del ovario TG-F comparado con el TG control en las tres edades estudiadas ($p<0.05$). El análisis histológico mostró a las 4 semanas un menor número de quistes hemorrágicos ($p<0.01$), y a las 6 semanas la presencia de áreas hemorrágicas reducidas en los sitios de invasión de células gigantes del trofoblasto, confirmadas por RT-PCR e inmunohistoquímica para el marcador específico Lactógeno Placentario-1 (LP-1). A las 8 semanas se observaron zonas de invasión trofoblástica, pero no se lograron detectar tejidos diferenciados, como ocurre en los animales TG que hacia las 8 semanas ya muestran desarrollo de teratomas de gran tamaño. Por último, se estudió la expresión de los genes marcadores de esteroidogénesis: p450scc y aromatasa; de desarrollo folicular: REB; y de angiogénesis: VEGFA en ovarios de ratones TG, TG-F y de la cepa salvaje (wt) de 4 y 6 semanas de edad, por RT-PCR semicuantitativa. No se detectaron cambios en los mismos a las edades estudiadas. En conclusión, el tratamiento con F fue capaz de reducir la aparición de quistes hemorrágicos y de producir un retraso/ inhibición en el desarrollo teratogénico.

0493 (280) LA INFERTILIDAD DE RATONES MACHOS CON REARREGLOS CROMOSÓMICOS ROBERTSONIANOS

INVOLUCRA LA VÍA APOPTÓTICA MITOCONDRIAL. V.A. Rodríguez¹, G Díaz de Barboza¹, R Ponce², V Merico³, S Garagna³, N Tolosa de Talamoni¹

¹Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba; ²Facultad de Odontología. Universidad Nacional de Córdoba; ³Laboratorio di Biología dello Sviluppo, Università degli Studi di Pavia, Italia <vrodriguez@biomed.uncor.edu>

Las gametas que presentan rearrreglos en su cariotipo muestran incremento en la muerte celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de la vía mitocondrial de la apoptosis y el papel de calbindina D_{28k} (CB), molécula con posibles propiedades antiapoptóticas, durante la espermatogénesis en ratones *Graomys centralis* (Gc, 2n=42), *Graomys griseoflavus* (Gg, 2n=36-38) y sus híbridos infértiles (2n=34), que presentan rearrreglos cromosómicos Robertsonianos. Se usaron testículos de ratones híbridos infértiles (hembras Gg x machos Gc) de 1, 2 y 3 meses (m) de edad, y de sus parentales como controles. Secciones transversales de los túbulos seminíferos se procesaron mediante inmunohistoquímica empleando anticuerpos específicos. La fragmentación del ADN se evaluó por TUNEL. Se contaron túbulos totales y células CB, Bax y citocromo c inmunorreactivas, y TUNEL(+) en cada túbulo seminífero. Los híbridos presentaron mayor apoptosis de células germinales, especialmente en espermatoцитos en paquitene, con un pico a los 2 m. También mostraron mayor expresión de Bax y citocromo c en concordancia con la tinción de TUNEL. En los parentales se encontraron células germinales Bax(+) y citocromo c(+) principalmente al mes de edad, siendo prácticamente nula su expresión en tiempos posteriores. En los híbridos se observó un elevado número de espermatoцитos en paquitene y en degeneración CB(+), que en su mayoría eran TUNEL(-). Dado que los híbridos exhiben redistribución de Bax y citocromo c que lleva a la fragmentación del ADN, se concluye que la vía intrínseca de la apoptosis está involucrada en la muerte de las células germinales en testículos de ratones híbridos infértiles Robertsonianos. La sobre-expresión de CB sugiere que esta proteína actuaría como un mecanismo de defensa contra la apoptosis de la progenie espermatogénica, sin embargo no logra prevenir la muerte celular desencadenada por las alteraciones cromosómicas.

0494 (251) LA ACTIVACIÓN DIETARIA DE RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES (PPARS) MODULA LOS NIVELES DE PGI₂, PGE₂ Y NO EN LA DECIDUA DE RATA DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGÉNESIS TEMPRANA. R.D Higa¹, V White¹, M Kurtz¹, A Jawerbaum¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos <rominahiga@gmail.com>

La diabetes materna induce malformaciones embrionarias principalmente durante la etapa de organogénesis temprana. En esta etapa, la decidua rodea al embrión brindándole sustento, nutrientes y moléculas de señalización necesarios para su desarrollo. Los receptores nucleares PPARs se expresan en el tejido decidual, siendo ciertos ácidos grasos insaturados y prostaglandinas, activadores de estos receptores. Las prostaglandinas I₂ (PGI₂), E₂ (PGE₂) y el óxido nítrico (NO) son agentes involucrados en los cambios morfológicos deciduales que acompañan el desarrollo embrionario y la placentación. El objetivo del presente trabajo fue determinar si ácidos grasos activadores de PPARs administrados en la dieta regulan en la decidua de rata los niveles de PGI₂, PGE₂ y NO. Ratas sanas y diabéticas (obtenidas por administración de estreptozotocina) fueron alimentadas desde el día 0.5 al 10.5 de gestación con dieta estándar suplementada o no con 6% de aceite de oliva (75% de ácido oleico) o 6% de aceite de cártamo (75% de ácidos linoleico). En el día 10.5 de preñez se dosaron en la decidua los niveles de PGE₂ (RIA),

de PGI₂ (EIA) y nitratos/nitritos (índice de la producción de NO, ensayo de Griess). **Resultados:** En la decidua de rata diabética los niveles de PGI₂ se encontraron reducidos (p<0,05), y el tratamiento dietario con aceite de cártamo incrementó sus niveles (p<0,05). En la decidua de rata diabética se observaron mayores niveles de PGE₂ (p<0,01) y tanto la dieta suplementada con aceite de oliva como con aceite de cártamo redujeron sus niveles (p<0,01). En la decidua de rata diabética se observaron mayores niveles de nitratos/nitritos (p<0,001) y la administración dietaria de aceite de oliva redujo dichos niveles (p<0,001). **Conclusiones:** La administración dietaria de ácidos grasos insaturados agonistas de PPARs revierten alteraciones tanto en los niveles de prostaglandinas como de NO inducidas en el tejido decidual por la diabetes materna.

REPRODUCCION P1

0495 (5) EMBRIONES BOVINOS PARTENOGENÉTICOS PRODUCIDOS POR INHIBICIÓN DE LA EMISIÓN DEL PRIMER CORPÚSCULO POLAR DURANTE LA MADURACIÓN IN VITRO. R J Bevacqua¹, R Fernandez Martín¹, D Salamone¹

¹LAB. BIOTECNOLOGÍA ANIMAL, FACULTAD DE AGRO-NOMÍA, UBA <romibevacqua@yahoo.com.ar>

Los embriones partenogénicos constituyen una alternativa éticamente aceptable para la obtención de Células Madre Embrionarias (CME). Generalmente, la partenogénesis se induce mediante activación de ovocitos en Metafase II, bloqueando la segregación de cromátidas hermanas, y resultando en embriones diploides predominantemente homocigotos. En este trabajo, se compararon diferentes tratamientos de activación partenogénica para producir embriones diploides con una mayor identidad a la donante ovocitaria. Se empleó un inhibidor de filamentos de actina, la Citocalasina B (CCB), para bloquear la emisión del primer corpúsculo polar (1CP) durante la Maduración *in Vitro* (MIV) (Grupo B1), o la del segundo CP (2CP) durante la activación (Grupo B2). Ovocitos bovinos fueron MIV en condiciones estándar por 24h. El grupo B1 fue tratado con 10ug/ml CCB desde las 10h de MIV. El grupo B2, se trató con 5ug/ml CCB durante la activación. El desarrollo embrionario se inició con 5uM ionomicina por 4 min seguido por alguna de las siguientes drogas: a) 2mM 6-Dimetilaminopurina (DMAP) por 3h, b) 10ug/ml Cicloheximida (CHX) por 5h, c) 5uM Dehidroleucodina (DhL) por 3h ó d) 25uM Roscovitina (Ros) por 3h. Los embriones se cultivaron 7 días. Los Resultados de los 8 tratamientos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Desarrollo de embriones partenogénicos impedidos de emitir 1CP o 2CP

Tratamiento	N	Clivaje (%)	Mórulas (%)	Blastocistos (%)
B1DMAP	89	63(70,7) ^o	16(17,9) ^o	3(3,37)
B2DMAP	139	97(69,7) ^a	30(21,5)	3(2,16)
B1CHX	70	23(32,8) ^{oo}	11(15,7) ^o	1(1,43)
B2CHX	48	21(43,7) ^b	7(14,5)	1(2,08)
B1DHL	63	13(20,6) ^{oo}	1(1,5) ^{oo}	0
B2DHL	51	14(27,4) ^b	7(13,7)	1(1,96)
B1Ros	62	8(12,9) ^{oo}	0 ^{oo}	0
B2Ros	46	22(47,3) ^b	4(8,7)	0

Diferencias significativas entre distintos tratamientos en B1(^o,^{oo}) y en B2(a,b) (Fisher Test; p<0,05). No hubo diferencias en el desarrollo de ovocitos correspondientes a los grupos B1 y B2. Esta nueva estrategia de obtención de blastocistos es el primer paso para la generación de CME partenogénicas con mayor identidad a la donante.

0496 (37) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE P15 Y VEGFA POR TGF-BETA1 EN CÉLULAS DE LEYDIG DEL HÁMSTER DORADO (MESOCRICETUS AURATUS). C R Gonzalez¹, R S Calandra^{1,2}, S I Gonzalez Calvar³

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental; ²Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, La Plata; ³Instituto de Biología y Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UBA <cande00@hotmail.com>

El Factor de Crecimiento Transformante (TGF- β 1) cumple un rol importante en la modulación de la función testicular regulando la expresión de genes vía su receptor TGFBR11 el cual induce el reclutamiento de los receptores ALK-1 y/o ALK-5, para desencadenar la transducción intracelular de la señal por diferentes vías: Smads, MAPKs (p38). Objetivos: detectar la presencia de ALK1 y 5 por inmunohistoquímica y analizar por RT-PCR la expresión de p15 (inhibidor de CDK4) y el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular A (VEGFA) en respuesta a TGF- β 1 (1 ó 10ng/ml) en ausencia o presencia de U0126 (inhibidor de ERK1/2, 10 μ M), SB203580 (inhibidor de p38, 40 μ M) y SB431542 (inhibidor de ALK-5, 1 μ M) en cultivos de células de Leydig (CL) purificadas de hámsteres adultos (90 días). Se detectaron ALK1 y 5 en citoplasma de CL. La incubación "in vitro" de CL con TGF- β 1 (1ng/ml) en presencia de hCG (100 mU/ml) aumentó la expresión de VEGFA a las 3 hs de incubación ($p < 0.05$), la cual disminuyó por acción de U0126 ($p < 0.05$). SB203580 no produjo modificaciones en los niveles de VEGFA. La expresión de p15 fue estimulada a los 5 minutos de incubación con TGF- β 1 (10ng/ml) ($p < 0.05$), efecto que fue inhibido por SB203580 ($p < 0.05$), mientras que U0126 no produjo cambios. Además, SB431542 inhibió el efecto estimulador de TGF- β 1 sobre la expresión de p15 mientras que no tuvo efecto sobre los niveles de VEGFA. Estos Resultados sugieren que TGF- β 1 estimularía los niveles de expresión de p15 vía su receptor ALK-5, y que p38 participaría de este efecto, mientras que ERK1/2 participaría en la estimulación de la expresión de VEGFA y podría involucrar al receptor ALK-1 debido a que no se observaron cambios en presencia de SB431542. En conclusión, TGF- β 1 regularía la expresión de genes a través de sus receptores específicos ALK-1 y ALK-5 y por acción de MAPKs, pudiendo existir un mecanismo de interrelación entre ambas vías de señalización en CL de hámsteres Dorados adultos.

0497 (84) SUSTANCIA P Y NORADRENALINA EN GANGLIO CELÍACO MODULAN LA LIBERACIÓN DE PROGESTERONA POR EL OVARIO. M H Garraza¹, M Forneris¹, E FIGUEROA¹, L Oliveros¹

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción Fac de Qcabiocqa y Farm Univ Nac San Luis <mhg@unsl.edu.ar>

Previamente se ha aislado en nuestro laboratorio el sistema ex vivo Ganglio Celíaco (GC)-Nervio Ovárico Superior (SON)-ovario (O) en rata Holtzman, donde el GC y el O permanecen unidos por el SON. La incubación del GC y del O en celdas respectivas nos permitió mostrar que en Diestro 2 (D2) la adición de Sustancia P (SP) en GC estimula la liberación de Progesterona (P) por el O, respecto del valor basal. Esto no es acompañado por cambios en la liberación de óxido nítrico (ON) y en la expresión del Factor de Crecimiento Neural (NGF) por el O, como ha sido observado cuando Noradrenalina (NA) se adiciona a GC. Con la finalidad de establecer si la regulación del O desde el GC en Diestro 1 (D1) es diferente al D2, en el presente trabajo estudiamos en el sistema ex vivo, el efecto de SP en GC en D1. El GC se incubó en buffer Krebs-Ringer solo (condición basal) y con 50 ng/ml de SP, con y sin adición de NA 10^{-6} M, en baño metabólico. A los 30, 60, 120 y 180 min se tomaron muestras de líquido de incubación desde la celda ovárica para determinar la concentración de P liberada (por RIA) y la de ON (método de Griess). En el O se determinó la expresión génica de NGF por RT-PCR. El análisis estadístico se realizó por ANOVA, una vía. El O del sistema GC-SON-O en condiciones basales liberó a los 30, 60, 120 y 180 min : 0.076, 0.086, 0.1 y 0.12 ng P /mg ovario, respectivamente, y 0.71 μ M/mg ovario de ON a los 30 min y 1,3 μ M/mg en los tiempos restantes. Respecto a di-

chos basales la estimulación de GC con SP produjo disminución de la liberación ovárica de P ($p < 0.05$) y ON ($p < 0.001$) en todos los tiempos estudiados. La estimulación de GC con SP+NA revirtió la disminución de P a valores basales y acentuó la disminución de ON. La expresión de NGF no mostró cambios. La SP en GC regula en forma diferencial la actividad del O en D1 y D2, y sus efectos sobre la liberación de P son revertidos por la presencia conjunta de NA.

0498 (166) EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS EN LOS CUERPOS LÚTEOS DE LA RATA Y SU REGULACIÓN DURANTE LA GESTACIÓN Y EL POSPARTO. M B Hapon^{1,2}, A Redondo^{1,2}, S Valdez^{1,2}, P Navas¹, R Carón¹, G Jahn¹

¹Laboratorio de Reproducción y Lactancia IMBECU-CONICET; ²ICB U.N. Cuyo <bhapon@mendoza-conicet.gov.ar>

La tiroides y el eje gonadal interactúan continuamente antes y durante el embarazo. Los desordenes tiroideos son la segunda endocrinopatía más frecuente que afecta a la mujer en edad reproductiva, aumentando el riesgo de infertilidad y durante el embarazo, de placenta abrupta, preeclampsia y parto prematuro. En la rata el mantenimiento de la preñez depende de la secreción de progesterona por el cuerpo luteo (CL). Nuestros estudios previos demuestran que niveles anormales de hormonas tiroideas al final de la gestación modifican la actividad del CL y por lo tanto el desencadenamiento del parto. Hasta el presente se desconoce si los receptores de las hormonas tiroideas (TR) se expresan en el CL y por lo tanto, si éstas pueden actuar directamente a éste nivel. Nos proponemos determinar la presencia de las isoformas del TR a nivel luteal y la regulación de su expresión a lo largo de la gestación en la rata. Se extrajo el ARN total de CL en los días 5 (G5), 10 (G10), 15 (G15), 19 (G19), 21 (G21) de gestación y el día 2 postparto (L2) y se midió por RT PCR semicuantitativa la expresión relativa a S16 de las isoformas α 1, α 2, β 1 y β 2 del TR. Se encontraron las isoformas TR α 1, TR α 2 y TR β 1 en CL en todos los días estudiados. La isoforma TR α 1 disminuyó significativamente en L2 $p < 0.05$ (G5= 0.53 \pm 0.027; G10= 0.52 \pm 0.032; G15= 0.52 \pm 0.040; G19= 0.48 \pm 0.065; G21= 0.59 \pm 0.020; L2= 0.26 \pm 0.038). TR α 2 disminuyó en L2 $p < 0.01$ respecto de G15, G19, G21 (G15= 1.16 \pm 0.070; G19= 1.18 \pm 0.091; G21= 1.17 \pm 0.099; L2= 0.61 \pm 0.067). TR β 1 aumentó en G21 y L2 respecto de G19 $p < 0.05$ (G19= 0.12 \pm 0.025; G21= 0.42 \pm 0.13; L2= 0.37 \pm 0.12). El TR β 2 no se expresó. En conclusión, las isoformas TR α 1, TR α 2 y TR β 1 están presentes en CL de gestación, mostrando una regulación diferencial entre las isoformas α 1 y α 2 que están altas en la gestación y caen en el postparto mientras que la β 1 tiene un patrón inverso. Estos Resultados sugieren que las hormonas tiroideas podrían actuar directamente sobre el CL de gestación.

0499 (270) LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES DELTA (PPARDELTA) MODULA EL METABOLISMO LIPÍDICO EN PLACENTAS DE RATAS CONTROLES Y DIABÉTICAS. N A Martínez¹, J Fernández¹, E Capobianco¹, A Jawerbaum¹

¹CENTRO DE ESTUDIOS FARMACOLOGICOS Y BOTANICOS <noraalicia_martinez@hotmail.com>

Trabajos previos mostraron la capacidad de agonistas de PPAR α y PPAR γ de modular el metabolismo lipídico en la placenta de rata sana y diabética. Menos conocidas son las funciones de PPAR δ , isoforma de PPAR esencial en el desarrollo placentario. **Objetivo:** Evaluar si la activación de PPAR δ modula el metabolismo lipídico en placentas de ratas controles (C) y diabéticas (D). Metodología: La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina. Las placentas, explantadas en el día 13,5 de gestación, se incubaron en presencia o ausencia de carbaprostaciclina, cPGI2 (1mM) análogo estable de PGI2, agonista de PPAR δ . Se dosaron los niveles de lípidos mediante TLC y densitometría, la síntesis lipídica *de novo*

utilizando ^{14}C - acetato como trazador y el catabolismo lipídico utilizando como índice la liberación de glicerol al medio de incubación. PGI2 fue medido por EIA. **Resultados:** Los niveles de triglicéridos (TG) y ésteres de colesterol (EC) fueron mayores en la placenta D respecto al C ($p<0,01$). La adición de cPGI2 redujo los niveles de fosfolípidos (PL, $p<0,005$), colesterol (CHO, $p<0,001$) y ácidos grasos libres (FFA, $p<0,05$) en placentas D sin ejercer efecto en tejido C. El catabolismo lipídico fue mayor en placentas D respecto a las C ($p<0,01$), cPGI2 incrementó este parámetro en tejido C y D ($p<0,01$). La síntesis de las especies lipídicas estudiadas fue menor en placentas D respecto a C ($p<0,01$), cPGI2 disminuyó la síntesis de TG y EC en tejido C ($p<0,01$) y de TG, PL y CHO en placentas D ($p<0,01$). Los niveles de cPGI2 fueron menores en placentas D respecto a C ($p<0,02$). **Conclusiones:** Se evidencia la capacidad del agonista de PPARdelta, cPGI2, de regular el metabolismo lipídico placentario. Dichos efectos se ejercen en forma más marcada en la placenta de rata diabética, que presenta alteraciones en el metabolismo lipídico y en los niveles de PGI2, agonista endógeno de PPARdelta.

0500 (279) ANDROSTENEDIONA A TRAVÉS DEL PLEXO NERVIOSO OVÁRICO MODULA LA ESTEROIDOGÉNESIS EN OVARIOS POLIQUÍSTICOS. Z Sosa ¹, C Capone ¹, A Vega Orozco ¹, D Bronzi ¹, A M Rastrilla ¹

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción Facultad de Qca Bioqca y Farm. Univ Nac San Luis <zrosa@unsl.edu.ar>

El Síndrome de Ovarios Poliquísticos (PCO) se caracteriza por un desorden endocrino complejo asociado a anovulación crónica, exceso de andrógenos e infertilidad, con el compromiso del ovario como órgano blanco y estructuras tales como el hipotálamo, la hipófisis, las glándulas suprarrenales. Los objetivos fueron estudiar 1º la presencia de receptores de androstenediona (A_2) en el ganglio mesentérico superior (GMS) por estudios inmunohistoquímicos, 2º los efectos del agregado de A_2 : 10^{-8} M en el compartimiento ganglionar sobre la liberación de Progesterona (Pg), A_2 estradiol (E_2) y nitritos en el compartimiento ovárico y 3º Medir la 3b-HSD y 20a-HSD enzimas de síntesis y degradación de Pg. Los animales fueron inyectados por vía intramuscular con 0,2 ml de solución de valerato de estradiol (2 mg/rata en aceite vegetal) en el primer ciclo, durante la etapa de diestro II y sacrificadas 30 días más tarde. Se extrae el sistema ex vivo ganglio mesentérico superior-plexo nervioso ovárico- ovario (GMS-PNO-O) previamente estandarizado. Se incubó en buffer Krebs-Ringer-bicarbonato pH 7,4 a 37°C en baño metabólico. Se aplicó test de Student con una significancia de $p<0,05$. La liberación de Pg, A_2 y E_2 fueron medidos por RIA y nitritos por la técnica de Griess y la actividad de las enzimas espectrofotométricamente. Los Resultados muestran la presencia de los receptores de androstenediona en cortes de ganglio, además A_2 en GMS no modifica la liberación de Pg, disminuye la A_2 ($*p<0,001$), aumenta E_2 ($*p<0,001$) mientras que nitritos disminuye ($*p<0,001$) en todos los tiempos respecto al control. La presencia de A_2 aumenta 3b-HSD y 20a-HSD ($*p<0,001$ y $p<0,05$ respectivamente). Se puede concluir que la presencia de receptores en ganglio indican que androstenediona podría intervenir en la esteroideogénesis ovárica a través de dichos receptores y además una elevada concentración de estrógeno circulante afecta el comportamiento del órgano en otras etapas del ciclo estral como en DII.

0501 (379) DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS β EN LA PARED FOLICULAR DE QUISTES OVÁRICOS BOVINOS. N S Alfaro ¹, F Rodriguez ¹, N R Salvetti ¹, M Stangaferro ¹, H H Ortega ¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Litoral <natoalfaro@hotmail.com>

La Enfermedad Quística Ovárica Bovina (COD) tiene una etiopatogenia compleja que se presenta con trastornos reproductivos tales como anestro y anovulación. En este proceso los cambios en la secreción de hormonas gonadotróficas afectan directamente la liberación de hormonas esteroideas como así también la expresión de sus receptores. Nuestro objetivo fue determinar por RT-PCR semicuantitativa la expresión del ARNm de receptores de estrógenos α (RE α) y β (RE β) en distintas categorías de folículos ováricos en vacas normales y con COD. Los ovarios fueron recolectados en la playa de faena, clasificados y congelados. Se procesaron muestras correspondientes a pared folicular de: folículos pequeños (FP) (< a 5mm), grandes (FG) (10-12mm) y quistes (Q) (> a 20mm). El análisis de las bandas obtenidas se llevó a cabo por densitometría óptica en relación a la cuantificación de la expresión de un gen normalizador (GAPDH). La expresión de RE β fue significativamente menor en Q comparado con FP y FG ($p<0,05$). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de ARNm de RE α . La diferencia encontrada en la expresión de ARNm de RE β podría atribuirse a las alteraciones en la secreción de las hormonas gonadotróficas, ya que se sabe que los niveles elevados de gonadotrofinas regulan hacia abajo la expresión del RE β y las vacas con COD presentan niveles elevados de LH. En este sentido, la regulación de la diferenciación y la subsiguiente función ovárica por estrógenos parece ser compleja e involucrar pasos de señalización celular y relaciones intrincadas por diferentes interacciones receptor-receptor. Cambios sutiles en la relación RE α :RE β podrían causar modificaciones en la acción y los efectos de éstas hormonas. Debido a que los REs presentan sensibilidad diferente al ligando y puede ocurrir heterodimerización e interferencias entre ellos, se puede sugerir que un desequilibrio entre los tipos de REs puede ser un factor involucrado en la patogenia de esta enfermedad.

0502 (431) FACTORES INMUNOMODULADORES REGULADOS POR PROGESTERONA (P) EN UN MODELO DE ABORTO SÉPTICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO (LPS). J Aisemberg ¹, C Vercelli ¹, S Billi ¹, A M Franchi ¹

¹CEFYBO <jaisemberg@yahoo.com.ar>

En los embarazos exitosos se produce el fenómeno de tolerancia materno-fetal. Uno de los mecanismos de protección local es el cambio de fenotipo de células Th1 a Th2 mediado en parte por P que también regula la producción endometrial de proteínas como LIF y Glicodelina (Gd) que cumplirían funciones similares. En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo de aborto por infección mediante la administración de LPS a hembras BALB/c en su día 7 de gestación. En 24 h hay reabsorción embrionaria (RE) completa (100%) y pasadas 48 h la hembra es viable para futuras gestaciones. Este modelo se caracteriza por el aumento *in vivo* de los niveles de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGs) en los sitios de implantación. El objetivo del trabajo fue caracterizar la producción de LIF y Gd en nuestro modelo y evaluar la producción/modulación de mediadores inflamatorios. Se administró LPS (1ug/g, i.p.) en el día 7 y se sacrificaron los animales a las 6 h. Se determinaron los niveles de P sérica (RIA), de ARNm de LIF y Gd (RT-PCR) y los niveles proteicos de Gd (western blot). La producción de NO (Griess), PGE (RIA) e IL-10 y TNF- α (ELISA) en cultivos de 48 h en ausencia/presencia de P (50, 100 y 500 ng/ml). Los animales tratados con LPS tienen disminuidos los niveles de P sérica ($p<0,05$). Estos animales muestran mayor expresión del ARNm de LIF en útero y menores niveles de Gd, ARNm y proteína ($p<0,05$, $p<0,001$ y $p<0,001$). La endotoxina activa el tejido para la producción de NO, PGE y TNF- α ($p<0,001$, $p<0,01$ y $p<0,01$) y este efecto es revertido por la incubación con P ($p<0,001$, $p<0,01$ y $p<0,001$). Se observó regulación positiva de la P sobre la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en animales tratados ($p<0,001$). La administración *in vivo* de P retrasa el inicio de la RE inducida por LPS. Las consecuencias de la caída en los niveles de P, la regulación que ésta ejerce sobre mediadores inflamatorios y el retraso de la RE revelan su rol fundamental en el éxito de la preñez.

0503 (457) EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA 3 DEL INTERCAMBIADOR SODIO/HIDRÓGENO (NHE-3) EN SINCITIOTROFBLASTO DE PLACENTA HUMANA PREECLÁMPTICA. V Dietrich¹, M Castro Parodi¹, A Recca¹, C Rodríguez¹, B Maskin², A E Damiano¹

¹Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.; ²Hospital Nacional Prof Dr Alejandro Posadas <vale_dietrich@hotmail.com>

El sinciotrofoblasto (STh) de placenta humana a término es una estructura continua multinucleada con mínimas uniones estrechas. El transporte de metabolitos, iones y agua entre la madre y el feto tiene lugar por rutas transcélulares. Existen evidencias que en condiciones patológicas como la Preeclampsia (PE), la expresión de muchos transportadores es anormal. Uno de los transportadores que podría estar alterado es la isoforma 3 del intercambiador sodio/hidrógeno (NHE-3) que juega un rol importante en la regulación del pH intracelular. Se sabe que en otros órganos como el riñón, tratamientos crónicos con insulina estimulan la expresión del NHE-3 mediante la vía del fosfatidil-inositol-3 quinasa. Recientemente, observamos que mujeres embarazadas que desarrollan PE presentan hiperinsulinemia. Nuestro objetivo es estudiar la expresión y localización de NHE-3 en placentas preeclámpticas. Para ello, estudiamos por RT-PCR, Western blot e inmunohistoquímica la expresión y localización del NHE-3 en Sth de placentas normales y preeclámpticas. Observamos por técnicas de biología molecular que el NHE-3 está disminuido en un 35% en placentas preeclámpticas ($n=10$, $p<0,05$) con respecto a las normales. Los experimentos de inmunolocalización evidencian una notable disminución de la marcación apical de este transportador en Sth de placentas preeclámpticas. Estos Resultados muestran que, a pesar de la hiperinsulinemia, NHE-3 está disminuido en placentas preeclámpticas. Esto sugiere que existiría alguna falla a nivel del receptor de insulina, lo cual conduciría a la falta de estimulación de la expresión de NHE-3. Más estudios se necesitan para dilucidar el rol del NHE-3 en la PE.

0504 (491) ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN CELULAR EN LOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE RATAS DURANTE EL DESARROLLO DE UNA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE). C V Pérez¹, C Sobarzo¹, B Denduchis¹, L Lustig¹

¹Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina UBA <ceciliaperez77@yahoo.com.ar>

La histopatología testicular en la OAE se caracteriza por un infiltrado linfomonocitario y un daño de los túbulos seminíferos con apoptosis y descamación de las células germinales (CG). A fin de determinar el papel que juegan las moléculas de adhesión celular (CAM's) en la descamación de las CG, analizamos la expresión de la N-cadherina (N-cad) y proteínas asociadas [â-catenina (â-cat) y p-120] que forman parte de las uniones adherentes entre células del epitelio germinal y de la conexina 43 (Cx-43) involucrada en las uniones nexo que comunican células adyacentes. La OAE fue inducida en ratas por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo OAE); las ratas del grupo control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes. Las ratas se sacrificaron a los 30 días (d) de la primera inmunización, a los 50d (orquitis focal) o a los 80d (orquitis severa). Por inmunofluorescencia (IF) no se observaron alteraciones en la expresión y distribución de las CAM's a los 30d, mientras que a los 50 y 80d se detectó un patrón de IF discontinua para N-cad en ratas con OAE, a diferencia del perfil continuo observado en ratas C. Por otro lado, se detectó un leve aumento de intensidad de IF para N-cad, â-cat y p-120 en las ratas con OAE vs C a los 50 y 80d. Por Western blot (Wb) se observó un aumento significativo en la expresión de N-cad en ratas con OAE vs C sólo a los 80d (media±SEM, 30d:1,48±0.43 vs 1,37±0.33; 50d:0,68±0.06 vs 0,73±0,19; 80d:3,07±0.41 vs 1,57±0.21*, $p<0,05$). En cambio, la expresión de Cx-43 disminuyó

en ratas con OAE vs C, en todos los tiempos estudiados (media±SEM, 30d:0,62±0.28 vs 1,00±0,19; 50d:0,20±0.11 vs 1,15±0.16*; 80d:0,26±0.18 vs 1,11±0.11*, $p<0.05$). El aumento de expresión de N-cad, â-cat y p-120 en ratas con OAE sugiere la existencia de un mecanismo que intenta mantener, sin éxito, la adhesión intercelular. La disminución de la expresión de Cx-43 indicaría la reducción de la comunicación celular, asociada a la descamación de las CG.

0505 (511) LA LEPTINA ESTIMULA LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA ACTIVANDO LA MAQUINARIA ACTIVADORA DE LA TRADUCCIÓN EN CÉLULAS TROFBLÁSTICAS HUMANAS. V Sánchez Margalet¹, A Perez Perez¹, Y Gambino², J Maymó², C Varone²

¹Hospital Universitario Virgen Macarena; ²Dpto Quimica Biologica.FCEN-UBA Argentina <margalet@us.es>

La leptina, el producto del gen Ob de 16 kDa, fue considerada originalmente como una señal derivada del adipocito para regular el metabolismo a nivel central. Sin embargo, se han identificado efectos pleiotrópicos sobre la reproducción y el embarazo, particularmente a nivel de la placenta, donde puede actuar como una hormona autocrina que media la angiogenesis, el crecimiento y la inmunomodulación. El receptor de leptina (Ob-R) tiene una secuencia homóloga a la de los miembros de la superfamilia de receptores de citocinas de clase I (gp130). De hecho, hemos encontrado que la leptina puede funcionar como una citosina proinflamatoria. También hemos encontrado que la leptina es un factor trófico y mitogénico para las células trofoblásticas, por medio de su efecto inhibitorio de la apoptosis y promotor de la proliferación, a través de la activación de la vía de MAPK. La síntesis de proteína se sabe que está regulada por la insulina y otras hormonas a través de la fosforilación de diferentes factores reguladores de la iniciación y la elongación de la traducción. Para investigar el mecanismo por el cual la leptina estimula el crecimiento celular en células JEG-3 y células trofoblásticas humanas, hemos estudiado el estado de fosforilación de diferentes proteínas de los estadios iniciales de la traducción, así como la síntesis de proteínas por medio de la incorporación de leucina tritiada. Hemos encontrado que la leptina estimula la fosforilación (activación) de el factor de iniciación de la traducción 4E (eIF4E), así como su proteína de unión 4FBP1 (PHAS-I), lo cual libera al factor eIF4E para fosforilarse y formar complejos activos para la traducción. En consecuencia la leptina estimula la síntesis de leptina de forma dependiente de la dosis, y este efecto puede ser parcialmente prevenido bloqueando la actividad MAPK y PI3K. En conclusión, la leptina estimula la síntesis de proteína activando la maquinaria de traducción por medio de la activación de las vías MAPK y PI3K

0506 (535) CANALES DE CLORURO EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE TROFBLASTO HUMANO (BEWO). G Marino¹, S del Mónaco¹, Y Assef¹, B A Kotsias¹

¹Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari <gabinemar@gmail.com>

El canal de cloruro CFTR y el canal epitelial de sodio (ENaC) se localizan en la membrana apical de epitelios absortivos y se encargan del balance hidroelectrolítico en los mismos. El sinciotrofoblasto (SCT) contiene transportadores de Na⁺ y Cl⁻ que participan en la nutrición del feto y en el mantenimiento de la homeostasis celular. El CFTR fue descrito en SCT de placenta humana y hemos evidenciado la expresión del ENaC en este tejido y en la línea celular BeWo, derivada de trofoblasto humano. El objetivo del presente trabajo es caracterizar el transporte de Cl⁻ en células BeWo, utilizando técnicas electrofisiológicas y de biología molecular. Mediante la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula entera, detectamos corrientes de Cl⁻ con una conductancia saliente macroscópica de 24.5 ± 5.9 pS/pF, determinada entre 0 y 100 mV ($n=6$). Las corrientes fueron normalizadas por la capacitancia de membrana, cuyo valor promedio fue 41.0 ± 20.2 pF. Estos datos se correlacionaron con los obtenidos a partir de registros de canal único, utilizando la configuración *inside-out* de

patch clamp, donde hemos identificado dos tipos de canales de Cl⁻. Uno que presentó una conductancia intermedia de 73.8 ± 33.0 pS ($n=3$) y el otro de corrientes más pequeñas con una conductancia de 13.1 ± 8.5 pS ($n=2$). La baja conductancia del segundo tipo de canal sería compatible con la observada para canales tipo CFTR estudiados en otros sistemas. Mediante estudios por RT-PCR del canal CFTR en las células BeWo observamos la banda esperada a ~295 pb y por Western blot detectamos la banda típica de ~160 kDa que nos permitió confirmar que el CFTR se expresa en las células BeWo. Concluimos que las células BeWo, utilizadas como modelo de trofoblasto humano, expresan canales de cloruro funcionales. Nuestros Resultados serían un aporte al conocimiento del transporte de cloruro y su relación con el de sodio en tejidos placentarios.

0507 (580) ÁCIDO ÚRICO Y PROTEÍNA C REACTIVA COMO POSIBLES PREDICTORES PRECOSES DE PREECLAMPSIA. A Corominas¹, S Balconi¹, M Castro Parodi², B Maskin¹, A E Damiano²

¹Hospital Nacional Prof Dr Alejandro Posadas; ²Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires <alicia_damiano@hotmail.com>

La preeclampsia (PE) es un síndrome exclusivo de la gestación humana de etiología desconocida. Su incidencia es la causante de una elevada morbilidad materno-fetal a nivel mundial, por lo cual es imprescindible dilucidar los mecanismos por los cuales se desarrolla. En la Argentina, aproximadamente el 13% del total de los embarazos patológicos corresponden a una enfermedad hipertensiva gestacional. El diagnóstico temprano de este desorden llevaría a una disminución en la tasa de mortalidad materno-fetal. Numerosos hallazgos han descrito al ácido úrico como posible promotor de la inflamación, del estrés oxidativo y de la disfunción endotelial característicos de este desorden. Nuestro objetivo fue evaluar retrospectivamente los niveles séricos de ácido úrico en embarazadas que desarrollaron PE y compararlo con gestantes normales para dilucidar su importancia como potencial marcador precoz de PE. Analizamos las historias clínicas de 15 gestantes preeclámpicas y 15 normales y comparamos la evolución de los embarazos, el tiempo de gesta al momento del desenclavamiento de los signos clínicos, los antecedentes previos y la historia familiar. La habilidad del ácido úrico para promover la inflamación fue investigada a través del dosaje de la proteína C reactiva (PCR). Nuestros Resultados muestran un aumento significativo de la PCR ($p<0,05$) y un incremento de la concentración de ácido úrico en un 25 % en la semana 20 de gestación y en un 70 % en la semana 30 ($n=15$, $p<0,05$) en embarazadas con PE, mientras que en gestantes normales, la concentración de ácido úrico se mantuvo constante a lo largo de todo el embarazo. Si bien estos Resultados son preliminares sugieren que el aumento progresivo de los niveles séricos de ácido úrico a partir de la semana 20 de gestación y una PCR aumentada podrían ser utilizados como indicadores tempranos que sirvan para implementar terapias que eviten el desarrollo de la PE y logren una gestación exitosa.

0508 (581) LA TOXINA SHIGA INDUCE ABORTO EN RATAS EN ESTADIO TARDIO DE PREÑEZ. J Burdet¹, E Zotta¹, C Tironi Farinati¹, A M Franchi², C Ibarra¹

¹Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA; ²Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO), Facultad de Medicina, UBA <julburdet@hotmail.com>

Escherichia coli enterohemorrágica (STEC) causa diarrea acuosa, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), caracterizado por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (IRA). El SUH en Argentina es la primera causa de IRA en pediatría y la segunda de daño renal crónico. El factor de virulencia más importante de STEC es la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) que produce necrosis y apoptosis en los

órganos blanco. Hasta este momento no se conoce cómo las infecciones por STEC afectan a mujeres embarazadas. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de Stx2 en ratas de 14-16 días de preñez inyectadas por vía i.p. con sobrenadante filtrado de E coli recombinante que contiene Stx2. Observamos que el 100% de las ratas tratadas con 1-6 ng Stx2/g de peso de rata presentaron reabsorción fetal, desprendimiento placentario, hemorragia intrauterina y muerte fetal al cabo de 1-2 días post-inyección. El estudio macroscópico de la unidad fetoplacentaria, mostró extensas zonas necróticas-hemorrágicas, friables, que se correspondieron histológicamente con las áreas donde se inmuno-localizó la toxina. Cuando las ratas preñadas se trataron con la dosis letal 50 (LD₅₀) de ratas no preñadas (2 ng/g peso) se observó una supervivencia post-aborto del 100% a los 12 días post-inyección. Los estudios histológicos de útero y riñón mostraron una histoarquitectura conservada. Los parámetros renales no mostraron alteraciones funcionales. Estos Resultados sugieren que el aborto sería consecuencia de la acción de Stx2 en la unidad feto-materno-placentaria, y que el estado de preñez genera en las ratas que abortaron un efecto protector ante la injuria inducida por Stx2.

0509 (587) LA ANANDAMIDA (AEA) MODULA LA SÍNTESIS Y LA DEGRADACIÓN DE LAS PROSTAGLANDINAS (PG) UTERINAS DURANTE LA PREÑEZ. C Vercelli¹, J Aisemberg¹, A M Franchi¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET) <clauverce77@yahoo.com.ar>

Los endocannabinoides son mediadores lipídicos aislados principalmente de cerebro. La AEA (uno de los principales endocannabinoides) modula el desarrollo embrionario y la implantación aunque niveles elevados de este compuesto son nocivos para estos procesos. En nuestro laboratorio hemos observado que la AEA participa en la síntesis uterina de óxido nítrico inducida por lipopolisacárido. En procesos sépticos, las PGs son liberadas en grandes cantidades y tienen efectos abortivos puesto que estimulan la contractilidad del endometrio. Trabajos previos sugieren una relación entre las PGs y la AEA en diversos tejidos. El objetivo de este trabajo es estudiar si existe una interrelación entre la AEA y el camino biosintético de las PGs en el útero de animales preñados. Para ello, ratonas en día 7 de preñez fueron sacrificadas, se extrajeron los úteros individualizando los sitios de implantación y separando útero y decidua. Los úteros fueron incubados por 24h a 37°C en presencia de distintas concentraciones de meta-AEA y se determinó la producción de PGs en los sobrenadantes de cultivo por radioinmunoensayo (RIA). Observamos que la AEA disminuye los niveles de PGs ($p<0,001$) en todas las concentraciones ensayadas. Como la AEA aumentó la expresión proteica de la COX-2 en forma concentración dependiente, decidimos estudiar el metabolismo de las PGs en este sistema. La expresión proteica de la 15-hidroxi-prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH), primera enzima que metaboliza las PGs, se encuentra aumentada cuando los úteros se incuban en presencia de AEA ($p<0,05$), indicando una mayor metabolización de las PGs. Estos Resultados sugieren que la AEA modula los niveles de PGs aumentando la expresión proteica de COX-2, enzima que las sintetiza y la de 15-PGDH, la que las metaboliza, lo que determina una menor concentración de PGs en el medio.

0510 (605) VIP MODULA LA EXPRESIÓN DE LIF A NIVEL SISTÉMICO Y EN EL DIALOGO MATERNO-FETAL. J Alfieri¹, L Fraccaroli¹, L Larocca¹, V Roca¹, M Calafat¹, C Pérez Leirós¹, R Ramhorst¹

¹Laboratorio de Inmunofarmacología, Dpto Química Biológica, FCEN-UBA <baty_191@hotmail.com>

El Factor Inhibidor de Leucemias (LIF) promueve la diferenciación del trofoblasto y sigue la cinética de las citoquinas proinflamatorias. VIP (péptido intestinal vasoactivo) regula el balance de mediadores pro/anti inflamatorios e induce tolerancia de aloinjertos. Aquí, estudiamos el efecto anti-inflamatorio de VIP en la regulación de LIF en el diálogo entre células trofoblásticas y

leucocitos maternos, en condiciones normales (mujeres fértiles) y patológicas (aborto recurrente espontáneo:ARE). La cuantificación de linfocitos maternos CD3+LIF+ luego de 5 días de aloestimulación con MNTs paternos in vitro, aumentó un 8% en mujeres fértiles a diferencia de las pacientes con ARE ($p<0.05$). En estas condiciones, VIP disminuyó la expresión de LIF evidenciada por Western Blot y este efecto se acompañó por una modulación de la relación pStat3/Stat3 y de la metaloproteína 9 (MMP9). A nivel del diálogo materno-fetal, realizamos cocultivos de células trofoblásticas (Línea celular Swan-71) y MNT maternas en ausencia/presencia de VIP (10-5,10-8 M). El análisis por Western Blot de los cocultivos con MNT de mujeres fértiles reveló que VIP disminuye la expresión de LIF en forma dosis dependiente ($X\pm SE\%$: 8.5 ± 0.5 ; $+VIP$ 2.6 ± 0.8) mientras que en los de pacientes con ARE la expresión fue significativamente menor y no se moduló en presencia de VIP ($p<0.05$). Este efecto se confirmó específicamente para células CD3+LIF+, fue dosis dependiente, específico ya que su péptido antagonista lo revierte ($12\pm 2\%$ +antagonista) y se asoció con una modulación de pStat3/Stat3 y MMP9 ($p<0.05$). VIP disminuye la frecuencia de linfocitos T productores de LIF a nivel local y sistémico controlando la respuesta pro-inflamatoria inicial y contribuyendo a la tolerancia materno-fetal.

0511 (509) CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA LKB1/AMPK EN EL TESTÍCULO. A C Agnello¹, M N Galardo¹, M F Riera¹, E H Pellizzari¹, S B Cigorraga¹, S B Meroni¹

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET) <anitacaroli@hotmail.com>

La kinasa activada por AMP (AMPK) es una enzima clave en el control de la homeostasis energética celular. Es un heterotrímero compuesto por una subunidad catalítica alfa y dos subunidades regulatorias beta y gama. Es activada por un aumento en la relación AMP/ATP que conduce a la fosforilación de la subunidad alfa por kinasas río arriba, la más estudiada LKB1. Previamente observamos que AMPK se expresa en todas las células testiculares. El objetivo de este trabajo fue analizar la posible expresión diferencial de isoformas de la subunidad catalítica alfa de AMPK y de LKB1 en células testiculares. Se aislaron células de Sertoli (CS), germinales (CG) y de Leydig (CL) a partir de ratas de 20, 27 y 60 días de edad respectivamente. Además, se obtuvieron homogenatos de músculo (M) y de testículo (T) de animales de 20, 30 y 60 días de edad. La expresión de las subunidades alfa1 y alfa2 de AMPK y la de LKB1 se analizó por Western Blot. Se observó que alfa1 se expresa más en T que en M y alfa2 más en M que en T. Asimismo, se vio distinta expresión de alfa1 y 2 en CS, CG y CL. Se demostró que la expresión de LKB1 aumenta en el testículo con la maduración sexual y dado que existe baja expresión en CS, los Resultados sugieren localización en CG. En ausencia de LKB1, la activación de AMPK en CS podría producirse por calmodulina kinasa kinasa (CAMKK) dependiente de Ca^{2+} , kinasa que activa AMPK en ciertas células. Para evaluar esta posibilidad incubamos con el ionóforo de calcio 4BrA23187 y determinamos los niveles de AMPK fosforilada (AMPK-P). Observamos que el ionóforo produce un aumento de AMPK-P: 5min: 1.1 ± 0.2 ; 15min: $2\pm 0.3^*$; 30min: 1.6 ± 0.3 (veces de estímulo vs basal, $n=3$, $*p<0.05$). Los Resultados demuestran una expresión diferencial de subunidades alfa de AMPK y de LKB1 en las células del testículo. Además, la baja expresión de LKB1 en CS y el aumento de AMPK-P en respuesta al ionóforo sugieren que en CS la activación de AMPK es mediada por CAMKK.

REPRODUCCION P2

0512 (33) EN LA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ES REGULADA EN LAS SUBPOBLACIONES DE MACRÓFAGOS RESIDENTES Y NO RESIDENTES DEL TESTÍCULO. S Jarazo Dietrich¹, P Jacobo¹, C V Perez¹, L Lustig¹, M S Theas¹

¹Instituto de Investigaciones en Reproducción Facultad de Medicina UBA <sabrina.jarazo@gmail.com>

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un modelo de inflamación testicular crónica caracterizado por la presencia de un infiltrado intersticial de macrófagos (M) y linfocitos y apoptosis de las células germinales. Ha sido propuesto que la subpoblación de M residentes (ED2*ED1-) del testículo se diferencia a partir de los monocitos que provienen de la circulación (ED1*ED2- no residentes) e incluiría una subpoblación residente intermedia (ED1*ED2*) cuya existencia aún no ha sido demostrada. Previamente, en la OAE demostramos un aumento de la producción de óxido nítrico por los M testiculares concomitante con el inicio de la lesión testicular. Los objetivos de este trabajo fueron, demostrar por citometría de flujo la existencia de la subpoblación de M ED1*ED2* y evaluar la expresión de las isoformas inducible (i), endotelial (e) y neuronal (n) de la óxido nítrico sintasa (ONS) en las subpoblaciones de M 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. En el grupo E vs C observamos un aumento significativo en el número de M ED1*ED2* que expresan la ONSi (media±DE ONSi E:4620±2462* C:1695±415 $p<0.05$, ONSe E:3402±2211 C:1647±417, ONSn E:3620±3229 C:1951±589) en el de ED2*ED1- que expresan la ONSe (ONSe E:1637±1044** C:463±157 $p<0.01$, ONSi E:1144±906 C:649±416, ONSn E:2314±1027 C:1217±402) y en el de ED1*ED2* que expresan la ONSe (ONSe E:1131±532** C:547±55 $p<0.01$, ONSi E:677±242 C:677±382, ONSn E:1249±768 C:812±178). En conclusión, demostramos por primera vez la existencia de la subpoblación de M ED1*ED2* sugiriendo que en este modelo los M ED2*ED1- pueden diferenciarse a partir de dicha subpoblación. Por otro lado, dado que el número de M residentes que expresan ONSe aumenta sugerimos que éstos tendrían un rol activo en el desarrollo del cuadro inflamatorio complementando la acción de los M no residentes que expresan la ONSi.

0513 (39) EFECTO DEL MONO-(2-ETILHEXIL) FTALATO (MEHP) EN LAS CÉLULAS DE SERTOLI. ROL DEL GLUTATIÓN. M A Iwachow¹, H F Scheingart¹

¹CENTRO DE INVESTIGACIONES ENDOCRINOLÓGICAS (CEDIE), HOSPITAL DE NIÑOS R. GUTIÉRREZ <hscheingart@cedie.org.ar>

El di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) es un disruptor endocrino ampliamente distribuido en el medio ambiente; se lo utiliza como componente de envases de alimentos, cosméticos, juguetes, etc. El MEHP, metabolito del DEHP, altera la función testicular afectando las interacciones célula-célula en los túbulos seminíferos, especialmente las que se establecen entre células de Sertoli (SC). Se ha demostrado que los disruptores endócrinos inducen estrés oxidativo en las células testiculares. El glutatión (GSH) participa en la protección celular contra el estrés oxidativo y en la detoxificación de xenobióticos. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del MEHP sobre la viabilidad celular y el contenido de GSH en SC. Se aislaron SC de ratas de 20-días de edad y se cultivaron por 5 días en medio químicamente definido. Las SC se estimularon con MEHP (1-100mM) durante las últimas 48, 24, 6 ó 3 horas. La citotoxicidad se analizó por el método de MTS. El GSH intracelular total se determinó por un método espectrofotométrico. Los datos se expresan como % del basal a cada tiempo, media ± DS, $n=4$, $*p<0,05$ vs. Basal (Basal: 127.3 ± 9.9 pmol GSH/mgDNA). El tratamiento con MEHP no modificó la viabilidad celular con ninguna de las dosis utilizadas y en ninguno de los tiempos analizados. Se observaron modificaciones de los niveles de GSH con el disruptor: MEHP 100iM: 3hs $85\pm 7\%$; 6hs $78\pm 4\%$; 24hs $68\pm 4\%$. A dosis menores, solo se observaron modificaciones a 24hs de tratamiento, MEHP 1 mM: $89\pm 9\%$; MEHP 10mM: $85\pm 8\%$. Tratamientos por 48hs no modificaron los niveles de GSH en ninguna de las dosis ensayadas. La disminución del GSH a tiempos breves podría deberse a la conjugación de éste con el MEHP, mientras que a tiempos mayores los valores nor-

males de GSH indicarían el restablecimiento de la capacidad de defensa antioxidante de las SC. Estos Resultados sugieren que el GSH estaría involucrado en la defensa contra el MEHP en SC.

0514 (97) RANGO DE REFERENCIA PARA ANTICUERPOS ANTI-ANEXINA V DETERMINADOS POR ENZIMOINMUNOANÁLISIS. M E Cogo¹, M Bearzotti¹, M Svetz¹, M Valdés¹, S Daniele¹, A Almará^{1,2}, S Ghersevich¹, F Pelusa¹, S Arriaga¹

¹Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; ²CIUNR <eugeniacogo@hotmail.com>

Las anexinas son proteínas que unen fosfolípidos de manera Ca⁺⁺ dependiente. Se les atribuye un amplio espectro de funciones biológicas, entre las que se destaca el papel anticoagulante. Se ha sugerido que el desplazamiento de la anexina V de la superficie del sincitiotrofoblasto placentario por los anticuerpos (Ac) anti-anexina V, sería responsable de un ambiente trombogénico que podría vincularse a la pérdida fetal recurrente. El objetivo del trabajo fue el desarrollo de un ELISA tipo sandwich para determinar los niveles plasmáticos de Ac anti-anexina V y la obtención de un intervalo de referencia para dicho parámetro en la población femenina normal. Se trabajó con un grupo de 28 mujeres sanas, no embarazadas, con al menos 2 embarazos previos normales y sin antecedentes de complicaciones obstétricas, edad (promedio ± DE): 34 ± 8 años; rango: 25-48. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de nuestra institución. Se sensibilizaron tiras de poliestireno con anexina V humana comercial (Sigma). Luego de lavar se agregaron 100 µl de los calibradores, controles (Orgentec Diagnostika GmbH) y plasmas diluidos 1/100. Tras un período de incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, se reveló la presencia de Ac anti-anexina V con un Ac anti-IgG humana conjugado con peroxidasa utilizando como sustrato tetrametilbenzidina-H₂O₂. Las densidades ópticas se determinaron a 450 nm con filtro de referencia a 630 nm. Los Resultados se expresaron en U/ml y el intervalo de referencia encontrado fue de 0 a 6 U/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 8,0% y 4,5% respectivamente. La técnica desarrollada y la obtención de un rango de referencia para Ac anti-anexina V en mujeres normales nos permitirá estudiar la posible asociación entre un aumento del nivel de estos Ac y el aborto recurrente.

0515 (132) EFECTO DUAL DEL AMPC EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA EN PLACENTA. J Maymó¹, V Sánchez Margalet², J C Calvo^{1,3}, C L Varone¹

¹Depto de Química Biológica-Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA; ²Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Universidad de Sevilla, Sevilla, España; ³Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina. <jmaymo@qb.fcen.uba.ar>

La leptina (LEP) ha sido propuesta como una molécula fundamental en la regulación de la implantación y en el mantenimiento del embrión. Es una hormona de 16kDa descubierta en tejido adiposo con la función de regular el balance energético del organismo. También es expresada en placenta humana donde podría tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación. El rol de la leptina en la implantación y crecimiento embrionario es aún desconocido. Hemos demostrado que estradiol y hCG inducen la expresión de leptina en células placentarias. La activación de la vía del AMPc coordina procesos celulares y media la acción de diversas hormonas en la placenta. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el rol del AMPc en la regulación de la expresión de leptina en placenta y los mecanismos involucrados; utilizando como modelo la línea celular trofoblástica BeWo y explantos de placenta humana. Por western blot determinamos que el AMPc (1µM) estimuló la expresión de leptina en células BeWo (2.5 veces). El tratamiento con H89 50µM (inhibidor de PKA) suprimió dicho efecto. Obtuvimos similares Resultados en explantos de placenta, donde también el AMPc indujo la fosforilación de CREB y de MAPK de manera dosis de-

pendiente. En ensayos de gen reportero con plásmidos conteniendo el promotor de leptina y el gen luc determinamos que el AMPc (0.1-10µM) estimuló la expresión de leptina hasta 6 veces. El tratamiento con SQ22536 (inhibidor de AC) reprimió este efecto. Por otro lado, observamos que altas concentraciones de AMPc (100-1mM) inhibieron la activación del promotor (3 veces). Más aún, cuando se sobreexpresaron la subunidad catalítica de PKA o el factor de transcripción CREB o ambos, la expresión de leptina se reprimió drásticamente (3, 7 y 16 veces respectivamente). Los Resultados obtenidos mejoran la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de leptina en trofoblastos humanos por la interrelación de diversas vías de señalización activadas por AMPc.

0516 (253) PARTICIPACIÓN DE LOS ESPLENOCITOS EN LA REGULACIÓN DE LA ESTEROIDOGENESIS POR LAS POBLACIONES DE CÉLULAS DEL OVARIO EN RATA CON POLIQUISTOSIS OVÁRICA. M L Forneris¹, F Figueroa¹, D Cardozo¹, L Oliveros¹

¹Universidad Nacional de San Luis <mform@unsl.edu.ar>

Con anterioridad mostramos que la respuesta esteroideogénica del ovario de rata con poliquistosis ovárica (SOP) se modifica cuando éste es incubado con el sobrenadante de los líquidos de cultivo (LC) de esplenocitos de bazo. Para establecer cual es la población celular responsable de dicha respuesta esteroideogénica ahora estudiamos el efecto de los LC de esplenocitos de ratas SOP y controles (C), sobre la liberación de progesterona (P) y androstenediona (A) desde las células intersticiales (CI) y luteales (CL) de ovarios SOP y C. La condición SOP fue inducida en ratas 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. Las ratas C se sacrificaron en estro. Los esplenocitos se cultivaron (1x10⁶ cél.) por 24 hs en medio RPMI, adicionado de suero fetal bovino. Las CI y CL se obtuvieron por tratamiento con colagenasa y DNasa y se estimularon con los LC de esplenocitos, por 4 hs en estufa de cultivo. Las concentraciones de P y A liberadas al medio se midieron por RIA. La liberación basal de A desde CI-SOP fue mayor que desde las CI-C (p<0.001). Ello se asociaría a la hiperplasia de las CI y al aumento de folículos atrésicos. Los LC de esplenocitos SOP, respecto a los de esplenocitos C, disminuyeron la liberación de A desde las CI-SOP (p<0.01), lo que sugiere diferencias entre los líquidos. La liberación basal de P por CI-SOP fue mayor que la de las CI-C. La relación de A/P de 0.4 para las CI-SOP y de 0.1 para las CI-C (p<0.001), indicaría una conversión incrementada *in vitro* de P a A. No hubo cambios en la liberación de A entre CL-SOP y CL-C, así, las CL no serían las responsables del aumento de P. En condiciones basales la liberación de P por las CL-SOP fue menor que la de las CL-C (p<0.001) y no se modificó con los LC SOP y C. Las CI serían las responsables de los efectos inmuoendocrinos observados que conllevan a una disfunción en la esteroideogénesis del ovario SOP.

0517 (286) EFECTO DEL INHIBIDOR DE CICLOOXIGENASA-2, CELECOXIB, Y DEL INHIBIDOR DE AROMATASA, ANASTROZOLE, SOBRE EL DESARROLLO DE LAS LESIONES ENDOMETRIÓICAS EN UN MODELO MURINO DE ENDOMETRIOSIS (EDT). C N Olivares¹, A G Ricci¹, M A Bilotas¹, R I Barañao¹, G F Meresman¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental <olivares@dna.uba.ar>

Estudios previos en modelos experimentales de cáncer han reportado que tanto el inhibidor selectivo de COX-2 celecoxib, como el inhibidor de aromatasa anastrozole, disminuyen la proliferación celular e inducen la apoptosis tanto *in-vitro* como *in-vivo*. En base a estos antecedentes y con la intención de buscar nuevas alternativas terapéuticas para la EDT, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de celecoxib y de anastrozole y su posible efecto sinérgico sobre el crecimiento de las lesiones endometriósicas en un modelo murino de EDT. A ratones hem-

bra BALB/c de 8 semanas se les extirpó un cuerno uterino, se abrió longitudinalmente y se cortó en 3 fragmentos de igual tamaño que se suturaron al mesenterio del intestino. El día 1 post cirugía se comenzó con los tratamientos de acuerdo al siguiente esquema: grupo celecoxib, administración de 1500 ppm de celecoxib en la comida; grupo anastrozole, inyección diaria de 0,5 mg/kg de anastrozole; grupo anastrozole+celecoxib, combinación de ambos tratamientos y grupo control, inyección diaria de solución fisiológica. Al cabo de 4 semanas de tratamiento los animales fueron sacrificados, se localizaron las lesiones endometriósicas, se determinó su volumen y se extrajeron y fijaron para realizar cortes histológicos. Se evaluó proliferación celular por inmunohistoquímica de PCNA. Tanto anastrozole como celecoxib de manera independiente disminuyeron significativamente la proliferación celular de las lesiones ($p < 0,05$ vs. control). Luego del tratamiento combinado, no se observaron diferencias significativas en la reducción del índice de proliferación celular de las lesiones. Solamente celecoxib fue eficiente en disminuir el porcentaje de lesiones desarrolladas por ratón ($p < 0,01$ vs. control) así como el tamaño de las mismas ($p < 0,05$ vs. control). Nuestros Resultados sugieren que los tratamientos no actuarían sinérgicamente y que celecoxib sería más eficiente en la inhibición del desarrollo de las lesiones endometriósicas.

0518 (305) NORADRENALINA Y ACETILCOLINA, DESDE EL GANGLIO CELÍACO, MODIFICAN LA LIBERACIÓN OVÁRICA DE PROGESTERONA Y ÓXIDO NÍTRICO EN EL PRIMER CICLO ESTRAL. C G Escudero^{1,2}, M Gordillo^{1,2}, S Delgado^{1,2}, D Carrizo^{1,2}, A Rastrilla^{1,2}

¹LABIR; ²UNSL <carlaescudero@hotmail.com>

La inervación simpática ovárica está relacionada con la esteroidogénesis ovárica, foliculogénesis, desarrollo y regresión del cuerpo lúteo en diferentes especies. Esta inervación incluye el Nervio Ovárico Superior (NOS) y el Ganglio Celíaco (GC), el cual es capaz de recibir e integrar señales provenientes del SNC e influir en la fisiología ovárica. El objetivo del trabajo fue estudiar la acción de Noradrenalina (NA) y Acetilcolina (Ach) en GC sobre la liberación ovárica de progesterona (P) y óxido nítrico (NO) en el primer ciclo estral (proestro, estro y diestro II). Se usó el sistema ex-vivo GC-NOS- 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 Krebs-Ringer 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 P por RIA y NO por la reacción de Griess. Estadística: Student con significancia ($p < 0,05$) respecto al control. En la liberación de P en el compartimento ovárico, a lo largo del ciclo estral, la adición de NA en GC mostró un efecto estimulador, en tiempos prolongados (60 y 120 min). Ach mostró un fuerte efecto inhibitorio sobre la liberación de P en las tres etapas. Por otro lado, ambos neurotransmisores mostraron un patrón similar sobre la liberación de NO, provocando una estimulación en proestro e inhibición en diestro II. En estro ninguno de los estímulos provocó cambios significativos. Los Resultados muestran que NA y Ach modulan la liberación ovárica de P en el primer ciclo estral de la rata, actuando NA favor de la fisiología ovárica. El aumento de NO llevará a un incremento del flujo sanguíneo favoreciendo, la ovulación y luteinización en la primera etapa (proestro) y es inhibido hacia el final del ciclo (diestro) para permitir la maduración del cuerpo lúteo.

0519 (325) EFECTO DE PROTEÍNAS DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA MOTILIDAD Y ULTRAESTRUCTURA DE ESPERMATOZOIDES DE CARNERO POST-DESCONGELACIÓN. A L Bernardini¹, F Hozbor², R Alberio², M Fornés³, A Cesari¹

¹Instituto de Investigaciones Biológicas - UNMdP; ²Departamento de Producción Animal - EEA INTA Balcarce; ³IHEM-CONICET - Mendoza <alebernardini@gmail.com>

La inseminación artificial es una herramienta invaluable en la reproducción asistida. Esta técnica exige la conservación del semen mediante congelación. En algunas especies, la "crioconservación" induce cambios en la membrana plasmática que reproducen las características de espermatozoides (Ez) que han iniciado la capacitación, reduciendo notablemente la capacidad fertilizante de estas células. El plasma seminal (PS) de carnero es capaz de revertir los efectos nocivos producidos por el congelamiento sobre los Ez mejorando los parámetros seminales post-descongelación, especialmente la motilidad. La posibilidad de utilizar fracciones de PS para mejorar el semen crioconservado contribuirá al desarrollo de medios de congelación de composición definida. Hipotetizamos que una fracción de proteínas del PS que interactúan con la membrana espermática (FR) está involucrada en la conservación de la motilidad y en el mejoramiento de la ultraestructura de los Ez ovinos crioconservados. Ez de carneros fueron incubados post-descongelación con PS completo (PS; control +), con FR, con PS sin las proteínas contenidas en FR (PS⁻), con PS sin proteínas (PS⁰) o con buffer salino (PBS; control -). Se midió la motilidad progresiva en el tiempo y se evaluó la ultraestructura por microscopía electrónica de transmisión. Las moléculas contenidas en las fracciones PS⁻ y PS⁰ no fueron suficientes para ejercer el efecto protector del PS sobre la motilidad de los Ez crioconservados. Sin embargo, la FR por sí sola no evitó la pérdida de motilidad post-descongelación. Por otro lado, un porcentaje mayor de Ez incubados con PS o con FR mostraron características ultraestructurales de células que no sufrieron reacción acrosomal, respecto a los Ez incubados con PBS o con PS⁰. Las proteínas del PS afines a la membrana espermática serían capaces de revertir los efectos nocivos de la congelación sobre la integridad de los Ez, aunque serían necesarios otros componentes del PS para conservar su motilidad.

0520 (353) NIVELES DE IGF1, INSULINA Y EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE INSULINA EN EL CRECIMIENTO FETO-PLACENTARIO INDUCIDO POR IGF2 EN RATAS PREÑADAS A TÉRMINO. V White¹, E Capobianco¹, R Higa¹, A Jawerbaum¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos <vernica73@yahoo.com.ar>

El crecimiento feto-placentario está modulado por diversas hormonas y factores, entre los cuales son importantes el IGF1, IGF2 y la insulina. El incremento de IGF2 fetal induce macrosomía y placentomegalia. Tanto la insulina como el IGF1 y IGF2 son ligandos del receptor de insulina (RI), que se expresa en dos isoformas, una (+11) con efectos sobre el metabolismo, y otra (-11) disparadora de efectos mitogénicos que acompañan a procesos de crecimiento. Con el objeto de clarificar los mecanismos que conducen a la placentomegalia, se estudió el efecto de la administración fetal de IGF2 sobre los niveles de insulina e IGF1 en suero fetal, y sobre la expresión génica placentaria de RI, de citokeratina 7 (CTK 7, marcador de trofoblastos) y del factor Von Willebrand (VWF, marcador de células endoteliales). **Metodologías:** Se operaron ratas preñadas en los días 19, 20 y 21 de preñez, y se inyectaron sus fetos con IGF2 (2 ng) o con vehículo. El día 21 de preñez se removieron placentas y fetos mediante cesárea. En el suero fetal se analizaron por EIA los niveles de IGF1 e insulina. En el tejido placentario se analizó la expresión génica de RI, CTK-7 y VWF por RT-PCR. Resultados: Se observó insulinopenia ($p < 0,001$) y elevados niveles de IGF1 ($p < 0,05$) en los fetos inyectados con IGF2 comparados con su control. Se encontró un aumento en la expresión del RI ($p < 0,05$), en particular de la isoforma mitogénica RI (-11) ($p < 0,01$), así como un incremento de los marcadores placentarios CTK 7 ($p < 0,01$) y VWF ($p < 0,05$) en las placentas de los fetos tratados con IGF2 respecto a los controles. Conclusiones: El IGF2 fetal modula los niveles de insulina e IGF1 en suero fetal, ejerciendo, a nivel placentario, efectos que conducen al incremento en la expresión de RI, y que, junto con los elevados niveles de IGF1 e IGF2 podrían estar induciendo el crecimiento placentario a través del incremento de las células trofoblásticas y endoteliales.

0521 (401) MODULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE GOLPE DE CALOR (HSPS) EN ESTRUCTURAS FOLICULARES NORMALES Y QUISTES DE OVARIOS BOVINOS. M.M Velázquez¹, D Arcangelo¹, N R Salvetti¹, H H Ortega¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral. <melisavelz@hotmail.com>

Las proteínas de golpe de calor (HSPs) están involucradas en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas así como en un gran número de procesos celulares. Además se relacionan con mecanismos de esteroidogénesis así como con el ensamble y transporte de receptores esteroides. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de HSP25, HSP60 y HSP90 en estructuras foliculares de ovarios bovinos normales y con enfermedad quística ovárica. Las muestras obtenidas en frigorífico, fueron fijadas en formol bufferado y procesadas siguiendo protocolos de rutina hasta la inclusión en parafina. La especificidad de los anticuerpos usados se comprobó mediante western blot. Utilizando inmunohistoquímica indirecta y análisis digital de imágenes se estudió la expresión de HSPs en granulosa y teca interna de folículos secundarios, terciarios y atrésicos de ovarios normales y con quistes. Se determinó marcación positiva tanto en células de la granulosa como de la teca interna, en citoplasma, núcleo o ambos, según el patrón de expresión de cada HSP en particular. Los Resultados obtenidos muestran que los quistes se inmunomarcaron de manera similar a los folículos terciarios tanto para HSP25 como HSP90, ya sea en células de la granulosa como en las de la teca interna. A su vez, la marcación en estas estructuras fue significativamente superior a la observada en folículos secundarios. En cambio, para el caso de HSP60, la expresión fue en todos los casos, significativamente mayor en quistes. Como se ha mencionado, las HSPs, además de cumplir su función principal como chaperonas moleculares, permiten a la célula adaptarse a cambios en su microambiente. La elevada expresión de la HSP60 probablemente juegue un rol importante en la permanencia de las estructuras quísticas y tal vez en los procesos de esteroidogénesis de éstas. Sin embargo faltan más estudios para determinar los mecanismos por los cuales esto se lleva a cabo.

0522 (433) IMPACTO DE RESTRICCIÓN DIETARIA Y SUPLEMENTACIÓN CON ACEITES VEGETALES SOBRE EL ÉXITO REPRODUCTIVO DE RATONES MACHO. G Stutz¹, M E Santillán¹, L M Vincenti¹, A C Martini¹, R D Ruiz¹, M Fiol de Cuneo¹

¹Instituto de Fisiología, Facultad Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba <gstutz42@gmail.com>

Los trastornos nutricionales provocados por la subnutrición y desbalances dietarios alteran la función reproductiva. Evaluamos los efectos de un enriquecimiento dietario con ácidos grasos esenciales sobre parámetros morfométricos y reproductivos de ratones macho Albino swiss adultos, con alimentación restringida. Dietas: *controles*, alimento ad libitum: comercial (CC), comercial suplementada (5%) con aceite de soja (CS, n3) o de girasol (CG, n6). *Restringidos* se aporta el 70 % de la cantidad de alimento consumido en 24 h por los controles: comercial (RC), soja (RS) o girasol (RG), desde gestación hasta adultez. Se evaluó peso corporal (PC), de órganos reproductivos (POR) e hígado (PH); actividad funcional de espermatozoides epididimarios (concentración, vitalidad, motilidad, prueba de resistencia osmótica, formas acodados y/o con gota citoplásmica) y capacidad fertilizante. Resultados: PC, POR y PH fueron significativamente inferiores en los grupos restringidos, a excepción del peso de vesículas seminales de RG. La concentración ($\times 10^9/\text{ml}$) fue significativamente inferior en los grupos restringidos: CC 19,93 \pm 1,46(n=8); RC 4,04 \pm 0,77(n=8); CS 18,20 \pm 3,01(n=8); RS 1,83 \pm 0,46(n=6); CG 18,43 \pm 3,34(n=8); RG 6,12 \pm 1,05(n=8) al igual que la capacidad fertilizante. En RC y RS la vitalidad disminuyó y el porcentaje de gametas con gota citoplásmica aumentó significativamente. Las

comparaciones se hicieron entre cada dieta restringida y su respectivo control, $p < 0.05$, ANOVA. Conclusiones: 1) la evaluación de PC, PH y POR confirman el estado de déficit calórico de los grupos restringidos, suplementados o no con aceites vegetales; 2) el éxito reproductivo disminuido en los grupos restringidos se puede atribuir a la baja concentración y vitalidad de las gametas sumada a un incremento en los espermatozoides inmaduros, posiblemente consecuencia de alteraciones en la espermatogénesis 3) el aporte de n3 y n6 no revertió las alteraciones inducidas por la subnutrición.

0523 (460) EFECTO PROTECTOR DE LA PROGESTERONA (P) ANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA AL LIPOPOLISACARIDO (LPS) EN LINFOCITOS MURINOS. M L Wolfson¹, C A Vercelli¹, M Cervini¹, J Aisemberg¹, S C Billi¹, A M Franchi¹

¹CEFYBO <manuwolfson@gmail.com>

Tanto la anandamida (AEA, principal endocannabinoide) como el óxido nítrico (NO) son necesarios para el éxito de la preñez. Sin embargo niveles elevados de estos, como los que se observan en la inflamación, tienen efectos nocivos sobre la preñez. La enzima que degrada la AEA (amidohidrolasa de ácidos grasos, FAAH) regula los niveles de AEA. Mujeres con antecedentes de abortos tempranos poseen una expresión y actividad reducida de la FAAH en linfocitos de sangre periférica. El LPS induce la síntesis de AEA en macrófagos murinos y también inhibe la actividad de la FAAH linfocitaria. La P, hormona esencial para el desarrollo de la preñez, eleva la actividad de la FAAH en linfocitos humanos aumentando la expresión del gen a nivel transcripcional y traduccional. En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo de reabsorción embrionaria murino inducido por LPS, mediado por el NO. El objetivo de este trabajo es determinar si la P modula la producción de NO inducida por LPS, la actividad y la expresión proteica de la FAAH en linfocitos periféricos murinos. Para ello, ratones hembra BALB/c fueron inyectados con a) vehículo, b) P, c) LPS o d) P+LPS. Se aislaron los linfocitos 6 h después de la administración del LPS. Se determinó la actividad de la FAAH por radiokonversión y su expresión proteica por western blot. Nuestros Resultados muestran que el tratamiento con LPS, disminuyen tanto la actividad ($p < 0,001$) como la expresión de la FAAH ($p < 0,05$); y que la P coadministrada con el LPS revierte los efectos de la endotoxina ($p < 0,05$ en ambos casos). Los linfocitos provenientes de animales de los grupos anteriores fueron incubados por 24 h a 37°C para luego determinar la producción de nitratos y nitritos por la técnica de Griess. Observamos que la P también es capaz de revertir el aumento de la producción de NO debido al LPS. Estos Resultados sugieren que la P podría tener un efecto protector sobre procesos inflamatorios mediados por el NO y la AEA en linfocitos murinos.

0524 (474) EL COMPLEJO NSF/aSNAP ESTÁ PRESENTE EN OVOCITO DE RATÓN Y PARTICIPA EN LA EXOCITOSIS DE GRÁNULOS CORTICALES. O D Bello¹, M Carabaja¹, N Zanetti¹, L Mayorga¹, M Michaut¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo <odbello@fcm.uncu.edu.ar>

La exocitosis de gránulos corticales (GC) en el ovocito es uno de los primeros signos de la activación embrionaria. Luego de la penetración del espermatozoide o la activación partenogenética del ovocito, los GC se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido al espacio perivitelino durante la reacción cortical, evento fundamental para prevenir la polispermia. El mecanismo molecular de la exocitosis de GC aún no ha sido dilucidado y sólo se conocen cuatro proteínas asociadas a este proceso: SNAP-25, Sintaxina 4, Rabfilina 3 y Rab3A. Tanto SNAP-25 como Sintaxina 4, pertenecen a la superfamilia de las SNAREs asociadas a la fusión de membranas en células endocrinas y neuronales. NSF y aSNAP son proteínas que forman un complejo que interaccionan con las SNAREs regulando su actividad.

Nuestro objetivo fue determinar la presencia y localización de las proteínas NSF y áSNAP en ovocitos de ratón y analizar su rol en la exocitosis de GC por Western blot, microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión. Los Resultados mostraron que tanto NSF como áSNAP están presentes en ovocitos y se distribuyen principalmente en la región cortical de la célula sugiriendo su participación en la reacción cortical. Para evaluar la participación de NSF en la exocitosis de GC en ovocitos activados partenogenéticamente se utilizó N-etilmaleimida, reactivo alquilante capaz de inhibir la función de NSF, y se cuantificaron los GC. Por microscopía confocal y microscopía electrónica se observó que N-etilmaleimida bloquea la exocitosis de GC en ovocitos partenogenéticamente activados. Estos Resultados muestran que NSF y áSNAP están presentes en ovocitos de ratón y se localizan en la región cortical donde también se hallan los GC. Además NSF muestra un rol activo en la reacción cortical sugiriendo la participación del complejo NSF/áSNAP en la exocitosis de gránulos corticales.

0525 (539) ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA REGIÓN 5' UTR DEL GEN FMR-1 EN PACIENTES CON FALLA OVÁRICA PREMATURA. V A Chiauzzi¹, L Alba², S Belli³, M E Escobar⁴, E H Charreau¹, L Dain^{1,2}

¹IBYME; ²CENAGEM; ³Hospital Durand; ⁴CEDIE <chiauzzi@dna.uba.ar>

La falla ovárica prematura (FOP) es un síndrome de patogénesis multicausal que se caracteriza por amenorrea primaria o secundaria antes de los 40 años, hipoestrogenismo e hipergonadotropismo. Se ha descrito asociación entre el estado de premutación (amplificación de tripletes CGG entre 50/55 y 200 repeticiones) en el gen FMR-1 (causal del síndrome de Fragilidad del X, SFX) y FOP. Del 10 al 20% de mujeres portadoras del SFX premutadas, desarrollan FOP. Por otro lado, aproximadamente 2-4% de mujeres con FOP son portadoras de la premutación en el gen. El objetivo del trabajo fue estudiar la región 5'UTR del gen FMR-1 en pacientes FOP de nuestra población. La región de interés fue amplificada por PCR a partir de muestras de ADN de 84 pacientes con FOP y 87 mujeres controles. Los productos fueron analizados en geles de agarosa Metaphor que permite la resolución de fragmentos que difieren entre sí en 6 pb. Los alelos de los pacientes y controles fueron agrupados en 7 categorías de acuerdo al número de tripletes obtenidos: 1) =20; 2) 21-24; 3) 25-30; 4) 31-34; 5) 35-40; 6) 41-50; 7) >50. Los Resultados obtenidos fueron: alelos pacientes (%): 11.9; 20.2; 36.9; 17.3; 7.1; 5.4; 1.2 para los grupos 1 a 7, respectivamente; controles (%): 8.1; 16.6; 37.3; 18.4; 14.4; 5.2; 0 para los grupos 1 a 7, respectivamente. Si bien no existe diferencia estadísticamente significativa en la distribución de las diferentes categorías alélicas (Test de Chi²; p= 0.23), la presencia de alelos de >50 tripletes sólo en el grupo de pacientes (2/84) está en concordancia con lo comunicado para otras poblaciones acerca de la existencia de una asociación entre la premutación del gen FMR-1 y el desarrollo de FOP. Asimismo, los Resultados obtenidos refuerzan la importancia de la genotipificación del gen en las pacientes FOP a los efectos de poder estimar el riesgo de su descendencia para el Síndrome de Fragilidad del X.

0526 (617) MODULACION DIFERENCIAL DE TIROSINA HIDROXILASA (TH) Y RECEPTORES HIPOTALAMICOS EN RESPUESTA A PROSTAGLANDINA F2a EN LA PREÑEZ TARDIA, EN RATAS CON LACTANCIA NORMAL Y DEFICIENTE. M M Bonafede¹, S R Valdez¹, N B Carreño¹, M Soaje¹, G A Jahn¹

¹Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-CONICET. <mbonafede@mendoza-conicet.gov.ar>

Las ratas OFA hr/hr, derivadas de Sprague Dawley (SD) tienen deficiencia en la lactancia, con bloqueo en la eyeción lác-

tea y secreción de PRL. Esta falla está asociada a actividad dopaminérgica (DA) y expresión de tirosina hidroxilasa (TH) muy altas al final de la preñez y en la lactancia y elevada sensibilidad al estrés, que contribuyen al bloqueo de la eyeción láctea. Nos proponemos estudiar el efecto de la caída de P4, inducida por el agente luteolítico PGF2 α , al final de la preñez sobre PRL sérica y la expresión en hipotálamo medio basal (HMB) de TH y receptores de PRL largo (RPRL_L), estrógenos (RE α y β), progesterona (RP), opioides (RO μ y κ) en las cepas OFA y SD y correlacionar los Resultados con lo observado previamente en ratas Wistar (Wi). Se usaron ratas en día 19 de preñez, inyectadas con PGF2 α (Estrumate, 25 μ g/kg i.p a las 8 y 12 hs) o vehículo sacrificadas 24 h después. Se midió PRL y P4 por RIA y la expresión relativa a β -actina de los receptores en HMB por RT-PCR semicuantitativa. Las ratas OFA controles tuvieron mayor expresión de TH (OFA: 0,74 \pm 0,04; SD: 0,46 \pm 0,06), RE α (OFA: 1,60 \pm 0,11; SD: 0,37 \pm 0,04), RPRL_L (OFA: 1,49 \pm 0,06; SD: 1,058 \pm 0,074) RP (OFA: 1,28 \pm 0,05; SD: 0,50 \pm 0,03), RO μ (OFA: 0,84 \pm 0,11; SD: 0,33 \pm 0,05) y ϵ (OFA: 0,69 \pm 0,10; SD: 0,44 \pm 0,06) comparadas con las SD. En las SD PGF2 α aumentó el RE α (Co: 0,37 \pm 0,04; PGF:0,58 \pm 0,06) y RO ϵ (Co:0,44 \pm 0,06; PGF:0,66 \pm 0,04) y disminuyó el RE β (Co:0,40 \pm 0,03; PGF:0,62 \pm 0,05). En las OFA, el R-PRL_L (Co:1,49 \pm 0,06; PGF:1,72 \pm 0,06), RE β (Co:0,50 \pm 0,06; PGF:0,75 \pm 0,08) y RO κ (Co:0,69 \pm 0,10; PGF:1,22 \pm 0,07) aumentaron. El efecto de PGF2 α sobre la expresión del RO κ fue mucho mayor en OFA que en SD. La expresión aumentada de RE α en ratas OFA causaría el aumento en RP y RPRL_L. El RPRL_L alto podría a su vez, causar la alta actividad DA y TH, al sensibilizar el sistema a PRL. A diferencia de lo observado en las ratas Wi y SD, en las OFA PGF2 α no indujo cambios en RE α , quizás porque ya están altos en las ratas controles

0527 (338) FUNCIÓN GONADAL EN RATAS CON INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA POR DIETA RICA EN FRUCTOSA. L I Marques¹, A Raschia², M O Suescun^{1,3}

¹IMBICE (CONICET-CICPBA); ²CENEXA (UNLP-CONICET); ³Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas (UNLP) <marqueslore@yahoo.com.ar>

Introducción: En los últimos años, se ha incrementado la evidencia de una interacción entre el Síndrome metabólico (SM) y la función testicular. Aunque los mecanismos fisiopatológicos exactos no son claros; Leptina (Lep) y Ghrelina (Ghr) parecen cumplir un papel crucial en dicha interacción. **Objetivo:** Estudiar el efecto de uno de los principales componentes del SM, la insulinoresistencia, sobre la esteroidogénesis y la acción de Lep y Ghr como posibles nexos entre el SM y la disfunción testicular. **Metodología:** Se utilizaron ratas Wistar macho adultas normales alimentadas durante 3 semanas con dieta comercial estándar y agua sin (C) o con fructosa al 10% (DRF). La DRF provee un buen modelo experimental de insulinoresistencia (IR). Al momento del sacrificio se evaluó la producción in vitro de T basal y estimulada por hCG incubando durante 3 horas células de Leydig (CL) aisladas de testículos de ambos grupos experimentales. Igualmente se estudió el efecto de diferentes dosis de hCG (curva dosis-respuesta) y en presencia de Ghr (1nM) y Lep (10⁻⁸M) sobre la liberación de T al medio de incubación. También se evaluó la expresión del ARNm del receptor de Ghr (GHS-R) en alícuotas de testículo, técnica de RT-PCR en tiempo real. **Resultados:** Se observó una disminución significativa de la respuesta esteroidogénica post hCG en el grupo DRF con respecto al C a todas las dosis estudiadas (p<0,05). Asimismo disminuyó la respuesta esteroidogénica post-hCG en presencia de Ghr y Lep, pero esta diferencia sólo fue significativa (p<0,05) en el caso de Ghr. La expresión del ARNm del receptor de Ghr (GHS-R) aumentó significativamente (p<0,05) en los animales DRF con respecto a los C. **Conclusión:** En estados de IR disminuye la actividad esteroidogénica in vitro, se altera la respuesta esteroidogénica en presencia de Ghr y la expresión de GHS-R en testículo sugiriendo, al menos en este modelo, un potencial papel modulador local de dicha hormona.

0528 (466) PARTICIPACIÓN DEL ZINC EN LA ASOCIACIÓN DE LA PROTEÍNA CRISP1 AL ESPERMATOZOIDE DURANTE LA MADURACIÓN. J A Maldera ¹, G Vasen ¹, D J Cohen ¹, P S Cuasnicú ¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) <maldera@dna.uba.ar>

La proteína CRISP1 (Proteínas Secretorias Ricas en Cisteínas), se sintetiza en el epidídimo y se une a los espermatozoides mientras los mismos maduran durante su tránsito por este órgano. Resultados de nuestro grupo indican la existencia de dos poblaciones de CRISP1 sobre la gameta madura: una débilmente unida, removible por fuerza iónica, que se pierde durante la capacitación, y otra que permanece fuertemente unida y participa en fertilización. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos involucrados en la interacción entre CRISP1 y el espermatozoide. Teniendo en cuenta la alta concentración de Zn²⁺ en el fluido epididimario, y su capacidad de unirse a grupos sulfhidrilos, investigamos la participación de este catión en la asociación de CRISP1 al espermatozoide durante la maduración. Para ello, espermatozoides inmaduros obtenidos de la cabeza del epidídimo de rata, fueron incubados *in vitro* con fluido del cauda epididimario en presencia de Zn²⁺, analizándose la asociación de CRISP1 a las células mediante la preparación de extractos proteicos y el empleo de anti-CRISP1 en ensayos de Western blot. Los Resultados mostraron que CRISP1 fue detectada en extractos de espermatozoides incubados con Zn²⁺ pero no así con Mg²⁺ o con Zn²⁺ junto al agente quelante EDTA. La asociación de CRISP1 en presencia de Zn²⁺ también se evidenció al emplear CRISP1 purificada. Asimismo, la proteína asociada fue posteriormente removida tanto por tratamiento con EDTA como por fuerza iónica (NaCl 0.6 y 2M). Finalmente, y como otra aproximación al tema, se realizaron estudios en espermatozoides maduros del cauda epididimario, observándose que mientras el tratamiento con EDTA logra remover parte de CRISP1 de las gametas, la presencia de Zn²⁺ durante la capacitación inhibe la liberación de CRISP1 durante este evento. En conjunto, estos Resultados apoyan la participación del Zn²⁺ en la asociación de CRISP1 al espermatozoide que ocurre durante la maduración epididimaria.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES O1

0529 (50) LA INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE DE CL- A TRAVÉS DEL CANAL CFTR MODULA LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL. A G Valdivieso ^{1,2,3}, G L Taminelli ^{2,3}, M C Marin ^{1,2,3}, E S Pagano ^{2,3,4}, M L Teiber ^{2,3}, T A Santa Coloma ^{1,2,3,4}

¹Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA; ²Fundación Instituto Leloir; ³Programa de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina UCA; ⁴Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-CONICET. <agvaldivieso@gmail.com>

La Fibrosis Quística (FQ) es producida por mutaciones en el canal de Cl⁻ CFTR. En estudios previos hemos demostrado una regulación negativa del gen mitocondrial *MTND4* en FQ (BBRC 356:805, 2007). Este gen codifica la subunidad ND4 del Complejo I mitocondrial (CIm), que es fundamental para su actividad; por lo tanto, la reducción de su expresión en FQ podría inducir una falla en la actividad del CIm. Para comprobar esta hipótesis, se determinó la actividad del CIm mediante Blue Native-PAGE a partir de mitocondrias aisladas de células derivadas de pacientes con FQ (CFDE e IB3-1) y de las mismas células con la expresión del CFTR corregida mediante la expresión ectópica de CFTR salvaje (células CFDE/6RepCFTR y S9). Se observó una disminución en la actividad del CIm de ~ 45% en las células FQ con respecto a las células corregidas. Para independizarnos de la posible diferencia de genotipo entre las distintas células FQ utilizadas y de

los efectos de la sobreexpresión del CFTR en las células corregidas, decidimos utilizar células T84, de carcinoma de colon, que expresan CFTR normal. Para modular la actividad del CFTR usamos dos inhibidores farmacológicos del transporte de Cl⁻ por CFTR (glibenclámda y CFTR(inh)172); también usamos plásmidos de RNA de interferencia (RNAi) con el fin de reducir la expresión del CFTR. Se observó así una disminución significativa de la actividad del CIm (~ 45%), tanto en células tratadas con inhibidores farmacológicos como en células transfectadas con RNAi. Estos Resultados sugieren que existe una falla mitocondrial en FQ, localizada en el CIm. Asimismo, que sería la actividad de transporte de Cl⁻ a través del CFTR, no su presencia en la membrana, la que modularía la actividad del CIm. La reducción en la actividad del CIm podría inducir un aumento en especies reactivas de oxígeno (ROS) y en la apoptosis, efectos ya observados en FQ. Agradecimientos: subsidios UBA (X-156), ANPCyT (PICT 13907), becas del CONICET (MCM, ESP y AGV) y UCA (GLT).

0530 (256) RESUME AUMENTA LA ESTABILIDAD DE HIF-1ALFA. J A Gerez ¹, J P Druker ¹, M R Haedo ¹, M Fuertes ¹, S Silberstein ¹, E Arzt ¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Depto FBMC, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET <juangerez@fbmc.fcen.uba.ar>

RSUME, una proteína cuyo gen fue clonado en nuestro laboratorio, estimula la Sumoilación, cumpliendo de esta manera un rol antagónico con la Ubiquitinación de proteínas específicas. La expresión de HIF-1alfa, subunidad principal del factor de transcripción mas importante en la respuesta adaptativa a hipoxia HIF-1, esta finamente regulada ya que en normoxia es reconocido por la enzima E3 Ubiquitin ligasa VHL, la cual cataliza su ubiquitinación conduciendo a su degradación por el proteosoma. En hipoxia este reconocimiento no ocurre, HIF-1alfa se estabiliza y HIF-1 aumenta su actividad transcripcional. En este trabajo estudiamos la función de RSUME sobre la expresión de HIF-1alfa y su consecuencia fisiológica. Demostramos por RT-PCR en células COS7 que RSUME es inducido 2.5 veces tras 16hs de hipoxia y 2 veces si se sobreexpresa HIF-1alfa. Estos Resultados fueron reconfirmados empleando genes reporteros con la zona promotora del gen de RSUME (p<0.05). La delección de los sitios HRE en estas construcciones suprimen tanto los efectos de hipoxia como de HIF-1alfa, sugiriendo que estos efectos estan mediados por HIF-1. RSUME aumenta la estabilidad proteica de HIF-1alfa tanto en hipoxia como en normoxia, sin modificar sus niveles de ARN mensajero, y este aumento ocurre incluso al sobreexpresar VHL. RSUME aumenta la actividad transcripcional de HIF-1 un 200% (p<0.05). Al emplear siRNAs específicos para RSUME tanto el aumento de HIF-1alfa inducido por hipoxia como la actividad transcripcional de HIF-1 disminuyen 53% y 59% respectivamente. Empleando células Att20 como modelo corticotrofinoma murino, la sobreexpresión de HIF-1alfa conduce a un aumento en la actividad transcripcional sobre la construcción reportera POMC-LUC, indicando que RSUME también tiene efectos estimulatorios en este sistema fisiológico. Concluimos que RSUME es inducido en hipoxia para aumentar la estabilidad de HIF-1alfa, cumpliendo de esta manera un rol muy importante en la respuesta adaptativa a hipoxia

0531 (268) SEÑALES DE TRANSDUCCIÓN INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE GLUCOSA POR DEPRIVACIÓN DE GLUCOSA EN LA CÉLULA DE SERTOLI (CS). M F Riera ¹, M N Galardo ¹, E H Pellizzari ¹, S B Meroni ¹, S B Cigorraga ¹

¹Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET) <fernandarieta@hotmail.com>

Previamente demostramos que la privación de glucosa (G) incrementa la capacidad de transporte de G a través de un aumento en la expresión del ARNm del transportador de G tipo 1 (GLUT1) en la CS. Se desconoce qué señales de transducción

son activadas en respuesta a la disminución del aporte de G a CS. Se ha observado que diferentes vías de transducción de señales son capaces de regular la entrada de G a la célula. Entre ellas cabe mencionar: la kinasa activada por AMP (AMPK), la vía de p38MAPK y la vía de fosfatilinositol 3 kinasa/proteína kinasa B (PI3K/PKB). El objetivo de este trabajo fue determinar si dichas vías de transducción son activadas en respuesta a la privación de G y si las mismas participan en la regulación del transporte de G en CS. Se utilizaron cultivos de CS de ratas de 20 días de edad cultivados en presencia de G 8mM o G 0mM. En el análisis por Western Blot de los niveles de fosforilación de acetil-Coa carboxilasa (como marcador de la activación de AMPK), de p38MAPK y de PKB se observó un aumento de los mismos luego de 30 minutos de privación de G. Por otro lado, se observó que el estímulo en la incorporación de G inducido por privación de G en el cultivo se inhibe en presencia del inhibidor de AMPK (Compound C, 20iM, CC) y del inhibidor de p38MAPK (SB203580, 10iM, SB) pero no del inhibidor de PI3K (wortmanina, 0.1 iM, W); (G 8mM:570±68a; G 0mM:1228±45b; G 0mM+CC: 724±28c; G 0mM+SB: 960±29d; G 0mM+W: 1239±65b; dpm/igADN; X±DS, n=3; distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas, p<0.05). Asimismo observamos que el estímulo en los niveles de ARNm de GLUT1 inducido por privación de G disminuye en presencia de CC o SB. Estos Resultados indican que en respuesta a la privación de G en CS se activan vías dependientes de AMPK, p38MAPK y PI3K/PKB y que el aumento en la capacidad de transporte de G está mediado por vías AMPK y p38MAPK dependientes.

0532 (359) ROL DEL COMPLEJO NUCLEAR COMPUESTO POR EL RECEPTOR TIROSINA QUINASA ERBB2 Y LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA. W Béguelin¹, C J Proietti¹, C Rosembli¹, M A Rivas¹, V Sundblad¹, M C Díaz Flaqué¹, M Tkach¹, E H Charreau¹, R Schillaci¹, P V Elizalde¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental <beguelin@dna.uba.ar>

Previamente demostramos que la heregulina (HRG) induce la localización nuclear de ErbB2 y su asociación con Stat3 en la línea celular de cáncer de mama humana T47D y en células C4HD, provenientes de un tumor mamario murino. También mostramos, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), que HRG induce el reclutamiento de Stat3 y ErbB2 a los sitios de unión de Stat3 en el promotor de ciclina D1, cuya expresión es regulada por HRG. Proponemos entonces que ErbB2, actuando como coactivador de Stat3, modula la proliferación de células de cáncer de mama. En este trabajo demostramos, mediante ensayos de ChIP secuencial, que Stat3 y ErbB2 se encuentran simultáneamente unidos al promotor de ciclina D1. Mostramos también que la inhibición de la localización nuclear de ErbB2 no afecta el transporte de Stat3. Para esto, silenciemos la expresión de ErbB2 de células C4HD y transfectamos con una mutante de ErbB2 humano que no puede translocar al núcleo (hErbB2DNLS). Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, observamos que HRG mantuvo la capacidad de inducir la translocación nuclear de Stat3 en las células reconstituidas. Luego, evaluamos específicamente si ErbB2 actúa como coactivador transcripcional de Stat3 en la inducción de ciclina D1 por HRG. Células C4HD y T47D transfectadas con una construcción del promotor de ciclina D1-luciferasa y tratadas con HRG mostraron un aumento de la actividad transcripcional, que fue prevenido por la cotransfección con hErbB2DNLS. Por el contrario, la cotransfección con una mutante constitutivamente activa de ErbB2 y la sobreexpresión de ErbB2, incrementaron la actividad transcripcional. Por último, observamos una fuerte disminución de la proliferación mediada por HRG en células C4HD reconstituidas con hErbB2DNLS. Estos Resultados sugieren que el complejo nuclear Stat3/ErbB2 promueve la proliferación de células de cáncer de mama inducida por HRG, mediante un mecanismo en el cual ErbB2 actúa como coactivador de Stat3.

0533 (508) VIP INHIBE LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES PRO-APOPTÓTICOS INDUCIDA POR TNF-ALFA EN CÉLULAS ACINARES DE RATONES NOD POR UNA VÍA CAMP-DEPENDIENTE. M Calafat¹, L Larocca¹, V Roca¹, A Nesse², C Perez Leiros¹

¹Laboratorio de Inmunofarmacología, Depto. de Química Biológica, FCEN-UBA; ²Laboratorio de Fisiología Celular de la Eritropoyetina, Depto. de Química Biológica, FCEN-UBA <mcalafat@qb.fcen.uba.ar>

Los ratones NOD son un buen modelo para estudiar alteraciones histológicas y funcionales de las glándulas exócrinas por una respuesta autoinmune similar al síndrome de Sjögren. Se propone que un fallo funcional y/o una apoptosis inapropiada en glándulas salivales iniciaría la respuesta autoinmune. El VIP (péptido intestinal vasoactivo) es un neuropéptido prosecretorio y antiinflamatorio, ejerce su acción a través de dos receptores VPAC1 y VPAC2. VIP activa vías cAMP/PKA dependientes e independientes. En trabajos previos demostramos que TNF-alfa induce apoptosis con mayor expresión de *bax* y TP53INP1. El tratamiento con VIP inhibe la inducción de estos mediadores. Nuestro objetivo fue estudiar la acción de VIP en la apoptosis inducida por TNF en acinos aislados de glándulas submaxilares de ratones NOD, la expresión de los receptores y determinar las vías de transducción. Se emplearon hembras de 16 semanas, la apoptosis se determinó por Hoescht, Caspasa 3, expresión de *bax* y TP53INP1 (RT-PCR y Western Blot). El receptor 1 de TNF(rTNF1) y Receptor 1 y 2 de VIP (VPAC1 y VPAC2) por RT-PCR. Se determinó la activación de NFkB por microscopía confocal y la acumulación de cAMP por RIA. En condiciones basales se observó: una translocación de NFkB asociada a mayor expresión de *rtnf1* (unidades arbitrarias de área-UA X±ES BALB 52±3 NOD 106±9*; *P<0.05), expresión de VPAC1 tanto en NOD como BALB. El tratamiento con VIP (10⁻⁷) inhibió la inducción de *bax* por TNF (UA: X±ES; BASAL 51±4; TNF 107±5; VIP 50±4* *P<0.05 vs TNF). En ambos acinos el pre tratamiento con VIP induce la producción de cAMP. La preincubación de acinos con H89 (inh de PKA, 1uM) revirtió el efecto de VIP en la inducción de *bax* por TNF (UA: X±ES; VIP 50±4; VIP+H89 116±3* *P<0.05). En acinos de ratones NOD con una activación basal de NFkB y expresión basal de *rtnf1* el tratamiento con VIP inhibe la apoptosis inducida por TNFa través de la vía VPAC1/cAMP/PKA.

0534 (651) ACTIVIDAD DE UDP-GLUCOSA EN LOS NEUTRÓFILOS HUMANOS. C D Carbia¹, S Caldirola¹, G Rabossi^{2,3}, M Pichel^{2,3}, A Merelli^{2,3}, A Lazarowski^{2,3}, E Lazarowski⁴

¹Hospital de Clínicas José de San Martín; ²Dpto de Bioquímica Clínica; ³FFyB; ⁴Department of Medicine, University of North Carolina School of Medicine <claudiocarbia@ciudad.com.ar>

Los nucleótidos son potentes moléculas de señalización extracelular. Varios miembros de la denominada superfamilia de receptores purinérgicos están presentes en los polimorfonucleares humanos (PMNs), incluidos el ATP / UTP-P2Y2 receptor activado y el receptor activado de azúcares-UDP P2Y14. A diferencia de la amplia distribución en tejidos del receptor P2Y2, los transcritos del receptor P2Y14 son más abundantes en PMNs circulantes, lo que sugiere que este receptor posee importantes funciones pro-inflamatorias. **Objetivo:** En el presente estudio, se ha investigado el efecto de la UDP-glucosa en la quimiotaxis de neutrófilos. La UDP-glucosa se colocó en la parte inferior del compartimiento de una cámara de Boyden modificada y se separó el compartimiento superior de la misma por un filtro de 3 micras de tamaño de poro. La suspensión de PMNs aislados (2.5 millones de células) fue cargada en la parte superior del compartimiento, y se incubaron durante 45 min a 37 °C. Luego de la incubación los PMNs retenidos en el filtro se colorearon y cuantificaron. Se encontró que la UDP-glucosa estimuló la quimiotaxis en PMN de manera dosis dependiente: a) 0,1; b) 1, c) 10, d) 100 uM). Se uso

como control positivo fMLP y como control negativo buffer Hanks. El efecto máximo de UDP-glucosa fue equivalente a aproximadamente el 50% del efecto provocado por el péptido bacteriano fMLP. **Resultados:** Nro. de neutrófilos por campo: a) 160/140, b) 81/84, c) 39/43, d) 20/20, fMLP: 290/260, Buffer: 5/5. Se realizó un ensayo colocando la UDP-glucosa en los pocillos superiores para descartar un fenómeno de quimiotaxis. Conclusiones: La UDP-glucosa fue capaz de inducir la quimiotaxis de los neutrófilos lo que sugiere un importante rol de este nucleótido en la función de dichas células y su posible impacto clínico.

0535 (11) EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA TRANSACTIVA AL RECEPTOR TIROSINA QUINASA ERBB2. M Rivas¹, M Tkach¹, W Béguelin¹, C J Proietti¹, C Rosemblit¹, V Sundblad¹, M C Díaz Flaqué¹, E H Charreau¹, P V Elizalde¹, R Schillaci¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET <rivas@dna.uba.ar>

Previamente demostramos que el TNF α induce la proliferación del adenocarcinoma mamario murino C4HD a través de la activación de la quinasa Akt y el factor de transcripción NF- κ B. Dado que este tumor sobreexpresa ErbB2 y que el mismo cumple un papel crítico en la proliferación de las células C4HD, nosotros hipotetizamos que podrían existir interacciones entre el TNF α y ErbB2. Nuestros hallazgos muestran que el tratamiento de las células C4HD con el inhibidor de ErbB2, AG825, bloqueó la proliferación inducida por el TNF α . Resultados similares se obtuvieron utilizando la línea celular de cáncer de mama humano SKBR3, ampliamente utilizada en el estudio de la sobreexpresión de ErbB2. Además, el TNF α indujo un aumento en la fosforilación en tirosina de ErbB2 en células C4HD y SKBR3, en particular en los residuos Tyr 927/877 y Tyr 1272/1222. Luego estudiamos si la quinasa c-Src estaba involucrada en el efecto mencionado, dado que está reportado que es capaz de fosforilar a ErbB2 en el residuo Tyr 877/927. Observamos que la adición de PP2, un inhibidor de la familia de Src, inhibió completamente la fosforilación de ErbB2 en Tyr 927/877, y parcialmente la de Tyr 1172/1222. La c-Src activada por TNF α fue capaz de fosforilar *in vitro* a ErbB2 en Tyr 927. También observamos que la estimulación con TNF α indujo la asociación entre ErbB2 y ErbB3, y la unión de la subunidad p85 de PI3-K a ErbB3. El tratamiento con AG825 inhibió la activación de Akt y NF- κ B por TNF α como se evidenció mediante western blots y ensayos de gen reportero. Estos Resultados muestran por primera vez que el TNF α es una citoquina capaz de transactivar a ErbB2 a través de la activación de c-Src. Además demostramos que la activación de Akt y de NF- κ B inducida por TNF α requiere de la fosforilación de ErbB2 en células de cáncer de mama que sobreexpresan ErbB2.

TRANSDUCCION DE SEÑALES O2

0536 (275) RSUME REGULA LA CASCADA DE IKB/NFKB Y LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES.

J P Druker¹, J Gerez¹, A Carbia-Nagashima¹, S Silberstein¹, M Paez-Pereda², G Stalla², F Holsboer², E Arzt¹

¹LFBM, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET; ²Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania <jimedruker@fbmc.fcen.uba.ar>

La sumoilación es una modificación postraducciona que regula la actividad de NfKb y del receptor de glucocorticoides (GR), principales mediadores involucrados en procesos inflamatorios. En este trabajo analizamos la acción de una nueva proteína RSUME (RWD-Containing Sumoylation Enhancer) cuyo gen fue clonado recientemente en nuestro laboratorio, sobre la cascada de señalización de Ikb/NfKb y su efecto sobre la actividad del GR. RSUME aumenta la sumoilación de proteínas. La conjugación de SUMO-1 a Ikb inhibe su ubiquitinación siendo este una importante

señal antiinflamatoria. Ensayos in-vitro de inmunoprecipitación y de sumoilación fueron realizados con RSUME e Ikb recombinante y analizados por Western Blot (WB). HepG2 fueron tranfectadas con el reportero kb-luc y con los vectores de expresión de SUMO-1 y/o RSUME, estimuladas con TNF α y la actividad luciferasa fue medida en extractos celulares. Células COS-7 fueron cotranfectadas con Ikb o Ikb (K21,22R) y SUMO-1 o RSUME y analizadas por WB. RSUME aumenta la sumoilación y la estabilidad de Ikb siendo revertido este efecto cuando se tranfecta la mutante de sumoilación de Ikb (K21,22R). Observamos que RSUME interacciona en forma directa con Ikb y que la sobreexpresión de RSUME inhibe (44%, p<0.05) la actividad transcripcional inducida por TNF α . Además, siRNA específico para RSUME estimula la actividad transcripcional de NfKb (160%, p<0.05). RSUME inhibe dos genes blancos de NfKb: la actividad del promotor de IL-8 y la expresión de COX-2. Demostramos que RSUME aumenta la actividad transcripcional del GR en condiciones de estimulación por dexametasona (48%, p<0.05) así como su sumoilación. A su vez, observamos que RSUME interacciona con el GR. Dado que RSUME inhibe la cascada de señalización de NfKb, y regula la actividad del GR es posible considerar a RSUME como un blanco potencial para modular las respuestas inflamatorias, las cuales serían relevantes en la interacción de los sistemas inmune- neuroendocrinos.

0537 (152) CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEÍNA NUCLEAR DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL DENOMINADA CISD1 CUYA EXPRESIÓN ES MODULADA POR EL CANAL DE CL- CFTR. G L Taminelli^{3,4}, A G Valdivieso^{2,3,4}, M C Marín^{2,3,4}, M L Teiber^{3,4}, E S Pagano^{1,3,4}, T A Santa Coloma^{1,2,3,4},

¹Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-CONICET, ²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA, ³Fundación Instituto Leloir, ⁴Programa de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA) <gtaminelli@leloir.org.ar>

Previamente hemos caracterizado parcialmente un nuevo gen denominado CISD1, dependiente del canal de cloruro CFTR, que codifica una proteína de localización mitocondrial y función aún desconocida (BBRC 365: 856, 2008). El ARNm de CISD1 está modulado negativamente en células CFDE (provenientes de un paciente con fibrosis quística) y los niveles son restaurados en células CFDE que expresan ectópicamente CFTR wt (células CFDE/6RepCFTR). Estos Resultados fueron confirmados mediante FISH confocal, hibridación *in situ* en cortes de tejidos de pulmón, RT-PCRs semi-cuantitativos y RT-PCR en tiempo real. El tratamiento con glibenclámid (50 iM) o CFTR(inh)-172 (5 μ M) en células CFDE/6RepCFTR, produjo una reducción en los niveles del ARNm de CISD1. Mediante la expresión de una quimera CISD1-GFP en células CFDE, hemos comprobado por microscopía confocal una localización mitocondrial predominante, predicha previamente mediante el programa PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>). En células CFDE que expresan esta quimera se observaron importantes alteraciones en la estructura de las mitocondrias. Cabe destacar que ha sido imposible seleccionar y mantener en cultivo células CFDE o T84 transfectadas con dicha quimera, ya que las células en esas condiciones sobreviven muy pocos pasajes. Recientemente, otros autores han demostrado que CISD1 posee un dominio con 3 Cys y 1 His que unen un cluster 2Fe-2S (Wiley y col. PNAS 104:5318, 2007). Teniendo en cuenta los Resultados con la quimera y con el objeto de estudiar la posible función de CISD1, hemos diseñado una mutante en la cual las cisteínas 72 y 74, que intervienen en la unión al cluster 2Fe-2S, han sido reemplazadas por serinas, con la idea de crear un dominante negativo. Esta construcción fue recientemente transfectada en células T84 con el fin de estudiar mediante citometría de flujo los posibles efectos sobre diversas funciones mitocondriales. Agradecimientos: subsidios UBA (X156), ANPCyT (sub. PICT 13907) y UCA.

0538 (217) C/EBP β INTERACTÚA CON HETEROCHROMATIN PROTEIN-1 α EN HETEROCHROMATINA PERICENTROMÉRICA. L P Prendes¹, G Piwien Pilipuk¹

¹Fundación Instituto Leloir <lprendes@leloir.org.ar>

En estudios previos demostramos que al inducirse la diferenciación adipocítica de los fibroblastos 3T3-L1, C/EBP β se relocaliza en áreas de heterocromatina pericentromérica y se une a sitios consenso presentes en el ADN satelital. Además, C/EBP β colocaliza con HP1 α , factor constitutivo de heterocromatina. Resulta intrigante que un factor de transcripción como C/EBP β se localice en regiones heterocromáticas de baja actividad transcripcional junto con HP1 α , siendo los objetivos del presente estudio comprobar y caracterizar la interacción C/EBP β -HP1 α y dilucidar el rol funcional de dicha interacción. Para estudiar la interacción C/EBP β -HP1 α en el ambiente celular, utilizamos Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC), novedosa metodología basada en la complementación de los fragmentos N- y C-terminal de una proteína fluorescente como resultado de la interacción entre las proteínas a las que dichos fragmentos están fusionados, evento que determina la recuperación de fluorescencia. Demostramos que HP1 α interactúa con las dos isoformas de C/EBP β , LAP y LIP, en áreas de heterocromatina pericentromérica. Además, determinamos que la región básica de unión al ADN de LAP y LIP y que los dominios chromodomain y hinge de HP1 α serían los responsables de la interacción entre dichos factores. Empleando siRNA, observamos que en ausencia de C/EBP β no se modifica la distribución subnuclear de HP1 α . En cambio, el knock-down de HP1 α produce una disgregación de los cromocentros donde se concentra C/EBP β , disminuyendo su fracción nucleoplásmica. Este resultado sugiere que HP1 α podría regular el equilibrio entre las fracciones hetero- y eucromáticas de C/EBP β . En ensayos de gen reportero, la expresión de HP1 α disminuye la actividad transcripcional de LAP. En síntesis, LAP y LIP interactúan con HP1 α en áreas de heterocromatina y postulamos que C/EBP β podría «reclutar» a HP1 α a genes target produciendo una «heterocromatinización» local lo que facilitaría el silenciamiento de dicho gen.

0539 (361) DESARROLLO DE UN MODELO PARA ANALIZAR EL EFECTO DEL ESTRÉS MECÁNICO EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS. ESTUDIO DE EVENTOS ASOCIADOS A LA INVOLUCIÓN POST-LACTANCIA. A Quaglini¹, M Salierno², J Pellegrotti¹, O Coso³, E Kordon¹

¹Laboratorio de Glándula Mamaria y Apoptosis (LEGMA), IFIBYNE - CONICET. FCEyN - UBA; ²Depto de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.; ³Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), IFIBYNE - CONICET. FCEyN - UBA <aquaglini@fbmc.fcen.uba.ar>

Al finalizar la lactancia, en la glándula mamaria se desencadena un proceso que llevará a en su primera etapa a la apoptosis masiva del epitelio secretorio de leche. Se ha demostrado que son factores locales del tejido mamario como la citoquina LIF los responsables de iniciar este proceso. Hasta el momento, se desconoce cuáles son las señales específicas que desencadenan la liberación de estos factores, pero se hipotetiza que el estrés mecánico inducido por la acumulación de leche en los lobulillos podría ser el estímulo inicial. Con el objetivo de probar esta hipótesis diseñamos y validamos un dispositivo que nos permite analizar *in vitro* el efecto que tiene el estrés mecánico sobre células epiteliales mamarias (HC11) crecidas sobre un sustrato de sílica elástica. Primero, verificamos por microscopía óptica la transmisión del estiramiento radial aplicado (ERA) del sustrato flexible a las células. Luego, estudiamos el efecto que ejerce dicho estímulo sobre la vía de señalización de MAPK, la activación de Stat3 y la inducción de la expresión de genes involucrados en la involución mamaria. Los Resultados muestran que el estiramiento indujo un pico de activación de ERK1/2 y Stat3 entre los 5 y 15 minutos de ERA el cual desaparece a la media hora. Para Stat3, pero no para

ERK1/2, se observa un segundo pico de activación a las 6hs (Western blot). Por otro lado, ERA aumentó significativamente los niveles de ARNm de c-fos de manera dosis dependiente (RT-PCR) y los niveles de expresión y activación de la proteína correspondiente (Western blot). Asimismo un ERA del 20% produjo un aumento de la expresión del ARNm (RT-PCR) de LIF y TNFa a los 30 min de tratamiento. Estos Resultados indican que el estrés mecánico podría ser el disparador de eventos biológicos asociados a la involución mamaria ya que es capaz de inducir cascadas de señalización y genes que juegan un rol fundamental en este proceso biológico.

0540 (441) ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-1 VÍA MAPK INDUCIDA POR PROGESTAGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA MURINO LM3. MC Diaz Flaque¹, W Béguelin¹, V Sundblad¹, C Rosembli¹, C Proietti¹, M Rivas¹, M Tkach¹, E Charreau¹, R Schillaci¹, P Elizalde¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental <diazflaque@dna.uba.ar>

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que el progestágeno sintético acetato de medroxyprogesterona MPA es capaz de inducir el crecimiento de las células de cáncer de mama murino LM3 transfectadas con la isoforma B del receptor de progesterona humano (LM3-RP-B). Recientemente se demostró que el MPA activa la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular que carecen de elementos respondedores al receptor de progesterona (ERP) en sus promotores, tales como la Ciclina D1. Proponemos que esta activación se produciría por un mecanismo en el cual el factor de transcripción AP-1 (compuesto por c-Jun y c-Fos) se une a su elemento respondedor presente en el promotor de Ciclina D1 y el RP se asocia a este complejo transcripcional («tethering»). En este trabajo estudiamos la regulación de las proteínas Ciclina D1, c-Jun y c-Fos inducida por progestágenos en células LM3-PR-B. Mediante ensayos de Western Blot demostramos que el MPA induce la expresión de Ciclina D1 y de las proteínas c-Jun y c-Fos. Asimismo, el MPA induce la fosforilación de c-Jun y c-Fos. Con el objeto de evaluar la vía de señalización por la cual el MPA activa al AP-1, se preincubaron las células LM3-RP-B con U0126, inhibidor específico de la vía Erk1/2, previo a la estimulación con MPA. Erk1/2 ha sido previamente involucrada en la activación de AP-1. Observamos una disminución significativa ($p < 0,01$) en la fosforilación de c-Jun y c-Fos y en la expresión de Ciclina D1. Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal demostramos que el MPA induce la localización nuclear de c-Jun y c-Fos. En conclusión en este trabajo demostramos por primera vez que los progestágenos inducen la expresión de Ciclina D1 a través de la activación del factor de transcripción AP-1 vía MAPK.

0541 (534) REGULACIÓN POR ATP DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MAPKS Y PI3K/AKT EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS MCF-7. P G Scodelaro Bilbao¹, R Boland¹, G Santillán¹

¹Laboratorio de Química Biológica Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur <pscodela@criba.edu.ar>

El ATP extracelular regula la proliferación y apoptosis de células tumorales. Previamente, establecimos que el ATP incrementa la concentración de calcio intracelular y la fosforilación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7. También demostramos que PKC y la liberación de Ca²⁺ de depósitos intracelulares participan en la fosforilación de MAPKs por ATP. Además, el ATP estimula la fosforilación de la serina treonina quinasa Akt en forma dependiente de fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y Src. En este trabajo investigamos como se relacionan las vías de señalización PI3K/Akt y MAPKs reguladas por ATP en células MCF-7. Estudios de Western blot mostraron que la inhibición de la expresión de Src mediante la transfección de las células con

oligonucleótidos antisentido disminuye la fosforilación de Akt inducida por ATP pero no la de MAPKs. Sin embargo al igual que las MAPKs, la incubación de las células en un medio libre de Ca^{2+} (+EGTA 0,5 mM) no modificó el efecto del ATP sobre la fosforilación de Src y Akt. El uso de Ly 294002, inhibidor de PI3K, mostró que la fosforilación de ERK1/2, p38 y p46 JNK en respuesta al ATP es independiente de PI3K. En cambio, mediante la utilización del inhibidor Ro318220, PKC fue involucrada en la estimulación de la fosforilación de Akt por ATP. Mediante inmunocitoquímica se observó la translocación de Akt desde el citoplasma hacia el núcleo luego del tratamiento de las células con ATP. Por RT-PCR se evidenció la expresión de receptores purinérgicos del subtipo P2Y_2 . Estos Resultados sugieren que la estimulación de receptores P2Y_2 por ATP induce, a través de PKC, la activación de las vías de señalización MAPKs y PI3K/Akt en células MCF-7. Sin embargo, a diferencia de Akt, la regulación purinérgica de MAPKs es independiente de Src y PI3K.

0542 (563) POLARIZACIÓN NUCLEAR DE HETEROCHROMATIN PROTEIN-1GAMA, IMPORTANCIA DE DICHO EVENTO EN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR. M A Desbats¹, G Pivien Pilipuk¹

¹Fundación Instituto Leloir-IBBA <marian_des@yahoo.com.ar>

En estudios previos demostramos que durante la diferenciación adipocítica, la activación del factor transcripcional C/EBP β se acompaña con su relocalización en heterocromatina. Esta sorprendente observación fue confirmada al demostrarse su colocalización con la proteína no histónica HP-1 γ (*Heterochromatin Protein-1 γ*). Nada se sabe sobre el rol de HP-1 γ en la diferenciación, por lo que el objetivo de este trabajo fue estudiar su regulación y función. Al inicio de la adipogénesis, HP-1 γ deja los dominios heterocromáticos y se concentra en el polo del núcleo opuesto al MTOC. Este patrón *polarizado* no ha sido descripto aún para ningún factor nuclear y no se observa en células que carecen de la capacidad de diferenciarse. Tanto IBMX como insulina, componentes del cocktail de diferenciación, son fuertes inductores de la polarización de HP-1 γ . Al inducirse la adipogénesis, aumenta progresivamente el nivel de P-Ser83-HP-1 γ , siendo esta fosforilación dependiente de la activación PKA. De manera relevante, HP-1 γ colocaliza en el polo nuclear con la forma activa de RNA-pol II. Como se demostró por incorporación de BrUTP, esta región es de activa transcripción. El número de células con HP-1 γ polarizada disminuye si son tratadas con inhibidores de la RNA-pol II, lo que sugiere que la polarización de HP-1 γ es un evento dinámico dependiente de la actividad transcripcional. En síntesis, describimos por primera vez un evento de polarización nuclear exclusivo de HP-1 γ , dependiente de la activación de PKA, el cual tiene lugar sólo en células con capacidad de diferenciarse. Postulamos que en estadios tempranos de la diferenciación adipocítica la polarización de HP-1 γ serviría de plataforma para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional y, por consiguiente, participaría en el control de la expresión polarizada de genes necesarios para la diferenciación celular.

TRANSDUCCION DE SEÑALES P1

0543 (118) VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES ACTIVADAS POR UN PÉPTIDO AGONISTA DEL INTERFERÓN-ALFA2B. V C Blank¹, C Peña¹, L Roguín¹

¹IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica <vivianablank@yahoo.com.ar>

En trabajos previos caracterizamos la actividad antiproliferativa de un péptido quimérico cíclico (PQC) que simula la región del interferón- $\alpha 2b$ (IFN- $\alpha 2b$) que se une a sus receptores. Asimismo demostramos que el efecto antimitogénico desencadenado por el péptido se encuentra estrechamente relacionado con la inducción

de apoptosis. El propósito del presente trabajo fue estudiar las vías de transducción activadas por este derivado sintético y evaluar la participación de las mismas en su acción apoptótica. Para ello, luego de incubar células WISH (amnios humano) durante distintos tiempos en presencia de IFN- $\alpha 2b$ o del PQC, se determinó la fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT3. Se observó que tanto el IFN- $\alpha 2b$ como el PQC aumentaron significativamente los niveles de fosforilación de ambas proteínas, aunque se requirió más tiempo de incubación con PQC para activar STAT 1. Puesto que además de la vía Jak/STAT, el IFN- $\alpha 2b$ también activa la vía de las MAPK, examinamos los efectos del PQC sobre la p38 y p44/42 MAPK. Los Resultados obtenidos mostraron que el IFN- $\alpha 2b$ y el PQC incrementaron los niveles de fosforilación de p38 MAPK, sin modificar la fosforilación de p44/42 MAPK. Cuando las células se transfectaron en presencia de un RNAi específico para STAT3, se bloqueó ~45% la expresión de esta proteína. En estas condiciones, el efecto antimitogénico del PQC disminuyó 51 \pm 2% y el porcentaje de células hipodiploides se redujo significativamente. Los Resultados obtenidos indican que el PQC activa vías de señalización similares a las inducidas por IFN- $\alpha 2b$. El menor efecto antiproliferativo y apoptótico de PQC cuando se bloquea la expresión de STAT3 sugiere que este factor de transcripción está involucrado en la muerte celular inducida por PQC. Asimismo, entre las MAPK, comprobamos la ausencia de activación de p44/42 MAPK, una vía clásicamente relacionada con la proliferación, y la fosforilación de p38 MAPK, una quinasa que probablemente participa del efecto apoptótico.

0544 (187) EFECTOS DEL CANAL DE CLORURO CFTR SOBRE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL. M L Teiber^{1 2}, A G Valdivieso^{1 2 3}, G L Taminelli^{1 2}, M C Marin^{1 2 3}, E S Pagano^{1 2 4}, T A Santa Coloma^{1 2 3 4}

¹Fundación Instituto Leloir; ²Programa de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina UCA; ³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA; ⁴Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-CONICET. <luzteiber@hotmail.com>

El gen responsable de la fibrosis quística (FQ) es el *CFTR*, un transportador de Cl⁻. En trabajos previos hemos demostrado que la expresión de los genes *MTND4* y *CISD1* está afectada en FQ (BBRC 356:805, 2007 y BBRC 365: 856, 2008). Como *MTND4* es fundamental para la actividad del Complejo I mitocondrial, recientemente estudiamos la actividad de este complejo; la misma se reduce en un 40-50% en células FQ (ver Valdivieso y col). El objetivo de este trabajo fue determinar, por citometría de flujo, si el potencial de membrana mitocondrial y la masa mitocondrial también se encuentran bajo la modulación de la actividad del *CFTR*. Se utilizaron como modelo células T84 controles y tratadas con inhibidores del *CFTR*. Para la medición del potencial de membrana mitocondrial se utilizó la señal del dímero de JC-1 (15,3 μM , 20' de incubación, Ex: 488 nm, Em: 530/585 nm monómero/dímero) que correlaciona con el potencial mitocondrial. Para determinar la masa mitocondrial se midió la unión del colorante fluorescente NAO (10 μM , 20', Ex: 488 nm, Em: 640 nm) a cardiolipina; con NAO se utilizaron células previamente fijadas con etanol 70 %, con el fin de evitar posibles efectos inespecíficos del potencial de membrana o de un posible transporte diferencial del colorante. Se observó que el potencial de membrana mitocondrial se encontraba ligeramente afectado por la inhibición del *CFTR* durante 24 horas, con 5 μM de *CFTR*(inh)-172. Por el contrario, la masa mitocondrial se encontró ligeramente elevada, indicando un leve aumento en el número de mitocondrias como respuesta adaptativa a la inhibición del *CFTR*. Teniendo en cuenta los Resultados obtenidos, la reducción en la actividad del Complejo I, en células FQ o T84 con la actividad del *CFTR* inhibida, no puede atribuirse a una reducción en el número de mitocondrias y afectaría levemente el potencial de membrana mitocondrial. Agradecemos: subsidios UBA (X-156), ANPCyT (PICT 13907), becas del CONICET (MCM, ESP y AGV) y UCA (GLT).

0545 (293) INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CARDÍACA POR 15DPGJ2 Y ROSIGLITAZONA. EVIDENCIAS DE MECANISMOS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DE PPAR γ . E Hovsepian¹, N Goren¹

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET) <eugediego@hotmail.com>

En el transcurso de una sepsis se desencadena una disfunción multiorgánica e hipotensión que pueden conducir a importantes daños cardíacos. Por lo tanto, la reparación del tejido constituye en la actualidad un gran desafío. Se propone que el tratamiento con ligandos PPAR α puede ejercer efectos beneficiosos sobre el corazón, posiblemente relacionado con sus efectos antiinflamatorios. Por ello, 15dPGJ2 se postula como modulador de la respuesta inflamatoria a través de mecanismos dependientes e independientes de PPAR γ . El objetivo de este trabajo fue valorar la inhibición de la respuesta inflamatoria por 15dPGJ2 (15d) (2 μ M) y rosiglitazona (R) (1 μ M) y sus mecanismos de acción en cardiomiocitos de ratón CF1 en cultivo, tratados con 10 μ g/ml de lipopolisacárido (LPS) de E. coli. Mediante Western blot (Wb) determinamos que 15d pero no R, fue capaz de inhibir significativamente la expresión de óxido nítrico (NO) sintasa 2 (NOS2), ciclooxigenasa 2 (COX2) y metaloproteínasa 9 (MMP9). Esta inhibición fue impedida luego del pre-tratamiento con 1 μ M de GW9662 (GW), antagonista de PPAR γ . Por RT-PCR cuantitativa observamos que 15d inhibió la expresión de mRNA inducida por LPS (24h) de: NOS2 68%; COX2 50%; MMP9 70%; $p < 0,05$. Asimismo, GW revirtió estos efectos. Además, 15d inhibió la liberación (μ M) de NO de manera significativa hasta valores similares al control (Control: 5,02 \pm 1,97; LPS: 54,48 \pm 1,59; 15d+LPS: 7,17 \pm 1,99; $p < 0,05$). Sin embargo, el tratamiento con R inhibió parcialmente la liberación de NO (R+LPS: 15,63 \pm 1,29; $p < 0,05$). El tratamiento previo con GW revirtió de manera parcial la inhibición ejercida por 15d sobre la liberación de NO (31,31 \pm 1,63) al igual que el inhibidor de MAPK SB203580 (1 μ M) (35,12 \pm 6,95) en cambio con MG132 (1 μ M) inhibidor de NF κ B, (16,10 \pm 1,82) la inhibición fue mayor ($p < 0,05$). Estos Resultados nos llevan a concluir que los efectos antiinflamatorios de 15d en cardiomiocitos representarían la suma de mecanismos independientes y dependientes de PPAR γ .

0546 (413) ACCIONES NO GENÓMICAS DEL ESTRADIOL Y EL 4-OH-TAMOXIFENO SOBRE LA LÍNEA DE CÁNCER DE MAMA MURINO ESTRÓGENO DEPENDIENTE LM05-E. D Raffo¹, O Pontiggia¹, E Bal de Kier Joffé¹, M Simian¹

¹Area Investigaciones Instituto Oncológico Angel H. Roffo <diegoraffo@hotmail.com>

Demostremos previamente que el tratamiento prolongado de la línea celular LM05-E, derivada del tumor de mama murino estrógeno dependiente M05, con estradiol (E) 10⁻⁸M o con 4-OH-Tamoxifeno (Tam) 10⁻⁶M inducen proliferación y muerte celular respectivamente. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las acciones rápidas tanto del E como del Tam como indicadores de la presencia de receptores de estrógeno de membrana en la línea LM05-E. Para ello se sembraron 30.000 células en placas de 12 wells. Una vez adheridas, se las lavó 3 veces con PBS y se las incubó durante 48 horas con medio DMEM/F12 sin rojo fenol. En estas condiciones se trataron por tiempos de entre 15 y 60' con E 10⁻⁸M, Tam 10⁻⁶M o con el vehículo correspondiente tras lo cual fueron lavadas 6 veces con PBS e incubadas en medio DMEM/F12 sin rojo fenol. A las 48-72 horas post tratamiento las células fueron tripsinizadas y contadas. En todos los casos los experimentos se realizaron por triplicado. El tratamiento con E durante 1 hora indujo un aumento significativo del número celular, mientras que el Tam lo inhibió ($P=0,01$, $n=3$). Por otra parte encontramos que el efecto citotóxico del Tam fue significativo con solo 15' de tratamiento ($P=0,001$, $n=3$) y contrarrestado en forma parcial pero significativa por la incubación simultánea con E ($P=0,05$, $n=2$). Demostremos previamente que el E induce la fosforilación de ERK1/2 a los 5' de tratamiento, y que la misma cae a los 60'. Investigamos si el Tam afectaba esta vía de señal-

ización por la técnica de western blot y encontramos que efectivamente tiene efecto, llevando a una activación de ERK1/2 que supera las 6 horas ($n=3$). Nuestros Resultados sugieren que las células LM05-E responden a las acciones no genómicas del estradiol y de su antagonista el Tam y se presentan como un modelo adecuado para el estudio del papel de estos mecanismos tanto en la respuesta a los estrógeno como al tratamiento endócrino y el desarrollo de resistencia hormonal.

0547 (471) LA REGULACIÓN CRUZADA ENTRE LOS MECANISMOS DE CHEQUEO Y LOS DE REPARACIÓN DEL ADN DESPUÉS DE IRRADIACIÓN UV. J Speroni¹, G Soria¹, L Belluscio¹, V Gottifredi¹

¹Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica, Fundación Instituto Leloir <jsperoni@leloir.org.ar>

Los mecanismos de chequeo son redes de transducción de señales que se activan en respuesta a rupturas de ADN a doble cadena y acumulación de ADN simple cadena. La irradiación UV genera aductos entre bases adyacentes lo que promueve la acumulación de ADN simple cadena activando la vía de chequeo que involucra a las quinasas ATR y CHK1. Esto genera un escenario adecuado para la actividad de la Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) y la Síntesis por Translesión (TLS). Este último mecanismo no representa un proceso de reparación per se sino que evita el bloqueo de la replicación en la lesión, promoviendo la sobrevida celular. El objetivo de este trabajo es evaluar si el correcto funcionamiento de los mecanismos de chequeo es necesario para una eficiente activación de NER y TLS después de irradiación UV. Para esto se utilizó como estrategia experimental la modulación negativa transitoria de diversas proteínas de chequeo (ATR, RPA, Rad17, CHK1, Claspin) mediante siRNAs y expresión de mutantes enzimáticamente inactivos. Para evaluar el efecto de la inhibición de los mecanismos chequeo sobre NER se examinó el reclutamiento de factores específicos involucrados en dichos mecanismos de reparación a las zonas de ADN lesionado. Con respecto a la activación de TLS se monitoreó los niveles de ubiquitinación de PCNA, modificación post-traduccional relevante para TLS y el reclutamiento de la polimerasa de TLS, Pol ζ , a sitios de daño. En conjunto, nuestros datos sugieren que el correcto funcionamiento de los mecanismos de chequeo sería necesario para la eficiente activación de TLS, mientras que no estaría involucrado en la remoción de lesiones por NER.

0548 (493) ESTUDIO DE LA LOCALIZACIÓN SUBNUCLEAR DE LOS DISTINTOS DÍMEROS DE C/EBP β MEDIANTE BIMOLECULAR FLUORESCENCIA COMPLEMENTATION. L P Prendes¹, G Piwien Pilipuk¹

¹Fundación Instituto Leloir <lprendes@leloir.org.ar>

Los C/EBPs son factores de transcripción de tipo bZIP que regulan procesos de diferenciación celular, entre ellos la adipogénesis. C/EBP α posee distintas isoformas denominadas LAP y LIP, las que pueden formar homo- y heterodímeros. Como nada se sabe sobre la regulación de la dimerización, ni la distribución subnuclear de los mismos, éste fue el objetivo de nuestro trabajo. La técnica convencional de inmunofluorescencia indirecta no permite identificar los distintos dímeros de C/EBP α en el ambiente celular por lo que utilizamos Bimolecular Fluorescent Complementation (BiFC), novedosa técnica basada en la complementación de los fragmentos N- y C-terminal de una proteína fluorescente como resultado de la interacción entre las proteínas a las que dichos fragmentos están fusionados, evento que determina la recuperación de fluorescencia. Pudimos demostrar en preadipocitos 3T3-L1, que los homodímeros de LIP se localizan exclusivamente en áreas heterocromáticas. En cambio, los homodímeros de LAP al igual que los heterodímeros LAP/LIP se ubican tanto en heterocromatina como en áreas eucromáticas. Además, los homodímeros bZIP (poseen sólo la región básica de unión al ADN (b) y el cierre de leucina (ZIP)), se localizan exclusivamente en áreas heterocromática. Así como también, observamos por IFI que LIP al que se le delecionó sólo el ZIP localiza

en heterocromatina. Estos Resultados sugieren que el dominio N-terminal de transactivación presente sólo en LAP regula la localización eucromática de los dímeros LAP-LAP y LAP-LIP y que no es necesario ni el dominio N-terminal ni el de dimerización (ZIP) para la localización de LIP-LIP en regiones heterocromáticas. En síntesis, demostramos por primera vez que los distintos dímeros de C/EBP α exhiben una distribución nuclear diferencial, posiblemente constituyendo así un importante mecanismo para regular la expresión de genes blanco al existir una disponibilidad diferencial de homo- y heterodímeros en distintos dominios nucleares.

0549 (522) LA ACTIVIDAD DE TRANSPORTE DEL CANAL DE CL- CFTR, AFECTADO EN FIBROSIS QUÍSTICA, MODULA LA ACTIVIDAD DE LA TIROSINA QUINASA C-SRC. M C Marin^{1 2 3}, A G Valdivieso^{1 2 3}, G L Taminelli^{1 2}, M L Teiber^{1 2}, E S Pagano^{1 2 4}, T A Santa Coloma^{1 2 3 4}

¹Fundación Instituto Leloir; ²Programa de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina UCA; ³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA; ⁴Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-CONICET.<celestemarin@hotmail.com>

Estudiando la expresión diferencial de genes en fibrosis quística (FQ), previamente encontramos que la expresión y actividad de c-Src estaba aumentada en células FQ, en condiciones basales (JBiolChem 277:17239, 2002). Otros autores han encontrado que la estimulación de la actividad de c-Src, en condiciones no basales, se encuentra afectada en células FQ (JBiolChem, 278:8326, 2003). Nuestros objetivos son: determinar si los Resultados previos obtenidos mediante la medición directa de la actividad de c-Src correlacionan con los que se pueden obtener con anticuerpos anti-phospho-tirosina específicos de c-Src, comprobar si los mismos Resultados pueden obtenerse en otros modelos celulares y determinar el posible mecanismo de transducción de señales CFTR?c-Src. Se emplearon tres modelos de células FQ: 1) Células CFDE y CFDE/6RepCFTR, su versión corregida mediante la expresión ectópica de CFTR normal, 2) Células IB3-1 e IB3-1 corregidas mediante un vector viral (células S9) y 3) Células T84 que expresan CFTR wt y T84 tratadas con el inhibidor CFTR(inh)-172 (5 μ M). Mediante WB se observó en los tres modelos que la actividad de c-Src es mayor en las células FQ o con el CFTR inhibido. Se observó también, que al tratar células T84 con un cóctel estimulador de la actividad del CFTR (AMPc 200iM, IBMX 200iM e isoproterenol 20iM), la actividad de c-Src fue menor que en las mismas células sin tratamiento. Cuando el CFTR fue estimulado y al mismo tiempo inhibido, en T84 y CFDE/6Rep, la actividad de c-Src fue similar a la observada en las mismas células controles. Se están estudiando los posibles mecanismos involucrados en la señalización. El aumento de la actividad de la tirosina quinasa c-Src en células FQ podría explicar, en parte, el mecanismo involucrado en la mayor proliferación celular observada por otros autores en cortes de tejido epitelial respiratorio humano FQ. Agradecimientos: subsidios UBA (X-156), ANPCyT (PICT 13907), becas del CONICET (MCM, ESP y AGV) y UCA (GLT).

0550 (530) REGULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-KB POR INMUNOFILINAS DE ALTO PESO MOLECULAR. A G Erlejman¹, G I Mazaira¹, M Monte¹, M D Galigniana^{1 2}

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; ²Laboratorio de Receptores Nucleares, Fundación Instituto Leloir. <erlejman@qb.fcen.uba.ar>

La activación de NF-kB (RelA/p50) depende de la fosforilación del inhibidor I κ B por IKK, cuya actividad es regulada por hsp90. Previamente demostramos que las inmunofilinas (IMMs) FKBP51

y FKBP52 asociadas a hsp90 regulan el retrotransporte y la actividad transcripcional de receptores esteroidales y p53. El objeto de este trabajo fue elucidar si las IMMs regulan la activación de NF-kB. En células estimuladas con PMA, FKBP51 inhibió la respuesta transcripcional de NF-kB, resultado que no varió al usar una mutante de FKBP51 en el dominio TPR responsable de su unión a hsp90. Esto sugiere que la modulación de NF- κ B depende de la IMM misma sin necesidad de que ésta forme complejos con hsp90. No obstante, en células tratadas con el inhibidor de hsp90 radicicol, no se detectó activación de NF- κ B, indicando que hsp90 sí modula a NF-kB, pero en un paso diferente al de FKBP51. Como RelA co-inmunoprecipitó con FKBP51, hipotetizamos que la actividad de peptidil-prolil isomerasa de la IMM podría afectar la conformación de RelA, por lo que repetimos el ensayo en células incubadas con el inhibidor FK506. El efecto de FKBP51 no se modificó, por lo que concluimos que la conformación de RelA no se vería afectada significativamente por su asociación con la IMM. El efecto inhibitorio de FKBP51 sobre NF-kB es específico ya que su homóloga FKBP52 no tuvo efecto alguno. La translocación nuclear de RelA inducida por PMA fue máxima a los 30 min para luego reciclar al citoplasma a los 60 min. La cotransfección de FKBP51 retrasó la cinética de importación. En resumen, aquí demostramos que: a) FKBP51 inhibe la activación de NF-kB; b) a diferencia de lo ya demostrado para receptores esteroidales, la IMM no requiere formar complejos con hsp90, c) su actividad de peptidil-prolil isomerasa no es esencial, d) hsp90 está involucrada en la regulación de la cascada a otro nivel. Especulamos que el efecto de FKBP51 puede ser sobre IKK, la translocación nuclear de RelA y/o el sitio promotor.

0551 (621) LA ANGIOTENSINA II (AII) INDUCE LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN LA GLÁNDULA MAMARIA MURINA IN VIVO.

N B Fernández¹, K Nahmod², J Geffner², E Kordon¹, C Schere Levy¹

¹LEGMA IFIBYNE CONICET; ²Laboratorio de Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina <na24n@yahoo.com.ar>

El sistema angiotensinérgico (RAS) opera como un sistema endócrino y como un sistema tisular parácrino/autócrino. Las múltiples acciones de la AII están mediadas por los receptores AT1 y AT2. El R-AT1 media la mayoría de las funciones biológicas de la AII, mientras que el R-AT2 se expresa en altos niveles durante la ontogenia y remodelación tisular. Previamente reportamos un incremento significativo del R-AT2 en la glándula mamaria durante la fase de involución. Además, observamos que la AII (1 μ M) induce la activación de ERK1/2, NF-kB y STAT3 en la línea epitelial mamaria murina normal Scp2. El objetivo del presente trabajo fue investigar los caminos de señalización inducidos por AII así como el subtipo de receptor involucrado, en el epitelio mamario tanto *in vitro* como *in vivo*. Mediante western blot, estudiamos el tipo de receptor que media la activación de ERK1/2 desencadenada por AII en las Scp2 utilizando antagonistas del R-AT1 (losartan) y R-AT2 (PD123,319). El losartan indujo un incremento en la fosforilación de ERK1/2 mientras que PD123,319 o saralazina (un antagonista peptídico de la AII) bloquearon su activación. Durante la fase de involución la activación de STAT3 resulta crítica para desencadenar la apoptosis del epitelio. Para esclarecer el impacto de la AII *in vivo*, evaluamos su capacidad de inducir la activación de STAT3 mediante western blot, en el epitelio mamario de ratones hembras Balb/c amamantando. Para ello, inoculamos AII en la mama #4 izquierda y solución fisiológica en la contralateral. Así, demostramos por primera vez, que la AII induce la activación de STAT3 en el epitelio mamario *in vivo*. Por otro lado, confirmamos mediante inmunohistoquímica la traslocación al núcleo de STAT3 en el epitelio mamario, tras ser estimulado con AII *in vivo*. En conjunto estos Resultados indican que el RAS es capaz de inducir eventos asociados a la involución post-lactancia en la glándula mamaria del ratón.

TRANSDUCCION DE SEÑALES P2

0552 (56) MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CANAL DE CLORURO CFTR, DEFICIENTE EN FIBROSIS QUÍSTICA, MEDIANTE LA SONDA FLUORIMÉTRICA SPQ, SENSIBLE AL IÓN CLORURO.. M C Marin^{1 2 3}, A G Valdivieso^{1 2 3}, G L Taminelli^{1 2}, M L Teiber^{1 2}, E S Pagano^{1 2 4}, T A Santa Coloma^{1 2 3 4}

¹Fundación Instituto Leloir; ²Programa de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina UCA; ³Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA; ⁴Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires-CONICET. <celestemarin@hotmail.com>

La Fibrosis Quística (FQ) se caracteriza por un defecto en el transporte de cloruro (Cl⁻) mediado por el canal CFTR. Actualmente, la actividad del CFTR se mide mediante microscopía de fluorescencia o electrofisiología, calculando el promedio de los valores obtenidos en células individuales. La medición no es sencilla, requiere equipos costosos y numerosas determinaciones. El objetivo de este trabajo fue medir la actividad del canal de Cl⁻ CFTR en un conjunto de cientos de miles de células simultáneamente, de forma sencilla, rápida y con respuestas a tratamientos en tiempo real. Con este fin utilizamos un espectrofluorímetro Hitachi F-2000 y la sonda fluorescente SPQ (6-methoxy-N-[3-sulfopropyl] quinolinium). Se utilizaron como modelo células T84 controles y tratadas con los inhibidores de la actividad del CFTR glibenclámda (100mM) y CFTR(inh)-172 (5µM). Luego de ser cultivadas sobre cubreobjetos en medio libre de suero por 24hs, las células fueron incubadas con el fluoróforo SPQ (6mM), durante 16-20 hs. Para la medición se utilizó una celda conectada a una bomba peristáltica, agitador magnético y baño termostático. Se realizó una medición basal y luego se agregó una mezcla estimulante de la actividad del CFTR (AMPc 200µM, IBMX 200µM e isoproterenol 20µM). Como se esperaba, se observó una respuesta significativamente menor al estímulo en las células tratadas con los inhibidores del CFTR. Los Resultados obtenidos muestran que la espectrofluorimetría con SPQ permite la medición de la actividad del canal de Cl⁻ CFTR de manera sensible, sencilla y reproducible. Asimismo, en observaciones preliminares se detectaron oscilaciones en la concentración de Cl⁻, hecho que sugiere una sincronización de todas las células en la expulsión y recaptación de Cl⁻, algo que hasta ahora no había sido detectado con los otros Metodologías, probablemente por falta de sensibilidad. Agradecimientos: subsidios UBA (X-156), ANPCyT (PICT 13907), becas del CONICET (MCM, ESP y AGV) y UCA (GLT).

0553 (297) IMPORTANCIA DE LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DE LA CROMATINA EN LA DISTRIBUCIÓN SUB-NUCLEAR DE CCAAT/ENHANCER BINDING PROTEIN BETA (C/EBP BETA) DURANTE LA DIFERENCIACIÓN ADIPOCÍTICA. M S Llarrull¹, G Piwien Pilipuk¹

¹Fundación Instituto Leloir- IIBBA-CONICET <mllarrull@leloir.org.ar>

La obesidad constituye un problema para la salud, siendo factor de riesgo para diversas enfermedades, entre ellas la diabetes de tipo II. Resulta, en parte, del aumento de la adipogénesis, regulada por los factores de transcripción C/EBPs. En preadipocitos 3T3-L1, el estímulo adipogénico induce la expresión de C/EBPβ que se concentra en áreas de heterocromatina pericentromérica, donde colocaliza con la proteína HP-1α. Previamente demostramos que C/EBPβ se une a sitios consenso en el ADN satelital e interactúa con HP-1α. Como se desconocen los mecanismos que regulan esta distribución nuclear particular de C/EBPβ, investigamos si la integridad de la organización centromérica es necesaria para su correcta localización. La heterocromatina pericentromérica presenta una estructura altamente condensada y el tratamiento prolongado con Tricostatina A (TSA), un inhibidor de desacetilasas, provoca su descondensación y la desorganización

de los cromocentros. Cuando se indujo la diferenciación de células 3T3-L1 en presencia de TSA, observamos disgregación de cromocentros, aumento en la fracción nucleoplásmica de C/EBPβ y colocalización de C/EBPβ y HP-1α en los focos heterocromáticos remanentes. Análisis por western blot evidenció que el tratamiento disminuye el nivel de expresión de C/EBPβ y aumenta la acetilación de la histona H4 sin afectar los niveles de metilación en H3K9, lo que explicaría la localización de HP 1α y probablemente la de C/EBPβ en los focos heterocromáticos. Estos Resultados sugieren que la integridad heterocromática es necesaria para la localización de C/EBPβ y la adipogénesis. Además, observamos por IFI que la forma activa de la ARN polimerasa II colocaliza con C/EBPβ en la periferia de la región heterocromática, resultado que sugiere un posible rol de C/EBPβ en el reclutamiento de la polimerasa como parte de un mecanismo de regulación de la transcripción en un microambiente nuclear desfavorable para dicho proceso, función que nos encontramos investigando.

0554 (494) MODULACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE EGF POR GH. M E Díaz¹, L González¹, J Miquet¹, A Sotelo¹, C Martínez¹, D Turyn¹

¹IQUIFIB (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica <m_euge_diaz@hotmail.com>

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) se relaciona con la progresión de distintos tipos de cáncer. Su receptor (EGFR) puede ser activado por la unión del ligando específico y también indirectamente por la hormona de crecimiento (GH); asimismo la GH regula la expresión del EGFR. Niveles elevados de GH han sido asociados con mayor incidencia al desarrollo de cáncer. **Objetivo:** Considerando las evidencias que implican a GH y EGF con carcinogénesis y la intercomunicación de su señalización, el objetivo de este trabajo fue analizar los mecanismos involucrados en la modulación de la señalización del EGF por la GH. **Materiales y Métodos:** Ratones transgénicos que sobreexpresan GH bovina (bGH) y ratones knock-out para el receptor de GH (GHR-KO) fueron inyectados con EGF, GH o solución fisiológica. Se solubilizaron los hígados para evaluar por *Western Blot* el contenido y grado de fosforilación de moléculas involucradas en la señalización de EGF. **Resultados:** El contenido de EGFR y su fosforilación en tirosinas fue menor en los ratones GHR-KO que en los normales ($p < 0,05$). La fosforilación de Akt, Erk 1/2, Stat3 y Stat5 también disminuyó ($p < 0,01$). Por el contrario, el contenido de EGFR y sus niveles basales de fosforilación fueron mayores en los ratones transgénicos que en los controles ($p < 0,05$). La estimulación con EGF produjo niveles de fosforilación del EGFR, Akt y Erk 1/2 similares entre ratones controles y transgénicos, mientras que la fosforilación de Stat3 y Stat5 se vio disminuida en los ratones transgénicos ($p < 0,01$). **Conclusiones:** La supresión de la acción de GH reduce la disminución de la expresión de EGFR y de la señalización del EGF. En cambio, altas concentraciones de GH inducen la sobreexpresión de EGFR sin resultar en una hiperactivación de la señalización. Las vías de Akt y Erk 1/2 no se ven afectadas, mientras que la activación de Stat3 y Stat5 por EGF es selectivamente desensibilizada por las altas concentraciones de GH circulante.

0555 (515) LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR AKT SE ENCUENTRA EXACERBADA EN HÍGADO DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN GH. C S Martínez¹, J G Miquet¹, L González¹, M E Díaz¹, E Zotta², D Turyn¹, A I Sotelo¹

¹Departamento de Química Biológica, Instituto de Química y Físicoquímica Biológica (IQUIFIB, UBA - CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires <carolinasmartinez@gmail.com>

La serina/treonina quinasa Akt o proteína quinasa B (PKB) es un importante factor implicado en la regulación de procesos de apoptosis, proliferación, diferenciación y metabolismo. Se obser-

varon alteraciones de la señalización mediada por Akt en numerosos cánceres y se cree que su actividad estaría asociada con la progresión tumoral. Akt promueve la supervivencia celular por diversos mecanismos, entre ellos mediante el aumento de la transcripción de genes de supervivencia por activación de los factores de transcripción NF- κ B y CREB. Akt también participa en la regulación del ciclo celular al controlar la expresión de ciclina D1. Los sustratos de Akt GSK-3 y mTOR son quinasas que estarían involucrados en la regulación de la expresión de ciclina D1. Ratones transgénicos que sobreexpresan hormona de crecimiento (GH) presentan hepatomegalia debido a hipertrofia e hiperplasia, que frecuentemente progresa a hepatocarcinoma en animales de edad avanzada. Recientemente hemos descrito que estos ratones exhiben activación constitutiva o sobreexpresión de numerosos mediadores de señalización de GH implicados en procesos de supervivencia, proliferación y motilidad celular. El objetivo del presente trabajo es evaluar la implicancia de Akt y diversos efectores activados por esta vía en las alteraciones hepáticas que presentan los ratones que sobreexpresan GH. Mediante ensayos de Western-blotting se determinó el contenido proteico y la activación por fosforilación en residuos específicos de las proteínas de interés en solubilizados de hígado de ratones transgénicos y controles no transgénicos. Los ratones transgénicos presentan un importante aumento en el contenido proteico y la fosforilación de Akt, mTOR, GSK-3 y NF- κ B ($P < 0,01$; $n = 5$). También se encuentra aumentada la expresión de la ciclina D1 ($P < 0,01$, $n = 7$). Estos Resultados sugieren que la vía de señalización mediada por Akt podría estar involucrada en los procesos que derivan en hepatocarcinoma en ratones que sobreexpresan GH.

0556 (540) LA INMUNOFILINA DE ALTO PESO MOLECULAR FKBP51 INTERACTÚA Y REGULA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE CREB. S Guber¹, M D Galigniana¹, G Piwien Pilipuk¹

¹Laboratorio de Arquitectura Nuclear, Fundación Instituto Leloir - IIBA - CONICET, Buenos Aires, Argentina. <sguber@leloir.org.ar>

Los glucocorticoides juegan un importante rol en la diferenciación adipocítica vía su receptor, el cual existe como un oligómero unido a hsp90 y una inmunofilina de alto peso molecular (IMM), entre las que se encuentra FKBP51. En estudios previos, nosotros demostramos que en preadipocitos 3T3-L1, FKBP51 se localiza en las mitocondrias y al inducirse la adipogénesis transloca a núcleo donde permanece durante los primeros dos días de diferenciación. La diferenciación adipocítica se induce por tratamiento de las células con dexametasona, insulina, e isobutilmetilxantina (IBMX). Sólo IBMX induce la translocación de FKBP51 al núcleo, evento que depende del aumento de AMP cíclico y la activación de PKA. Debido a que la activación de CREB vía PKA también es esencial para la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 en adipocitos, y como nada se sabe sobre el rol de FKBP51 en el núcleo, decidimos investigar si CREB podría ser un blanco regulatorio de FKBP51, ya que esta IMM se concentra en el núcleo en respuesta a la activación de PKA. Encontramos que CREB fosforilado en Ser133 colocaliza en foci nucleares con FKBP51. Por inmunoprecipitación encontramos que P-CREB co-inmunoprecipita con FKBP51, indicando que dichos factores interactúan. Además, en ensayos de genes de reporte utilizando un reportero con sitios CRE y transfectando distintas cantidades de FKBP51, obtuvimos una respuesta transcripcional bifásica en la cual a bajas concentraciones FKBP51 aumenta la actividad transcripcional de CREB mientras que a altas concentraciones de FKBP51 ésta se reduce. En síntesis, FKBP51 muestra cambios dinámicos en su distribución subcelular en respuesta a PKA y su transitoria concentración en el núcleo podría modular la capacidad transcripcional de CREB y posiblemente la de otros factores de transcripción, regulación que sería necesaria para la adquisición del fenotipo adipocítico.

0557 (547) MECANISMO DE RETROTRANSPORTE CITOPLASMÁTICO, IMPORTACIÓN NUCLEAR, TRANSFORMACIÓN Y EXPORTACIÓN DEL RECEPTOR DE MINERALO-

CORTICOIDES. A G Erlejan¹, M Monte¹, G Piwien Pilipuk², M D Galigniana^{1,2}

¹Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; ²Laboratorio de Receptores Nucleares, Fundación Instituto Leloir-IIBBA CONICET <erlejan@qb.fcen.uba.ar>

Previamente reportamos que hsp90 es requerida para el retrotransporte de GR, implicando que la transformación (o disociación de hsp90) podría ser un evento nuclear. El objetivo de este trabajo fue estudiar si la maquinaria de retrotransporte de MR es similar, evidenciar adónde ocurre la transformación y cómo MR es exportado del núcleo. Al inmunoprecipitar (IP) a MR se co-IP a hsp90, hsp70, p23, FKBP51, FKBP52, tubulina, dineína, p150^{Glu} y p50/dinamitina. Se recuperó una mayor cantidad de tubulina cuando las células se preincubaron con taxol y se homogenizaron en presencia de taxol y GTP para evitar la despolimerización de los microtúbulos. También se evidenció colocalización de MR con microtúbulos en células fijadas por cross-linking con p-formaldehído. La especificidad de la señal fue demostrada por bloqueo con tubulina pura o con péptido flag (para flag-MR). La incubación de las células con esteroide seguido por la IP de MR demostró que FKBP52 y dineína son reclutadas y que FKBP51 es disociada. Se recuperó al complejo MR•hsp90•FKBP52•dineína en el nucleoplasma hasta 10 min post-agregado de esteroide, cuando MR ya es totalmente nuclear. La fracción nuclear de MR disminuyó cuando se interfirió la maquinaria de transporte con inhibidores de hsp90, por sobreexpresión de los péptidos TPR o PPIasa (los que asocian a FKBP52 con hsp90 y dineína, respectivamente), o por sobreexpresión de p50/dinamitina, lo que desensambla complejos dineína/dinactina. La translocación nuclear de MR se inhibió en células MEF FKBP52^{-/-} y se recuperó por transfección de FKBP52. La exportación nuclear de MR fue insensible a leptomicina B, se favoreció por sobreexpresión del péptido TPR y se inhibió con un péptido que incluye al dominio DBD. Concluimos que MR se retrotransporta de manera activa vía el complejo hsp90•FKBP52•proteínas motoras, se transforma en el núcleo, y se exporta por un mecanismo independiente de CRM1 en el que participan proteínas TPR y el dominio DBD del receptor.

0558 (558) CASCADA DE SEÑALES INTRACELULARES GENÓMICAS Y NO GENÓMICAS EN CÉLULAS DE LINFOMA T MURINO INDUCIDAS POR HORMONAS TIROIDEAS (HT). M L Barreiro Arcos¹, R N Farías², A J Klecha^{1,3}, H A Sterle¹, A M Genaro^{1,3}, G A Cremaschi^{1,3}

¹CEFYO-CONICET; ²INSIBIO, UNT-CONICET; ³Lab. Radioisótopos, FFyB, UBA <mlbarreiro@yahoo.com.ar>

Las HT ejercen acciones en el desarrollo, crecimiento y diferenciación celular mediante efectos genómicos y no genómicos. Se ha demostrado que regulan la respuesta inmune, pero se desconocen los mecanismos implicados. Previamente demostramos que las HT inducen la división de las células del linfoma T BW 5147 (BW) a través de la activación de PKC ζ . En este trabajo estudiamos la cascada de señales intracelulares involucrada. Comprobamos que bloqueantes selectivos de las esfingo-mielinasas ácidas y neutras, imipramina y GW4869 respectivamente, inhibieron los efectos de las HT sobre la proliferación y la actividad de PKC ζ . Por otra parte las HT, vía PKC ζ , inducen la expresión proteica (cuantificada por western blot, WB) y genómica (por RT-PCR) de iNOS. En estos efectos está involucrada la activación de NF κ B (determinado por EMSA). Tanto T3 como T4 acopladas a agarosa e impermeables a la membrana celular, indujeron la respuesta proliferativa, aunque sus efectos fueron significativamente menores que los obtenidos con HT libres. Las HT acopladas a agarosa indujeron una rápida traslocación y activación de PKC a la membrana celular (medida por fosforilación de un sustrato específico), asimismo provocaron la degradación en citoplasma del I κ B con la consecuente traslocación de NF κ B al núcleo (cuantificados por WB y EMSA, respectivamente). El pretratamiento de las células BW con el pseudosustrato de PKC ζ inhibió estos efectos, así

como también la inducción de la proliferación mediada por HT-agarosa. Ambas, HT y HT-agarosa incrementaron la fosforilación de ERK (evaluado por western blot) respecto de células BW sin tratamiento hormonal. A diferencia de las HT, las HT-agarosa fueron incapaces de inducir la expresión proteica y genómica de iNOS. Estos Resultados indican que la acción de las HT sobre células BW involucra la activación no genómica de PKC, NFκB y ERK, llevan a la inducción genómica de la iNOS e incrementan así la proliferación celular

0559 (650) LA ISOFORMA MITOCONDRIAL DE NOS NEURONAL (NNOS) CARECE DEL DOMINIO PDZ DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA EN EL HÍGADO. M F Molinas¹, M C Franco¹, D P Converso¹, A Gonzalez¹, J J Poderoso¹, M C Carreras¹

¹Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno Hospital de Clínicas Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires <flori.molinas@gmail.com>

Durante el desarrollo de la condición hipotiroidea en ratas Wistar tratadas con 0.02% metimazol en el agua de bebida, hay un pico en la expresión de nNOS y en su translocación a las mitocondrias de hígado a los 14 días de tratamiento. En este tejido, el peso molecular (PM) aparente de nNOS en la mitocondria es 130 kDa, en contraste con la isoforma citosólica, de 160 kDa. A continua-

ción, estudiamos la localización intramitocondrial de nNOS en hígado de ratas tratadas 14 días con metimazol, mediante fraccionamiento submitocondrial seguido de *Western blot*, utilizando un anticuerpo que reconoce el extremo C-ter de nNOS. La enzima se encontró en espacio intermembrana y matriz y en menor medida, en membrana externa. Un anticuerpo policlonal que reconoce el extremo N-ter de nNOS falló en detectar la proteína en las fracciones submitocondriales pero sí reconoció nNOS de citosoles de cerebro e hígado y nNOS sintetizada en un sistema *in vitro*. Este mismo anticuerpo tampoco detectó una forma truncada de nNOS, de 130 kDa de PM aparente, que carece del dominio PDZ (aminoácidos 1 a 100). Esta proteína, sintetizada *in vitro*, sí fue reconocida por el anticuerpo anti-C-ter. Un anticuerpo que reconoce los aminoácidos 144 a 262 de nNOS detectó la enzima en todos los casos señalados anteriormente. Para corroborar estos Resultados, aislamos hepatocitos de ratas Wistar de 10 días de edad, donde nNOS tiene un PM aparente de 130 kDa tanto en citosol como en mitocondria. Mientras que los anticuerpos anti-C-ter y anti-144 a 262 reconocieron la banda de nNOS en ambas fracciones, el anticuerpo anti-N-ter no detectó la enzima en ninguno de los dos casos pero sí reconoció nNOS de citosol de cerebro (control positivo). En el hígado, la translocación de nNOS a la mitocondria requiere la pérdida de su dominio PDZ, lo que podría implicar un nuevo mecanismo de translocación a mitocondria por proteólisis parcial de la proteína.