

RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

PREMIO LEON CHERNY

- 001. (152) EL 17 BETA-ESTRADIOL REGULA LA TRANSCRIPCIÓN Y ESTABILIDAD DEL ARNm DE LAS SUBUNIDADES ALFA 1 Y BETA 1 DE LA GUANILIL CICLASA SENSIBLE A ÓXIDO NÍTRICO EN ADENOhipÓFISIS.** Cabilla J.¹; Ronchetti S.²; Quinteros F.³; Nudler S.⁴; Miller E.⁵; Duvilanski B.⁶

Instituto de Química y Físico-química Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; 2, 3, 4, 5, 6 <jcabilla@ffybu.uba.ar>

El estrógeno (E2) regula la liberación hormonal así como también la proliferación y la muerte celular adenohipofisaria. La guanilil ciclasa soluble (sGC) cataliza la formación de GMPc y está compuesta por 2 subunidades, α y β , siendo α 1/ β 1 el heterodímero más activo y ubicuo. Previamente mostramos que la administración de E2 causa un efecto opuesto sobre las subunidades de la sGC, aumentando los niveles de ARNm y proteína de la subunidad α 1 y disminuyendo los de β 1 y la actividad enzimática global. Objetivo: investigar los mecanismos por los cuales el E2 regula diferencialmente la expresión de las subunidades de la sGC en adenohipofisis. Materiales y Métodos: Los cultivos primarios de células adenohipofisarias se incubaron durante 6 u 8 h con E2 10-9 M en presencia o ausencia de diferentes drogas. Se evaluaron los niveles de ARNm por PCR semicuantitativa o proteína por western blot de α 1 y β 1. El tratamiento con E2-BSA (10-9 M, incapaz de atravesar la membrana celular) no modificó los niveles de ARNm de α 1 ni β 1. El tratamiento con actinomicina D (2 μ M, inhibidor de la transcripción) revirtió parcialmente el aumento del ARNm de la subunidad α 1 y la disminución de la β 1 causado por E2. La cicloheximida (10 μ g/ml, inhibidor de la traducción) revirtió completamente el desbalance en la expresión de los ARNm de α 1 y β 1 inducido por E2. El tratamiento con E2 disminuyó la expresión del ARNm del factor HuR y aumentó la del AUF1 (factores de estabilización de ARNm). Conclusión: el E2 ejerce sus efectos sobre la expresión de las subunidades de la sGC a través del receptor intracelular. Este efecto depende parcialmente de la transcripción y de la traducción de novo de las subunidades y de ciertos factores reguladores. El E2 promueve un ambiente de desestabilización de ARNm que se corresponde con la disminución de los niveles de β 1. Estos Resultados muestran que la sGC sufre una compleja regulación por parte del E2 y sugieren un papel clave en la fisiología adenohipofisaria.

- 002. (508) LA INFECCIÓN DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS CD34+ CON VIRUS JUNÍN ALTERA SELECTIVAMENTE LA TROMBOPOYESIS A TRAVÉS DE LA LIBERACIÓN PARÁCRINA DE INTERFERONES TIPO I.** Pozner R.¹; Ure A.²; Jaquenod De Giusti C.³; D'atri L.⁴; Torres O.⁵; Schattner M.⁶; Gomez R.⁷

Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina¹; Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata.^{2,3}; Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina.^{4,5,6}; Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad de La Plata.⁷ <rpozner@hematologia.anm.edu.ar>

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad endemo-epidémica causada por el virus Junin (JUNV). Si bien la

trombocitopenia es una de las manifestaciones clínicas de esta enfermedad, sus causas son desconocidas. Dado que una disfunción en la megacariocito/trombopoyesis podría explicar este fenómeno, estudiamos el impacto del JUNV sobre el desarrollo de megacariocitos (MCs) y la producción de plaquetas utilizando células CD34+ estimuladas con trombopoyetina. Tanto la proliferación y supervivencia de MCs, la capacidad clonogénica de progenitores, el comisionamiento al linaje megacariocítico y la diferenciación fueron normales en cultivos infectados con JUNV. Sin embargo, la formación de proplaquetas y la liberación de plaquetas fueron inhibidas significativamente. Los cultivos fueron infectados de manera restrictiva (4.1 \pm 0.2 y 4.9 \pm 0.5% de infección por FACS e inmunofluorescencia respectivamente, n=3). Si bien algunos MCs fueron JUNV+, la mayoría de las células infectadas no fueron MCs ni monocitos/macrófagos, sugiriendo que la disminución en la liberación de plaquetas no sería por efecto directo del virus sobre MCs. La infección fue dependiente del receptor de transferrina (TfR1) y la expresión del mismo fue regulada positivamente por la infección revelando una nueva estrategia de diseminación de JUNV en células de médula ósea. La reducción en la liberación de plaquetas también fue dependiente del TfR1 y mimetizada por poly(I:C), siendo los interferones tipo I (IFN I) mediadores de este efecto. Entre las moléculas estudiadas, sólo el factor nuclear-eritroide 2 mostró un menor nivel de expresión en los MCs de cultivos infectados o tratados con IFN I. Más aún, estos MCs presentaron una maduración citoplasmática defectuosa. Estos Resultados presentan un mecanismo potencial que explicaría la trombocitopenia en FHA y otras enfermedades asociadas con niveles aumentados de IFN I en el microambiente medular.

- 003. (816) LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS Y GLICANOS VINCULA FENÓMENOS DE HIPOXIA Y NEOVASCULARIZACIÓN: MECANISMOS INVOLUCRADOS Y RELEVANCIA CLÍNICA EN SARCOMA DE KAPOSÍ.** Croci D.¹; Rubinstein N.²; Salatino M.³; Illarregui J.⁴; Toscano M.⁵; Croci M.⁶; Rabinovich G.⁷

Laboratorio de Inmunopatología IBYME-CONICET¹; LEGMA – IFIBYME UBA; Laboratorio de inmunogenética Htal. de Clínicas "José de San Martín" UBA²; Laboratorio de Inmunopatología IBYME-CONICET³; Laboratorio de inmunogenética Htal. de Clínicas "José de San Martín" UBA^{4,5}; Laboratorio de Inmunopatología IBYME-CONICET⁶; Laboratorio de Inmunopatología IBYME-CONICET⁷; Laboratorio de inmunogenética Htal. de Clínicas "José de San Martín" UBA⁷ <croci@dna.uba.ar>

Uno de los desafíos de la biología tumoral consiste en la búsqueda de mecanismos que vinculen fenómenos de hipoxia y angiogénesis. En función del papel crítico de galectina-1 (Gal1) en la progresión tumoral investigamos su relevancia en fenómenos de neovascularización. Gal1 se une a células HUVEC principalmente en N-glicanos (P<0,05) promoviendo a proliferación (p<0,05), migración/invasión (p<0,01) y tubulogénesis (p<0,01) a través de mecanismos dependientes de la activación de las vías de señalización de PI3K-Akt y Erk1/2 (p<0,01). Por otro lado, observamos que Gal1 se encuentra asociada a VEGFR2 e induce su segregación en estructuras tipo "lattices". En tal sentido, La migración y tubulogénesis inducidas por Gal-1 se inhiben con anticuerpos anti-VEGFR2 (P<0,01). A los fines de evaluar la regulación de la expresión de Gal1 se incubaron células de Sarco-

ma de Kaposi (KS) en condiciones de hipoxia (1% O₂), observándose un marcado incremento de la expresión dependientes de la activación de NF-κB e independiente de HIF-1α (p<0,01). Dicha expresión de Gal1 fue crítica para el crecimiento y la neovascularización de tumores KS (p<0,01). La relevancia fisiopatológica de estos hallazgos fue determinada a través del bloqueo de la expresión de Gal1 mediante shRNAs la cual logró inhibir la capacidad angiogénica de tumores KS in vivo (p<0,05) e in vitro (p<0,01). Más aún, el análisis inmunohistoquímico de diversas patologías vasculares humanas reveló que Gal1 se expresa selectivamente en patologías malignas (n=41) (p<0,05), confirmando el impacto clínico de nuestras hallazgos. En conjunto, estos Resultados sugieren que Gal1 participaría activamente en la generación de un microambiente tumoral pro-angiogénico, en el cual la hipoxia, a través de la expresión de Gal1, afectaría la biología de las células endoteliales promoviendo la neovascularización y el crecimiento tumoral. El presente estudio sugiere además nuevos enfoques en el diagnóstico y terapia de tumores.

004. (256) CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL Y COMPORTAMENTAL DE DOSIS SUBLETALES SISTÉMICAS DE STX² EN CEREBROS DE RATONES. Tironi Farinati A.¹; Geoghegan P.²; Cangelosi A.³; D'alesio L.⁴; Parma Y.⁵; Morris W.⁶; Loidl C.⁷; Goldstein J.⁸

Lab. de Neurofisiopatología, Depto. Fisiología, Fac. de Medicina, UBA¹ ; CNCBB, ANLIS, Malbrán^{2,3} ; Facultad de Medicina, Hospital Ramos Mejía, UBA⁴ ; Instituto de Patobiología, CNIA, INTA^{5,6}; IBC y Neurociencia "Prof. E. De Robertis", Fac.de Medicina, UBA⁷; Lab. de Neurofisiopatología, Depto. Fisiología, Fac. de Medicina, UBA⁸ <carlatf@gmail.com>

La toxina Shiga (Stx) proveniente de *E. coli* enterohemorrágica es la causante de colitis hemorrágica y complicaciones neurológicas que representan una de las mayores causas de mortalidad y de morbilidad asociadas al SUH en niños. Previamente demostramos que la Stx2 lesionó neuronas y astrocitos en cerebros de ratas cuando se la administró vía intracerebroventricular (icv). El objetivo del presente trabajo es caracterizar por microscopía electrónica (ME) y comportamental la acción de dosis subletales de Stx2 (dsStx2) administrada vía intraperitoneal (ip) para determinar las diferencias con los Resultados obtenidos por icv. A los 8 días de tratamiento los ratones fueron anestesiados, perfundidos y sus cerebros extraídos para estudios de ME. Para los experimentos comportamentales los animales tratados vía ip con un vehículo o con dsStx2 se sometieron a la prueba del plano inclinado en diferentes días. Además de haber encontrado neuronas apoptóticas y astrocitos lesionados se observó por ME en los grupos tratados con dsStx2 oligodendrocitos apoptóticos y en degeneración, vasos dañados con edema perivascular y sinapsis tripartita (interposición de un proceso astrocitario entre la pre y post sinapsis), lo que no se evidenció en el grupo control (vehículo), ni en los tratados vía icv. En los experimentos de plano inclinado se compararon los valores de ángulo de caída de cada grupo. Los animales tratados con Stx2 mostraron menores ángulos de caída que en el grupo control (p<0,05), lo que indica una menor habilidad motora y un menor equilibrio. Los Resultados obtenidos muestran diferencias ultraestructurales entre las administraciones ip y la icv. Sin embargo no descartamos posibles diferencias de especímenes entre rata y ratón. Las lesiones celulares y los cambios sinápticos ultraestructurales encontrados en los cerebros tratados se correlacionan con las alteraciones comportamentales observadas que pueden reflejar las situaciones neuropatogénicas en pacientes afectados con SUH.

005. (314) RAC³, COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES Y NF-κB, PROMUEVE LA TUMORIGÉNESIS COMO FACTOR ANTIAPOPTÓTICO, PROLIFERATIVO Y TRANSFORMANTE. Rubio M.¹; Micenmacher S.²; Alvarado C.³; Ruiz Grecco M.⁴; Fernandez Larrosa P.⁵; Costas M.⁶

Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, IDIM-CONICET^{1,2,3,4,5,6} <maferubio@yahoo.com.ar>

Demostramos previamente que RAC3 es un coactivador de NF-κB, promueve la proliferación celular, se encuentra sobreexpresado en células leucémicas e inhibe la apoptosis por mecanismos nucleares y citoplasmáticos. También habíamos observado que Ciclina D1 reprime la actividad transcripcional de NF-κB y esta inhibición es revertida por sobreexpresión de RAC3. Este antagonismo a nivel transcripcional coincide con los Resultados obtenidos en ensayos de proliferación de la línea HEK 293. Para evaluar si este efecto antagonístico también alteraba la capacidad de RAC3 de estimular el crecimiento en ausencia de anclaje, células HEK 293, incapaces de crecer en estas condiciones, fueron transfectadas con vectores que expresan RAC3 y/o CD1 realizando ensayos de crecimiento en soft agar. Tras 40 días se observó que la sobreexpresión conjunta de ambos revierte el efecto obtenido en las que sobreexpresan CD1 o RAC3 (80 ± 10 alto RAC3 versus 3 ± 1 alto RAC3 + CD1 número de colonias por campo). Por otro lado, CD1 es reclutado a secuencias κB de su propio promotor en condiciones basales mientras que la unión de NF-κB coincide con la disminución de la unión de CD1. Para evaluar si CD1 era capaz de reclutar proteínas co-represoras a dichas secuencias se realizaron ensayos de ChIP a distintos tiempos (15, 30, 60 y 180 min) post-tratamiento con PMA (10 ng/ml). Los Resultados obtenidos demuestran que el reclutamiento de la histona deacetilasa1 coincide con la unión de CD1 mientras que RAC3 es detectado cuando NF-κB se encuentra unido al ADN. CD1 ejercería su efecto inhibitorio sobre NF-κB vía el reclutamiento de co-represoras a nivel del promotor. RAC3 es un factor transformante que coopera en la proliferación celular aumentando la expresión de CD1, la cual a su vez controla su propia expresión por retroalimentación negativa. Si bien la sobreexpresión de alguna de estas moléculas contribuye al desarrollo tumoral, su descontrol y sobreexpresión simultánea puede resultar antitumoral.

006. (13) RECONSTRUCCION DE MULTIPLES EMBRIONES A PARTIR DE LA REPLICACION DE UN UNICO OVOCITO. Vichera G.¹; Olivera R.²; Salamone D.³

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires^{1,2,3} <gvichera@agro.uba.ar>

Ciertas técnicas de micromanipulación utilizadas en investigación animal pueden ofrecer una opción de tratamiento para parejas infértiles, particularmente en casos relacionados con baja disponibilidad y mala calidad de los ovocitos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método para replicar el núcleo de un ovocito y con estas replicas reconstruir por transferencia nuclear nuevos ovocitos con capacidad de ser fertilizados. Para ello, ovocitos bovinos fueron madurados in-vitro en condiciones estándar y posteriormente fueron activados partenogénicamente en forma haploide para inducir la replicación de su genoma. La ploidía de los núcleos generados fue verificada por análisis de cariotipo. Finalmente utilizando los núcleos replicados se reconstruyeron nuevos ovocitos por electrofusión, empleando como recipientes cigotos producidos por fertilización in-vitro (FIV) a los que se les retiró el núcleo materno mediante micromanipulación. Los embriones producidos se cultivaron en medio SOF y el desarrollo embrionario se analizó mediante Fisher p<0,05. Adicionalmente, se examinó por inmunohistoquímica, el patrón de expresión de Oct-4 (gen marcador de pluripotencialidad) de los blastocistos generados.

007. (649) POLARIZACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES MEDIADA POR UNA DINÁMICA REDISTRIBUCIÓN NUCLEAR DE HETEROCHROMATIN PROTEIN (HP) 1 GAMA COMO NOVEL MECANISMO REGULADOR DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR. Desbats M.¹; Prendes L.²; Schwartz J.³; Piwien Pilipuk G.⁴

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bs. As. CONICET FIL^{1,2}; Dep. of Molecular & Integrative

Physiology, The University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA³; Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bs. As. CONICET FIL⁴ <gpilipuk@leloir.org.ar>

La obesidad es un serio problema para la salud, siendo factor de riesgo para enfermedades tales como diabetes de tipo II. Se debe, en parte, al aumento de la adipogénesis, proceso que implica el mantenimiento de un conjunto de genes factibles de ser expresados mientras que el resto es silenciado. Durante la adipogénesis los factores de transcripción C/EBPs juegan un rol central, pero se desconoce la función de las HP1. Las isoformas de C/EBP β , LAP y LIP, interactúan con HP1 α . LAP se une a HP1 α en áreas eucromáticas y heterocromáticas y LIP lo hace exclusivamente en heterocromatina. HP1 α inhibe la capacidad transcripcional de C/EBP β , sugiriendo un rol en el silenciamiento de genes blanco de C/EBP β . Llamativamente mientras la distribución nuclear de HP1 α es estable, HP1 γ deja dominios heterocromáticos concentrándose transitoriamente en el polo del núcleo opuesto al MTOC al inducirse la diferenciación de 3T3-L1. La polarización de HP1 γ requiere de su fosforilación en Ser83 dependiente de PKA. HP1 γ colocaliza con RNAPol II activa en el polo nuclear. La polarización de HP1 γ es dinámica dependiendo de la actividad transcripcional ya que se bloquea por inhibidores de la RNAPol. Por InmunoRNA-FISH observamos que en el polo nuclear en donde se concentra HP1 γ se detecta una mayor cantidad de ARNm en comparación con el resto del núcleo, demostrando que en dicho polo hay altos niveles de activa transcripción. Observamos una disminución de lámina A que sugeriría un posible remodelamiento de la lámina acompañando al aumento de actividad transcripcional. En síntesis, describimos por primera vez la existencia de polarización de la transcripción de genes en estadios tempranos de la diferenciación adipocítica. Este evento depende de la polarización de HP1 γ que serviría de plataforma para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional facilitando la expresión de un grupo particular de genes localizados en los territorios cromosómicos ubicados en el polo del núcleo opuesto al MTOC

PREMIO PATRICIO COSSIO

008. (206) ESTADO MUTACIONAL DE LOS GENES KRAS Y BRAF EN EL CÁNCER COLORECTAL. Denninghoff V.¹; Perazzo F.²; Tatangelo M.³; Dos Santos M.⁴; Avagnina A.⁵; García A.⁶; Elsner B.⁷

CEMIC^{1,2}; Centro de Asistencia e Investigación Clínica Integral (CAICI), Rosario, Santa Fe³; CEMIC^{4,5,6,7} <vcdennin@yahoo.com.ar>

Varios estudios demuestran que las mutaciones somáticas del KRAS predicen resistencia al tratamiento con Cetuximab en tumores colorectales. Los objetivos de este trabajo son identificar las mutaciones en los codones 12, 13, 15 y 61 del gen KRAS y el codón 600 del gen BRAF, determinar su frecuencia mutacional y relacionarlas con las características de los individuos y del tumor. Fueron reclutados prospectivamente (enero-junio 2009), 102 individuos con cáncer colorectal (CCR). A partir del ADN de los tumores parafinados, se secuenciaron los exones 2 y 3 del gen KRAS y el 15 del gen BRAF. El estado mutacional de KRAS y BRAF fue:

codón	12	13	15	61	600
mutado	35	3	2	4	12
wild-type(wt)	67 (2)	99	100 (39)	98	90

La frecuencia mutacional con cambio de sentido de KRAS y BRAF fue: 0.41 G12V, 0.11 G12D, 0.07 G12S, 0.04 G12A, 0.05 G13D, 0.01 G15V, 0.02 G15S, 0.05 E61L, 0.02 E61R, 0.11 V600G, 0.05 V600E, 0.04 V600L, 0.02 V600M. El 51% de los individuos es wt para todas las mutaciones estudiadas. No se hallaron diferencias significativas entre el estado mutacional y las características de los individuos (sexo, edad, origen étnico, IMC, sedentarismo, ta-

baquismo, antecedentes familiares), y del tumor (localización, histología, diferenciación, invasión vascular, tamaño, ganglios resecados, ganglios positivos, metástasis, sitio de metástasis, estadio). Este es el primer análisis en una población con CCR argentina. La frecuencia mutacional en esta población difiere de las reportadas en trabajos europeos y americanos. Dado que el KRAS y el BRAF actúan en la misma vía de señalización, la incorporación de la determinación del BRAF en pacientes KRAS-wt, permitiría identificar el grupo de paciente que se beneficiarían con la terapia monoclonal anti-EGFR. Se ha demostrado que el CCR con G12V esta asociado a peor pronóstico con respecto a los KRAS-wt o G12D, por lo tanto este estudio, en un futuro, permitiría determinar si los diferentes cambios aminoacídicos tienen la misma importancia en la respuesta terapéutica.

009. (506) ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS Y GENOTIPOS DE METABOLIZACIÓN DE TRES FAMILIAS DE FARMACOGENES EN PACIENTES CON CÁNCER TESTICULAR.

Cambados N.¹; Pavicic W.²; Bayo S.³; Richard S.⁴

IMBICE Lab. de Citogenética y Mutagénesis CIC CONICET^{1,2}; Servicio de Urología Hospital de San Isidro³; IMBICE Lab. de Citogenética y Mutagénesis CIC CONICET⁴ <nadi_08@yahoo.com.ar>

Los Genes Metabolizantes Xenobióticos (GMXs) codifican enzimas específicas involucradas en el metabolismo de muchos compuestos carcinogénicos y procarcinogénicos. CYP1A2 y NAT2, muestran diferentes alelos que dan origen a genotipos de metabolismo rápido, intermedio y lento. GSTM1 y GSTT1, presentan polimorfismos que pueden resultar en genotipo null, asociados a un leve aumento en el riesgo de cáncer de pulmón y vejiga. Nuestro objetivo fue analizar las variantes alélicas de los GMX nombrados y relacionar haplotipos con incidencia de cáncer testicular. En este trabajo, se estudiaron 2 variantes alélicas del CYP1A2 (*C;*F), así como genotipos de NAT2, GSTM1 y GSTT1, en una serie de 79 cánceres testiculares. El análisis genotípico de los mismos, se realizó mediante PCR y RFLP. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para participar en el estudio. El 53% de los pacientes con cáncer testicular presentaron el fenotipo de acetilación lenta para NAT2. Para el caso de CYP1A2 se sabe que la mutación del alelo C, da lugar a un genotipo de metabolización lenta; mientras que una mutación en el alelo F, genera un aumento en la inducibilidad enzimática. De los casos de tumores testiculares analizados, el 91% presentaron el genotipo wild type (G/G) para el alelo C. Sólo el 1% mostraron la variante mutada del alelo F (A/A). Los genes GST mostraron diferentes tendencias: en el caso de GSTM1 prevaleció el genotipo null, mientras que GSTT1 presentó una mayor prevalencia del genotipo (+). La generación de haplotipos permitió examinar la existencia de un efecto conjunto entre los GMXs estudiados. Los haplotipos mayoritarios resultaron de la combinación de los genotipos *C G/G y *F A/A (49%), así como de la asociación de ambos a un fenotipo intermedio-lento para NAT2 (44%). Nuestros Resultados permiten estimar que la metabolización de compuestos procarcinogénicos, en un alto porcentaje de pacientes con cáncer testicular, es más rápida que la observada en la población sana.

010. (717) DIFERENCIAS DE GENERO EN LA MASA VENTRICULAR IZQUIERDA DE JOVENES NO HIPERTENSOS: ROL DE LA PRESION ARTERIAL. Pinilla O.¹; Escudero E.²; Ennis I.³; Salazar M.⁴; Cingolani H⁵

Centro de Investigaciones Cardiovasculares^{1,2,3}; Profesor Facultad de Ciencias Médicas UNLP⁴; Centro de Investigaciones Cardiovasculares⁵ <oscar_pinilla@hotmail.com>

Introducción: los varones (v) tienen cifras de presión arterial (PA) mayores que las mujeres (m) a igual edad. Estas diferencias son reconocibles a partir de la adolescencia y se mantienen durante la adultez. Resultados similares se obtienen al estudiar la masa ventricular izquierda (MVI). La diferencia entre géneros en la MVI ha sido atribuida a las diferencias antropométricas en-

tre m y v, sin considerar la diferencia existente en los valores promedio de PA entre ambos sexos. Este estudio fue diseñado a los efectos de analizar el potencial impacto de la diferencia de PA entre v y m sobre la MVI. Material y Métodos: se realizó un estudio de corte transversal incluyendo 3594 alumnos universitarios (21 ± 0.03 años de edad, 4% v). La PA se determinó auscultatoriamente dos veces en dos ocasiones diferentes, separadas por un intervalo de una semana. El promedio de las cuatro determinaciones se consideró como el valor identificatorio de cada individuo. La MVI fue calculada en un subgrupo representativo de alumnos ($n = 378$; no hipertensos, no obesos) por ecocardiografía con un equipo Sonosite Micro-Maxx. Resultados: las PA promedio sistólicas y diastólicas, fueron ~ 11 y 4 mmHg mayores en v que en m; mientras que la MVI fue 35.36 ± 2.56 g mayor en v ($p < 0.01$). A fin de determinar la contribución relativa de la PA y los parámetros antropométricos en la diferencia de MVI entre géneros, se realizó un análisis de covarianza. El mismo determinó que la diferencia en los valores de PA entre sexos era capaz de explicar 14% de la diferencia en la MVI mientras que la superficie corporal permitió justificar el 59% de la misma. Conclusión: estos Resultados permiten concluir que la diferencia de PA entre v y m es parcialmente responsable de la diferencia en la MVI entre ambos. El tamaño corporal es el principal responsable de esa diferencia, aunque persiste un 27% de la misma que podría asociarse a patrones hormonales y/o mecanismos humorales más difícilmente reconocibles.

011. (364) ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE REPARACIÓN TISULAR EN ÚLCERAS CRÓNICAS DE PACIENTES CON PIE DIABÉTICO TRATADOS CON TRATAMIENTO CONVENCIONAL Y CON APLICACIONES TÓPICAS DE CULTIVOS DE LACTOBACILLUS PLANTARUM. Fernández D.¹; Cerezo R.²; Ferullo M.³; Olea L.⁴; Silva C.⁵; Valdecantos P.⁶; Ortiz Mayor M.⁷; Rotella M.⁸; Gobbato N.⁹; Ramos A.¹⁰; Rachid M.¹¹; Valdez J.¹²

Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Qca y Fcia, Universidad Nacional de Tucumán^{1,2}; Servicio de Ortopedia y Traumatología. Hospital Padilla. San Miguel de Tucumán^{3,4}; Cátedra de Bacteriología- Instituto de Microbiología- Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán⁵; Cátedra de Biología Molecular. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán⁶; Servicio de Anatomopatología. Hospital Padilla. San Miguel de Tucumán⁷; Cátedra de Inmunología, Instituto de Microbiología, Facultad de Bioquímica, Qca y Fcia, Universidad Nacional de Tucumán^{9,10,11,12} <diegoasf@yahoo.com.ar>

Las úlceras de pie diabético son de difícil cicatrización. Aquí estudiamos comparativamente la efectividad entre el tratamiento convencional desbridamiento quirúrgico, by pass y antibioticoterapia y la aplicación tópica de cultivos de *Lactobacillus plantarum*, relacionándolo con la infección y con las células y factores que participan en la reparación tisular. Diecinueve pacientes con úlceras de pie diabético fueron randomizados en 2 grupos: 13 fueron tratados convencionalmente y 6 con la aplicación tópica de un cultivo de 10^5 L. *plantarum*/ml. Se siguieron clínicamente por 30 días y en biopsias de heridas tomadas al día 0 y 10 de tratamiento se realizó: a) Estudios bacteriológicos b) Estudios inmunohistoquímicos para endotelio: anti-humano CD34 y CD31 y anti-Actina. c) Citometría de flujo con anti-CD45, anti-CD34, anti-CD133 y RIL-8. d) PCR para TGF- β 1 e IL-8. Resultados: El tratamiento convencional no produjo modificaciones clínicas, bacteriológicas (UFC/g de tejido= $9,08 \times 10^7$) o de citometría (CD34= $1,5\%$, CD133= $0,08\%$). Los tratados con L. *plantarum* presentaron grado de granulación y disminución en las UFC (día 0= $17,3 \times 10^6$ día 10= $1,91 \times 10^3$) por lo que recibieron autoinjerto de piel; aumento de la expresión del CD34= $18,0\%$. No hubo modificaciones en RIL-8= 22% . Histológicamente en los pacientes tratados y curados los vasos son mas maduros que en el resto de los pacientes (no curados), aunque esto no reflejó diferencias en

el análisis inmunohistoquímico de las células de dichos vasos. Cuatro de los pacientes tratados con L. *plantarum* (66,7%) curaron. Dos rechazaron el injerto con recurrencia de la afección. El tratamiento con L. *plantarum* reduce la infección de las heridas con aparición de tejido de granulación y expresión de TGF- β 1, con una importante porcentaje de cicatrización. Se está profundizando el estudio, ampliando el número de pacientes.

PREMIO MONTUORI-FUNDACION GADOR

012. (31) LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR LA EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE VMP1 (VACUOLE MEMBRANE PROTEIN 1) PREVIENE LA SEVERIDAD DE LA PANCREATITIS AGUDA MEDIANTE LA DEGRADACIÓN SELECTIVA DE GRÁNULOS DE ZIMÓGENO. Grasso D.¹; Ropolo A.²; Lo Ré A.³; Boggio V.⁴; Vaccaro M.⁵

Dpto. de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1,2,3,4,5} <daniel.grasso@gmail.com>

La autofagia es un proceso degradativo y la única vía celular capaz de degradar organelas completas. VMP1 es una proteína de autofagia inducida por la pancreatitis aguda (PA) que gatilla la formación de autofagosomas. Los eventos celulares tempranos durante la PA incluyen activación de zimógenos y formación de vesículas autofágicas. El objetivo fue evaluar el rol de la autofagia mediada por VMP1 durante la PA experimental. Desarrollamos un ratón transgénico (TG) que expresa VMP1-EGFP en páncreas exocrino. Se generó PA por Caerulein (Cae $50 \mu\text{g}/\text{Kg}$). La microscopia electrónica de páncreas de TG tratado con Cae presentó autofagosomas con gránulos de zimogenos en su interior. Utilizando beads magnéticos y anticuerpo anti-GFP aislamos específicamente autofagosomas conteniendo gránulos de zimogeno del sobrenadante posnuclear. La colocalización inmunofluorescente del marcador autofágico LC3 en vesículas positivas para tripsina corroboró la autofagia de gránulos de zimógeno. Mediante un sustrato fluorescente de tripsina en acinos pancreáticos aislados tratados con Cae observamos temprana activación de tripsinógeno en el WT mientras que el TG evidenció poca tripsina activa y restringida a puntos específicos que colocalizaron con VMP1. Dos inhibidores de autofagia revertieron este efecto, confirmando que los gránulos de zimógeno afectados son degradados por un proceso autofágico selectivo -zimofagia-. Finalmente, evaluamos la relevancia fisiológica de la zimofagia en PA. El TG presentó menos edema y hemorragia en páncreas y menor amilaseemia y lipaseemia ($p < 0.001$ vs WT). El páncreas TG presentó significativa disminución del porcentaje de infiltrado y de la actividad de MPO ($p < 0.001$) y reducción del área necrótica ($p < 0,001$). Los Resultados muestran que la autofagia mediada por VMP1 degrada selectivamente gránulos de zimogeno activados reduciendo la severidad de la pancreatitis. Este estudio identifica una función crítica de la autofagia en la respuesta celular a la enfermedad.

013. (201) DEMOSTRACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROFINA (TRH), EN EL DESARROLLO DE HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA (HVI) DE LA RATA UTILIZANDO UN SISTEMA DE SOBREENPRESIÓN E INHIBICIÓN IN VIVO. Schuman M.¹; Landa M.²; Peres Diaz L.³; Imperiale J.⁴; Alvarez A.⁵; Copa V.⁶; Finkielman S.⁷; Pirola C.⁸; Garcia S.⁹

Cardiología Molecular - Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari - IDIM - Conicet^{1,2,3,4,5,6,7,8,9} <marianoschuman@yahoo.com.ar>

Se ha sugerido que la TRH cardiaca participa en el desarrollo de HVI sin definir su rol. Demostramos que el sistema de TRH esta hiperactivado en el ventrículo izquierdo (VI) hipertrofiado de la rata SHR vs WKY con aumento de TRH, su mRNA (pre-TRH) y receptor. Resultados propios en células cardiacas sugieren una acción promotora del daño, con aumento de apoptosis y fibrosis.

Para confirmarlo, inhibimos el sistema en el corazón de SHR durante su desarrollo usando RNA de interferencia (2 oligos iRNA-TRH contra pre-TRH y 2 oligos iRNA-c (control)). Animales SHR machos (n=8/grupo) fueron inyectados por vía intracardiaca en el VI con iRNA-TRH o iRNA-c (40 µg c/15 días a partir de 8s de edad hasta la semana 16). Cada semana se registró peso corporal y PA. A las 16s se pesó el corazón y se extrajo VI, VD, aurículas y septum. El iRNA-TRH disminuyó el mRNA del pre-TRH y su contenido en el VI (p<0,03). El grupo SHR+iRNA-TRH no presentó aumento en el índice de hipertrofia y presentó menor expresión de colágeno y de BNP vs las SHR+iRNA-c (p<0.03). Estudios anatomopatológicos mostraron espesor del VI normal en las SHR+iRNA-TRH y disminución en la fibrosis, con un tamaño de fibras miocíticas comparable al de WKY (p<0,05). Por otro lado, sobreexpresamos este sistema en ratas wistar de 18s (n=6/grupo) utilizando 100 µg de un plásmido PCMV-TRH o 100 µg de PcDNA3 (control) por vía intracardiaca en VI. Se observó un aumento en el mRNA del pre-TRH y su contenido en el VI del grupo PCMV-TRH vs el PcDNA3 (p<0,04). El grupo PCMV-TRH presentó una mayor expresión de colágeno y de beta MHC (p<0,04) vs las PcDNA3, sin observarse al sacrificio cambios en el índice de hipertrofia. La sobreexpresión de TRH en el VI de la rata normotrófica adulta aumento la expresión de genes marcadores de hipertrofia. Asimismo, la sola inhibición del sistema de TRH en el corazón de la SHR desde edad temprana impidió el desarrollo de HVI, demostrando que la TRH participa en el desarrollo de esta patología cardíaca.

PREMIO LEONARDO SATZ

- 014. (49) EFECTO INMUNOMODULADOR DE LA EXPOSICIÓN CUTÁNEA A RADIACIÓN UV.** Weill F.¹; Cela E.²; Ferrari A.³; Leoni J.⁴; Gonzalez Maglio D.⁵

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{1 2 3 4 5} <fweill@ffybu.uba.ar>

En los últimos años se han estudiado las alteraciones provocadas por la radiación UV sobre el sistema inmune, sin profundizar en los mecanismos subyacentes. Se decidió evaluar el efecto de la exposición cutánea a la radiación UV sobre distintos parámetros del sistema inmune, tanto de forma local como sistémica. Se emplearon 2 esquemas de irradiación en ratones alopécicos SKH:HR1. Uno agudo (IA), 100 mJ/cm²/día por 4 días, y otro crónico (IC), 50 mJ/cm²/día por 20 días. En el primero se sacrificaron 3 grupos de 5 animales, uno sin irradiar y otros dos 24 hs, y 8 días después de la última irradiación. En la IC se sacrificaron 5 animales 24 hs después de la última irradiación junto con 5 ratones no irradiados. Se determinaron en epidermis los porcentajes de células CD3+, CD4+, CD8+ y CD49+ por citometría de flujo. En ganglio inguinal y bazo se determinó la proliferación frente a concentraciones crecientes de Concanavalina A empleando MTT, y la producción de IL-4, IL-10 e en los sobrenadantes de cultivo, por ELISA. En ganglio inguinal, además, γIFN- se determinó el número total de células y el porcentaje de células CD3+, CD4+, CD8+ y CD49+. En la IC, además, se determinó la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales mediante fluorimetría. En cortes histológicos se midió el grosor de la epidermis y el diámetro arterial cutáneo. En la IA no se observaron mayores diferencias entre grupos. En la IC, el recuento celular, la concentración de IL-4 e IL-10 y el porcentaje de Linfocitos T CD4+ en ganglio fueron mayores en el grupo irradiado, mientras que la proliferación lo fue en el grupo control. En la epidermis se observó una disminución de células CD3+. La irradiación crónica induce un estado de desbalance inmunológico con un aumento en la producción de IL-4 e IL-10 en ganglio, lo que puede conducir a una situación de tolerancia inmunológica. Esto podría estar asociado al incremento en el número y en el porcentaje de células CD4+ en el ganglio aferente.

- 015. (262) INDUCCIÓN DE TOLERANCIA ORAL CON UN PÉPTIDO HÍBRIDO DE LTB Y EL DOMINIO C DE SINAPSINA EN LA EAE: SUPRESIÓN DE LA ENFERMEDAD, INDUCCIÓN DE TREG FUNCIONALES Y MODULACIÓN DEL BALANCE DE CITOQUINAS.** Scerbo M.¹; Bibolini M.²; Roth G.³; Monferran C.⁴

Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba CIQUIBIC- Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas UNC^{1 2 3 4}. <jscerbo@fqq.unc.edu.ar>

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el perfil de citoquinas y las poblaciones de células T CD4+ inducidas por un protocolo de tolerancia oral utilizando una proteína de fusión (LTBSC) entre la subunidad B de la toxina lábil al calor de E. coli (LTB) y el dominio C de sinapsina (SC) en la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es una enfermedad demielinizante autoinmune mediada por células T CD4+ autorreactivas contra epítopes de la proteína básica de mielina. LTB es usada como vehículo para dirigir antígenos al GALT y modular respuestas agresivas contra antígenos propios. Ratas Wistar de 35 días fueron alimentadas oralmente con 4 dosis de 10 µg LTBSC, una mezcla equimolar de LTB+SC o vehículo, los días 10, 8, 6 y 4 previos a la inducción de la EAE. Se extrajeron células mononucleares (CMN) de nódulos linfáticos mesentéricos, ganglios inguinales y de bazo de los animales tratados previo a la inducción de la EAE y durante el periodo agudo de la enfermedad. Se analizó la producción de IL-4, IL-10, TGF-β e INF-γ en los sobrenadantes de CMN. Estas células también fueron marcadas con anticuerpos contra CD4, CD25 y FoxP3, y se analizaron las poblaciones regulatorias. Se aislaron células CD4+CD25+ (Treg) y CD4+CD25- (Teff) para realizar cocultivos en presencia de PBM o IL-2+ aCD3. El tratamiento oral con LTBSC produjo un aumento significativo de células CD4+CD25+FoxP3+ y de los niveles de IL-4, IL-10 y TGF-β y una disminución de INF-γ previo a la inducción de la EAE y luego de la inducción durante el período agudo. Estos cambios estuvieron acompañados de una disminución en la incidencia de la enfermedad del 50% con respecto al grupo control. Las células Treg aisladas de estos animales suprimieron la proliferación de células Teff en presencia de ambos estímulos, demostrando la capacidad supresora de la población regulatoria inducida por el tratamiento con LTBSC.

- 016. (191) CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE DIFENILDISELENIURO EN CULTIVOS DE MACRÓFAGOS Y EFECTO EN LA INDUCCIÓN DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL.** Rupil L.¹; Chanaday Ricagni N.²; Roth G.³; Fabro De Bem A.⁴

CIQUIBIC-Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba^{1 2}; CIQUIBIC-Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba; Centro de Ciencias Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil³; Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil⁴ <lurupil@hotmail.com>

Diversos compuestos organoselénicos presentan capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Entre ellos, se utilizó el difenildiseleniuro (DFDS) para evaluar su capacidad antioxidante in vitro en cultivos de macrófagos (Mφ), células responsables del estallido respiratorio. Para ello se obtuvieron Mφ peritoneales de ratas Wistar y se los cultivó en presencia de DFDS. Se encontró que esta droga presenta toxicidad en cultivos de células no estimuladas, pero este efecto se revierte al inducir su activación mediante lipopolisacáridos. Asimismo, DFDS indujo una reducción de manera dosis dependiente en la producción de óxido nítrico en los cultivos de células en estado basal y activado. Además, se observó una tendencia a disminuir los niveles del anión superóxido. Por último, al evaluar la actividad de la enzima

arginasa como parámetro de actividad antiinflamatoria, se encontró una disminución dosis dependiente de la misma. Por otro lado, en la Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), Mf infiltrantes y microglia son las principales células efectoras del daño mediante la producción de citocinas, quimiocinas, especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Teniendo en cuenta los Resultados in vitro, se estudió el potencial de DFDS como terapia preventiva de la EAE. Para ello se administró DFDS vía oral por intubación gástrica en ratas Wistar previo a la inducción de la enfermedad por inmunización con mielina bovina en adyuvante de Freund completo. Los Resultados del análisis clínico mostraron un efecto supresor de la enfermedad, con disminución de la incidencia (54% vs. 90%), duración y severidad, sin poseer efectos tóxicos. Concomitantemente se observó una disminución de la respuesta de DTH y de la proliferación de CMN anti-proteína básica de mielina (PBM), y una mayor reactividad del suero anti-PBM, sugiriendo un cambio de respuesta Th1 a Th2, lo que nos lleva a proponer la posible aplicación del DFDS en el tratamiento de enfermedades autoinmunes inflamatorias.

- 017. (595) EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA MIGRATORIA DE LOS LINFOCITOS T DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC) INDUCIDA POR LAS QUIMIOCINAS CXCL12, CCL19 Y CCL21: SU ASOCIACIÓN CON LOS FACTORES DE MAL PRONÓSTICO ZAP-70 Y CD38.** Borge M.¹; Nannini P.²; Morande P.³; Zanetti S.⁴; Galletti J.⁵; Vijnovich A.⁶; Sánchez Avalos J.⁷; Bezares F.⁸; Giordano M.⁹; Gamberale R.¹⁰

Academia Nacional de Medicina¹; IHema, Academia Nacional de Medicina^{2 3 4 5}; Centro de Patología y Citología (CEPACIT)⁶; Instituto Alexander Fleming⁷; Hospital Alvarez⁸; IHema, Academia Nacional de Medicina; Departamento de Microbiología y Parasitología, Fac Medicina, UBA^{9, 10}. <mercedesborge@hotmail.com>

Los linfocitos B leucémicos de los pacientes con LLC proliferan en ganglios y médula ósea gracias al contacto con linfocitos T (LT) y el estroma productor de CXCL12, CCL21 y CCL19. Los pacientes cuyas células leucémicas expresan ZAP-70 y/o CD38 suelen morir a los pocos años del diagnóstico, mientras que los negativos para dichos marcadores conviven con una enfermedad indolente. Anteriormente demostramos que los LT de los pacientes ZAP-70- migran significativamente menos que los LT de los pacientes ZAP-70+ en respuesta a CXCL12. En este trabajo nos propusimos: a) estudiar comparativamente la migración inducida por CXCL12, CCL21 y CCL19 de LT normales y de pacientes LLC y b) comprender las causas de la distinta migración hacia el CXCL12 de los LT de los LLC ZAP-70+ y ZAP-70-. Realizamos ensayos de quimiotaxis con LT de pacientes LLC (n=31) y dadores normales (n=22) y encontramos que los LT de los pacientes migran menos en respuesta a las tres quimiocinas (p<0,001) a pesar de expresar niveles similares de sus receptores. No encontramos diferencias en la migración de los LT hacia CCL21 y CCL19 en los pacientes segregados por ZAP-70 y CD38. La menor migración hacia CXCL12 de los LT de los pacientes ZAP-70- (p=0,002) parece depender de señales brindadas por el propio clon leucémico (n=10, p=0,002). Por otro lado, no se asoció con una menor expresión de sus receptores, un defecto particular en la endocitosis del CXCR4 o en la polimerización de actina, así como tampoco con una menor expresión en esos LT de CD45, CD38 o ZAP-70. La menor respuesta de los LT a CCL21 y CCL19, contribuiría a la defectuosa respuesta inmune celular característica de estos pacientes. Por otro lado, el hecho de que los LT ZAP-70- migren menos en respuesta al CXCL12 podría implicar un menor ingreso de estas células hacia los ganglios y la médula ósea, favoreciendo que las LLC reciban menos señales de proliferación y permitiendo que estos pacientes desarrollen una enfermedad menos agresiva.

- 018. (269) INDOLEAMINE ^{2,3}-DIOXIGENASE (IDO) IS ESSENTIAL FOR THE CONTROL OF T. CRUZI AMASTIGOTE GROWTH IN MACROPHAGES.** Knubel C.¹; Martínez F.²; Díaz Luján C.³; Fretes R.⁴; Motrán C.⁵

Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba^{1 2}; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba^{3 4}; Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba⁵. <knubel@fcq.unc.edu.ar>

Resistance to T. cruzi infection is dependent on the capacity to generate IFN- γ and TNF which can activate macrophages (Mo) to produce the microbicidal product nitric oxide (NO) by NO synthase (iNOS). In addition, these proinflammatory cytokines are able to induce IDO activity in Mo. IDO is an intracellular enzyme that catalyses the initial step of tryptophan (Trp) catabolism leading to the production of immunoregulatory catabolites, collectively called "kynurenines". Depletion of Trp and the production of "kynurenines" are responsible for the activities observed after IDO induction including inhibition of intracellular pathogens replication and lymphocyte proliferation and Treg induction. We demonstrated that in vivo IDO blockade impairs the resistance of mice to T. cruzi infection. To study the effect of IDO activity on the regulation of intracellular T cruzi growth, we used murine bone marrow derived Mo. IDO blockade by 1-MT resulted in a strong induction of parasite growth. Trp supplementation promoted T. cruzi replication but to levels that were lower than those observed in 1-MT-treated cultures. Moreover, the supplementation with the kynurenine (Kyn) downstream metabolite 3-HK but not Kyn, 3-HAA or QA inhibited the intracellular parasite replication. However, 3-HK, 3-HAA and QA were all able to reduce the intracellular parasite replication in cultures with 1-MT. We also observed that 3-HK acted by a direct trypanocidal activity rather than by inducing Mo activation. To study the contribution of inducible IDO and iNOS to control T. cruzi replication, Mo were cultured in medium alone or containing IFN- γ plus LPS for 24 h and then infected. The activation with INF- γ plus LPS resulted in iNOS and IDO activity up-regulation and a strong inhibitory effect of parasite growth that was reversed in presence of 1-MT. IDO activity, through the production of Trp catabolites, is essential for the control of T. cruzi replication in Mo.

CARDIOVASCULAR 1

- 019. (180) MASA VENTRICULAR IZQUIERDA INAPROPIADA EN JOVENES: ESTUDIO DE LA PREVALENCIA Y CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN VENTRICULAR.** Escudero E.¹; Pinilla O.²; Ennis I.³

Centro de Investigaciones Cardiovasculares^{1 2 3} <emescu@gmail.com>

Introducción: el concepto de masa ventricular izquierda inapropiada (Mi) ha sido recientemente incorporado a los efectos de diferenciar entre aumentos de masa ventricular izquierda (MVI) fisiológicos o patológicos en individuos hipertensos. Sin embargo se conoce menos sobre su significación en la población general. Por lo tanto este estudio fue planificado para evaluar su prevalencia y las características de la función del ventrículo izquierdo (VI) en un grupo de jóvenes estudiantes universitarios. Material y Métodos: en 413 (147 varones) alumnos de medicina de la UNLP (20.6 \pm 0.1 años) se determinó peso, talla, presión arterial y se realizó un ecocardiograma con un equipo SonoSite Micro-Maxx. Se obtuvo la MVI y se calculó la Mi según De Simone y col (Hypertension, 1998; 31: 1077). La función sistólica (FS) circunferencial y longitudinal del VI fue evaluada por el acortamiento medio ventricular y la velocidad pico sistólico del anillo mitral

respectivamente; la función diastólica (FD) se estudió analizando las velocidades del flujo mitral y del anillo mitral. Resultados: 27 (6.5%) alumnos presentaron Mi. La edad, el peso, la talla, la proporción de mujeres y la presión arterial fueron similares entre los jóvenes con Mi y MVI apropiada (Ma). El índice de MVI (Mi: $92.4 \pm 4 \text{ g/m}^2$ - Ma: $67.8 \pm 0.67 \text{ g/m}^2$ - $p < 0.01$) y el espesor relativo de la pared (Mi 0.43 ± 0.01 -Ma 0.37 ± 0.01 - $p < 0.01$) resultaron superiores en los sujetos con Mi. La FS circunferencial (Mi: $93.6 \pm 5\%$ -Ma: $101.6 \pm 0.03\%$ - $p < 0.03$) y longitudinal (Mi: $21.4 \pm 1.6 \text{ cm/seg}$ -Ma: $24.7 \pm 0.04 \text{ cm/seg}$ - $p < 0.05$) fue menor en el grupo con Mi. La FD resultó similar en ambos grupos. Conclusión: la Mi fue detectada en el 6.5% de la población estudiada, observándose un comportamiento precoz de la FS en este grupo, sugiriendo que la misma forma parte de un mecanismo de adaptación patológico aún en etapas tempranas de la vida

020. (81) ROL DE LOS ESTEROIDES OVARICOS PROGESTERONA Y ESTRONA SOBRE ALTERACIONES VASCULARES INDUCIDAS EN PROCESOS INFLAMATORIOS. Cutini P.¹; Rauschemberger M.²; Massheimer V.³

Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur; CONICET^{1 2 3} <pcutini@uns.edu.ar>

La inducción de moléculas de adhesión en células endoteliales (CE), estimulación de la apoptosis y migración de células musculares lisas vasculares (CMLV), son respuestas del lecho vascular en situaciones de estrés oxidativo o inflamación. Estos eventos son regulados por numerosos factores y hormonas, entre ellas los esteroides sexuales. El objetivo fue investigar el efecto de progesterona (Pg) y estrona (E1) sobre los procesos celulares mencionados en cultivos primarios de CE y CMLV murinos. Se estudió el efecto de Pg y E1 sobre apoptosis midiendo fragmentación de ADN (geles de agarosa o marcación con [3H]-timidina). El tratamiento con Pg 10nM indujo una mayor fragmentación respecto al control (55%, 88% ADN fragmentado/total; Control, Pg; $p < 0.05$), mientras que no se observaron cambios con E1 10nM. El inductor de apoptosis H_2O_2 (1mM) produjo la máxima fragmentación. Si las células se tratan con E1 previo al agregado del H_2O_2 , este efecto se revierte parcialmente (92%, 45% ADN fragmentado/total; H_2O_2 , E1+ H_2O_2 ; $p < 0.05$). El tratamiento con Pg no modifica la acción del H_2O_2 . Empleando la técnica de RT-PCR se evaluó el efecto de E1 y Pg sobre los niveles de ARNm de las moléculas de adhesión VCAM-1, P-selectina y E-selectina en CE. Como control de expresión se usó GAPDH. Las CE se trataron 24 h con el agente proinflamatorio LPS (lipopolisacárido bacteriano), E1 o Pg. El LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) elevó los niveles de ARNm de las moléculas estudiadas (3 veces/basal), mientras que el tratamiento con E1 y Pg no exhibe cambios respecto al control. En presencia de las hormonas se suprime el efecto del LPS. Realizamos ensayos de migración para estudiar si las hormonas afectan la movilidad de CMLV. Tratamientos con Pg o E1 estimularon significativamente la migración (105 ± 9 ; 264 ± 22 ; 240 ± 18 células/campo, C; E1; Pg, $p < 0.001$). Estos Resultados muestran una acción diferencial y selectiva de E1 y Pg sobre los procesos de apoptosis, migración celular e inducción de moléculas de adhesión en tejido vascular.

021. (225) EFECTOS DE LA SOBREEXPRESIÓN CARDÍACA DEL RECEPTOR AT¹ DE ANGIOTENSINA II COMPLETO Y MUTADO SOBRE LA MORTALIDAD TEMPRANA EN RATONES TRANSGÉNICOS. Matorra L.¹; Rey Deutsch A.²; Donato M.³; Casanova V.⁴; Cicale E.⁵; Lightowler C.⁶; Pidal G.⁷; Morales C.⁸; Basso N.⁹; Gelpi R.¹⁰

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3}; Bioterio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.^{4 5}; Area de Patología Quirúrgica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.^{6 7}; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{8 9 10} <f_matorra@hotmail.com>

Es conocido que el incremento en la activación del receptor AT1 (RAT1), así como su sobreexpresión a nivel cardíaco aumentan la incidencia de muerte súbita (Hein y col, PNAS, 94:6391-6396,1997). Sin embargo, no es conocido, si la mortalidad esta uniformemente distribuida a lo largo de la vida, y si existe vinculación de la misma con las diferentes vías de señalización del RAT1. El objetivo fue determinar la función ventricular, las alteraciones electrocardiográficas y la sobrevida en dos modelos de ratones transgénicos 1) con sobreexpresión cardíaca específica del RAT1 completo (Grupo [G] 2, G2); y 2) con sobreexpresión del RAT1 más una mutación específica que desacopla la proteína G (G3). Se utilizaron ratones no transgénicos como grupo control (G1). En G1 (n=7), G2 (n=5) y G3 (n=8) se realizaron electrocardiogramas de superficie y cateterismo cardíaco para evaluar la función ventricular izquierda (FV). Luego se sacrificó al animal y se le realizó autopsia. Se construyeron curvas de Kaplan Meier en G1, n= 92, G2, n=144, y G3, n=30. En G1 y G3 no se observó mortalidad, mientras que en G2 fue del 40% ($p < 0,05$ vs G1 y G3). La frecuencia cardíaca fue de $492 \pm 29 \text{ l/min}$ (G1), $300 \pm 24 \text{ l/min}$ (G2) ($p < 0,05$ vs G1) y $185 \pm 5 \text{ l/min}$ (G3) ($p < 0,05$ vs G1 y G2). El segmento PQ fue $44 \pm 3 \text{ mseg}$ (G1), 92 ± 3 (G2) ($p < 0,05$ vs G1) y en G3 no se midió debido a ausencia de ritmo sinusal. Se observó bloqueo aurículo-ventricular (BAV) de 2º grado en G2 y de 3º grado en G3. La FV sistólica y diastólica no presentó cambios significativos ni se observaron signos de insuficiencia cardíaca. El cociente peso del corazón (mg)/peso corporal (gr) fue de G1: $4 \pm 0,1$; G2: $4 \pm 0,3$; G3: $8 \pm 0,1$ ($p < 0,05$ vs G1 y G2). La sobreexpresión del RAT1 completo se asocia a la aparición de bradiarritmias e incremento significativo de la mortalidad, no vinculado a insuficiencia cardíaca. El desacople de la proteína G induciría hipertrofia y BAV de 3º, sin embargo, suprime la mortalidad temprana inducida por la sobreexpresión del RAT1.

022. (585) FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN CORAZÓN AISLADO DE CONEJO. Bombicino S.¹; Iglesias D.²; Zaobornyj T.³; Donato M.⁴; D'annunzio V.⁵; Gelpi R.⁶; Boveris A.⁷; Valdez L.⁸

Laboratorio de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3}; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{4 5 6}; Laboratorio de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{7 8} <sbombicino@ffy.uba.ar>

Hemos observado una regulación positiva de la actividad de NOS mitocondrial (mtNOS) de corazón de rata, como consecuencia de la exposición a la hipoxia. En dicha situación se ha descrito un efecto cardioprotector, siendo la concentración de NO en los cardiomiocitos el factor principal en la adaptación. El objetivo del trabajo fue estudiar la función mitocondrial ventricular (VI) en corazón de conejo expuesto a isquemia-reperfusión ex vivo. Los corazones fueron removidos y perfundidos según la técnica de Landendorff. Los grupos experimentales se dividieron en función del tiempo (min) de isquemia/reperfusión: 0/0, 15/0, 15/5 y 15/30. El consumo de O_2 tisular fue 17% y 41% menor luego de 5 y 30 min de reperfusión, respectivamente. Luego de 30 min de reperfusión y cuando se utilizó malato-glutamato, la respiración mitocondrial en estado 3 disminuyó un 18%, sin modificarse en el estado 4, llevando a una disminución del control respiratorio (5.4 a 4.7). Dicho efecto no fue observado cuando se utilizó succinato, sugiriendo un daño funcional del Complejo I. Las actividades de los complejos I-III, II-III y IV disminuyeron luego de 15 min de isquemia 28%, 16% y 16% respectivamente. Mientras que las actividades de los complejos II-III y IV retomaron los valores control luego de la reperfusión, la actividad del complejo I permaneció reducida. De la misma forma, la producción mitocondrial de NO disminuyó 35% luego de los 15 min de isquemia, y dicho efecto no se modificó con la reperfusión. Estos Resultados coinciden con la actividad funcional de mtNOS medida a través del consu-

mo de O₂, usando malato y glutamato: 58% (0/0), 37% (15/0), 23% (15/5) y 34% (15/30). Los datos obtenidos sugieren una asociación funcional entre el complejo I y la mtNOS, que lleva a un compromiso en el consumo de O₂ tisular, datos que se correlacionarían con la interacción molecular y funcional observada entre los complejos de la cadena respiratoria y la mtNOS.

023. (674) ANALISIS DE POLIMORFISMOS MTHFR (C^{677T}), ENOS (G^{894T}) Y ACTIVIDAD DE SOD Y GPX EN UNA POBLACIÓN CHAGASICA. Zumoffen C.¹; Lioi S.²; Ensínck A.³; Gerrard G.⁴; Corbera M.⁵; Turco M.⁶; Beloscar J.⁷; D'arrigo M.⁸

Area Química Analítica Clínica - Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR^{1 2 3 4 5 6}; Carrera de Cardiología Fac de Cs Médicas UNR⁷; Area Química Analítica Clínica - Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR⁸. <czumoffen@hotmail.com>

La enfermedad de Chagas es una patología progresiva, localizada y de evolución implacable. El individuo infectado puede permanecer asintomático hasta que la masa crítica del tejido cardíaco dañado comienza a evidenciar síntomas irreversibles de lesión miocárdica. Las variantes de MTHFR(C677T) y eNOS (G894T) pueden causar hiperhomocisteinemia y reducción de óxido nítrico endotelial. Enzimas como SOD y GPX controlarían el balance de producción de especies reactivas del oxígeno. El objetivo de este trabajo fue realizar un estudio descriptivo de las frecuencias alélicas (FA) de MTHFR(C677T) y eNOS(G894T) y las actividades de SOD y GPX, en pacientes chagásicos con (CconC n:9) y sin cardiopatía (CsinC n:8) comparados con controles sanos (CN n:98). Las muestras fueron reclutadas en forma aleatoria entre individuos que aceptaron participar previo consentimiento firmado. La caracterización molecular se realizó por PCR-RFLP. El análisis de la distribución de las FA para MTHFR (C677T), con un IC 95%, fueron CconC (C 0.848, T 0.152); CsinC (C 0.833, T 0.167) y CN (C 0.639, T 0.361). Para eNOS (G894T), CconC: (G 0.388, T 0.611); CsinC (G 0.312, T 0.687) y CN (G 0.742, T 0.261). Para comparar las frecuencias alélicas en las poblaciones estudiadas, se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal. Los Resultados mostraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados. El estudio estadístico se realizó por análisis de variancia a un criterio de clasificación, se aplicó Kruskal Wallis encontrándose diferencias significativas entre los grupos estudiados (p < 0.0001). El impacto metabólico de las variantes estudiadas se comportaría como factor de riesgo independiente, la presencia conjunta de tales polimorfismos podría potenciar el desarrollo de cardiomiopatía. Los datos presentados contribuirían a ampliar nuestro conocimiento molecular de la fisiopatogenia y conducir a mejorar el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad.

024. (78) EJERCICIO FÍSICO Y CX⁴³ VENTRICULAR: ROL DEL SISTEMA NERVIOSO SIMPÁTICO. Tiscornia G.¹; García-gras E.²; Moreta R.³; Amorena C.⁴

Colectora Gral Paz ⁵⁴⁴⁵, INTI, edificio n° 231 ^{2 3 4} <gi_pp@hotmail.com>

En individuos susceptibles el ejercicio físico puede producir arritmias y muerte súbita (MS) durante y luego del ejercicio. Por el momento se desconoce el mecanismo molecular que desencadena la MS. Estudios epidemiológicos demostraron que dentro de la población atleta que sufre MS, prevalecen los individuos con cardiomiopatías que muestran reducción per se de la expresión de Cx43. La Cx43 es la principal subunidad de las uniones gap, unión intercelular responsable de la transmisión del impulso cardíaco. En un modelo murino se reportó que la reducción de la Cx43 por debajo del 40% de la expresión normal genera vulnerabilidad a sufrir arritmias. Paralelamente, se reportó que durante un infarto de miocardio se produce una reducción de la Cx43 mediada por estimulación simpática (ES). Nosotros hipotetizamos que el ejercicio físico produce una reducción transitoria de la Cx43 mediada por ES. Trabajamos con ratones machos BALB/C no entrenados (RNE) y entrenados (RE) mediante natación. Medimos

la expresión de Cx43 a distintos tiempos de ejercicio en RE y RNE. En RE observamos reducción del ARNm de Cx43 a los 15 y 60 min de ejercicio; de la proteína a los 60 min. Los RNE mostraron reducción sólo del ARNm de Cx43 a los 90 min de ejercicio. Medimos la expresión de Cx43 en RE sometidos a 120 min de ejercitación y distinto tiempo de reposo post-ejercicio, comparado a RE control sin ejercitar. Observamos que la expresión de la Cx43 alcanzó al valor control a los 60 min de reposo post-ejercicio. Luego evaluamos el efecto del SNS sobre la expresión de la Cx43 durante el ejercicio. El tratamiento de RE con propanolol (inhibidor β-adrenérgico) previno la inhibición de Cx43 durante el ejercicio físico. Los Resultados indicarían que la actividad física produce una reducción transitoria de Cx43 mediante la ES. Este mecanismo podría explicar la ocurrencia de las MS durante y una hora luego de la ejercitación en individuos susceptibles.

025. (48) CONTROL HORMONAL DEL CANAL KV^{4.3} EN EL SÍNDROME DE BRUGADA. Argenziano M.¹; Moretta R.²; Amorena C.³; García Gras E.⁴

Centro de Estudios de Salud y Medio Ambiente (CESyMA) ECyT UNSAM^{2 3 4}. <margenziano@yahoo.com.ar>

El síndrome de Brugada (SB) se caracteriza por una irregularidad en el potencial de acción que genera eventos arrítmicos y muerte súbita sin anomalía estructural aparente. Su incidencia es mayor en hombres que en mujeres (9:1) y puede ser esporádico o hereditario. De acuerdo al modelo prevalente, la inestabilidad que conduce a generar los focos arritmogénicos se basa en un incremento de la corriente generada por el canal de potasio Kv4.3 principalmente en el epicardio del ventrículo derecho. Se reportaron 2 reversiones del SB en pacientes castrados como parte de un tratamiento para el cáncer de próstata. La T en sangre de los pacientes de Brugada es significativamente más alta que en los controles. Es aparente que la T juega un rol importante en el desarrollo de la enfermedad. Nuestra hipótesis es que la T puede controlar los niveles de expresión de Kv4.3 y proponemos que al disminuir la actividad del receptor de andrógenos (AR) debería disminuir la expresión de Kv4.3 previniendo la generación de arritmias. Proponemos analizar la expresión de Kv4.3 en el miocardio de 4 grupos de ratones machos BALB/c: Control, tratados con dihidrotestosterona (DHT), tratados con Finasteride (inhibe parcialmente la síntesis de DHT, un derivado de la T más potente de la activación del AR) y tratados con Flutamida (inhibidor competitivo del AR). Hemos observado una disminución significativa de la expresión de Kv4.3 al tratar ratones con Finasteride tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico. Los canales control (SCN5A y Cacn1c) no mostraron variaciones ante los distintos tratamientos y el control positivo (intercambiador Na/Ca) mostró el aumento previamente descrito en su expresión ante el tratamiento con DHT. Estos Resultados demuestran la relevancia de la T en el control de la expresión del canal Kv4.3 y nos permite proponer el estudio del Finasteride en un modelo animal del SB.

INMUNOLOGÍA 1

026. (727) EVALUACIÓN DE LA HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA DE INMUNOGLOBULINAS PERMITE DEFINIR SUBGRUPOS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE (IDCV). Almejun M.¹; Bernasconi A.²; Rossi J.³; Roig A.⁴; Oleastro M.⁵; Galicchio M.⁶; Zelazko M.⁷; Danielian S.⁸

Hospital Nacional de Pediatría Prof Dr Juan P Garrahan^{1 2 3 4} ⁵; Hospital de Niños V J Vilela⁶; Hospital Nacional de Pediatría Prof Dr Juan P Garrahan^{7 8}. <mbalmejun@gmail.com>

Las IDCVs son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por: hipogamaglobulinemia, producción defectuosa de anticuerpos específicos y susceptibilidad a infecciones recurrentes. El nivel en plasma de IgG tiene bajo valor predictivo de la severidad de IDCV. Nuestro objetivo es evaluar aspectos cualita-

tivos de los anticuerpos producidos en 20 pacientes IDCV de comienzo pediátrico, a través de la capacidad de los linfocitos B para realizar SHM y correlacionarla con el fenotipo B. La SHM es esencial para la producción de anticuerpos de alta afinidad. Estudiamos la capacidad in vivo de realizar SHM a través de dos ensayos: uno utilizando DNAcopy y analizando un "hot spot" en cadena liviana kappa de Ig (REHMA) y el otro evaluando regiones variables de cadena pesada de Ig (IGH-SHA). REHMA distinguió tres grupos en nuestros pacientes: <16%, 16%-57% y >66%, considerando 100% de SHM a los valores obtenidos en controles sanos. IGH-SHA, también permitió distinguir tres posibles grupos mediante análisis de la perturbación de los datos respecto a la distribución gaussiana observada en controles. Todos los pacientes mostraron un porcentaje normal o elevado de linfocitos B "naive" (CD27-). Pacientes con SHM defectuosa presentan a su vez un número bajo (< 2%) de linfocitos B "memoria con switch". Pacientes con valores significativos de células B de memoria (> 5%) muestran mayor expresión de Ig con SHM. Estos linfocitos B de memoria son en su mayoría IgM+IgD+CD27+. En conclusión, la población de nuestros pacientes pediátricos IDCV es heterogénea en cuanto a la capacidad de generar una SHM normal. Distinguimos un grupo con valores cercanos a los normales en los que proponemos que la vía está conservada; mientras que otro presenta alterada la SHM en correlación con defectos en el proceso de cambio isotípico de Ig. Estos estudios funcionales permiten definir nuevos subgrupos de pacientes pediátricos IDCV orientando a futuros estudios de localización de defectos génicos.

- 027. (405) INMUNOGLOBULINAS DE YEMA DE HUEVO: PREVENCIÓN DE DIARREAS POR ROTAVIRUS Y MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE SISTEMICA Y DE MUCOSAS EN UN MODELO TERNERO.** Vega C.¹; Bok M.²; Chacana P.³; Garaicoechea L.⁴; Rodríguez D.⁵; Saif L.⁶; Terzolo H.⁷; Fernández F.⁸; Parreño V.⁹

Grupo de Virus Gastroentéricos, Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar^{1, 2, 3, 4, 5}; Food Animal Health Research Program, The Ohio State University, USA⁶; EEA INTA Balcarce⁷; Grupo de Virus Gastroentéricos, Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar^{8, 9} <vega@cni.inta.gov.ar>

Rotavirus (RV) es la principal causa de gastroenteritis severa y diarrea en numerosas especies animales, incluyendo al hombre. La estrategia protectora más eficiente es mantener altos niveles de anticuerpos en la luz intestinal. Suplementar la dieta con anticuerpos específicos de yema de huevo (IgY) es una opción promisoriosa. En este estudio, la dieta de terneros neonatos se suplementó con IgY anti RV con título final 1024 (n=2) o 4096 (n=4) durante los primeros 14 días de vida. Este tratamiento se comparó con una dieta suplementada con IgY no específica, con una dieta libre de anticuerpos y con una dieta suplementada con calostro (título de IgG1 anti RV 4096). La protección por el tratamiento se evaluó en términos de diarrea y excreción viral post desafío. El tratamiento IgY 1024 fue incapaz de prevenir la diarrea pero retrasó el inicio de la excreción viral. El tratamiento IgY 4096 previno la diarrea del 100% de los animales y 25% de ellos no presentó excreción viral. Los anticuerpos IgY específicos fueron detectados por ELISA en la materia fecal de los animales tratados, demostrándose que estas inmunoglobulinas logran llegar al intestino bovino biológicamente activas. En todos los grupos el duodeno fue el principal sitio de asentamiento de células secretoras de anticuerpos (CSAc) anti RV, siendo significativamente mayor en los grupos alimentados con IgY, independientemente de la especificidad del tratamiento. El perfil de coproanticuerpos del grupo IgY 4096 se distinguió por un pico de IgA a partir de los 7 días post desafío de mayor magnitud que el observado en los demás grupos, pero sin observarse diferencias significativas en el perfil de los demás isotipos estudiados. Suplementar la dieta de terneros neonatos en el período de máxima susceptibilidad a la infección por rotavirus con anticuerpos IgY específicos es una estrategia eficiente que induce altos niveles de protección contra la enfermedad sin interferir negativamente en la respuesta inmune de mucosas.

- 028. (321) OMP19S COADMINISTRADA COMO ADYUVANTE ESTIMULA LA PRESENTACIÓN CRUZADA E INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ ESPECÍFICOS PRODUCTORES DE IFN-GAMMA.** Coria L.¹; Ibañez A.²; Pasquevich K.³; Berguer P.⁴; Giambartolomei G.⁵; Cassataro J.⁶

Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas (UBA)¹; Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas (UBA); Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina^{2, 3}; IIBA, Fundación Instituto Leloir, CONICET⁴; Laboratorio de Inmunogenética. Hospital de Clínicas (UBA); Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina^{5, 6}. <loreacor@gmail.com>

Resultados previos demuestran que la porción proteica de la proteína de membrana externa de 19 kDa (Omp19S) de *Brucella* spp. al ser utilizada como adyuvante de ovoalbumina (OVA) induce una respuesta inmune celular T CD4+. En el presente trabajo decidimos estudiar su efecto sobre las células T CD8+. Para ello, se inmunizaron ratones C57BL/6 por vía i.d. con OVA coadministrada con: Omp19S, LPS o PBS. Luego se obtuvieron células de los ganglios y se utilizaron como fuente de células presentadoras de antígeno (Ag) cocultivándolas con células de ratones OT-1 (cuyas células T CD8+ expresan el receptor T específico para un péptido de OVA). El porcentaje de células OT-1 productoras de IFN-g es mayor cuando se utilizaron células del grupo inmunizado con Omp19S+OVA (0.77%) con respecto al grupo OVA (0.17%), evidenciando que Omp19S como adyuvante es capaz de aumentar la presentación cruzada de péptidos derivados del Ag a células CD8+. Para evaluar este fenómeno in vivo, se transfirieron células de ratones OT-1 marcadas con CFSE a ratones C57BL/6. Al día siguiente los animales fueron inmunizados por vía s.c. con OVA coadministrada con: Omp19S, Omp19SPK (proteína degradada), LPS o PBS y 5 días después se midió el porcentaje de células OT-1 CFSE+ que se dividieron. Omp19S como adyuvante induce un aumento en la proliferación de células T CD8+, mientras que Omp19SPK no lo hizo. También observamos que el porcentaje de células T CD8+ anti-OVA productoras de IFN-g es mayor en el grupo inmunizado con Omp19S como adyuvante (0.73%) en relación al grupo con OVA sin adyuvante (0.14%), mientras que la inoculación de OVA con Omp19SPK indujo un porcentaje similar al grupo con OVA sin adyuvante (0.15%), confirmando que el efecto adyuvante radica en la proteína. Estos Resultados indican que la coadministración de Omp19S induce presentación cruzada del Ag y por consiguiente también respuestas celulares T CD8+ in vivo.

- 029. (801) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS ARNm DE LAS ISOFORMAS ALFA Y BETA DEL RECEPTOR PARA GLUCOCORTICOIDES (GR) POR MEDIADORES DE LA RESPUESTA INMUNOENDÓCRINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES SANGUÍNEAS (PBMC) DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR (TB).** D'attilio L.¹; Trini E.²; Didoli G.³; Giri A.⁴; Bottasso O.⁵; Bay M.⁶

Instituto de Inmunología. Facultad de Cs Médicas. Universidad Nacional de Rosario.¹; Laboratorio de Estudios Moleculares, Genómicos y Anatomopatológicos.²; Instituto de Inmunología. Facultad de Cs Médicas. Universidad Nacional de Rosario.³; Catedra de Virología, IBR-CONICET, Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.⁴; Instituto de Inmunología. Facultad de Cs Médicas. Universidad Nacional de Rosario.^{5, 6}. <lucianodada@yahoo.com.ar>

Previamente demostramos que la relación entre los ARNm para GR α y GR β (qRT-PCR) en PBMC se encontraba significativamente aumentada en pacientes con TB Leve (Lev) y Moderada (Mod), sin modificaciones en TB Severa (Sev), respecto

de controles sanos (HCo). Esto sugirió cierto grado de resistencia a los glucocorticoides (GC) endógenos en TB Sev, ya que sólo el dímero de GR α es el factor de transcripción ligando dependiente que ejerce las funciones biológicas de los GC, mientras que la isoforma GR β actuaría como inhibidor de la acción del esteroide. La tuberculosis cursa con concentraciones elevadas de cortisol y citocinas proinflamatorias, y marcado descenso de dehidroepiandrosterona (DHEA) asociadas a la severidad. Nos propusimos investigar la relación entre los niveles plasmáticos de mediadores inmuno-endócrinos (TNF- α , IL-6, IL-18, IFN- γ , Cortisol, DHEA y DHEAS, por ELISA) y la expresión de los ARNm de GR α y GR β en 19 HCo y 28 TB (8 Lev; 12 Mod; 8 Sev), HIV(-), similares en sexo y edad. Los niveles de IL-6, IL-18, IFN- γ y Cortisol se vieron significativamente incrementados en Sev y Mod con respecto a HCo ($p < 0.05$), mientras que los de DHEA se vieron disminuidos ($p < 0.05$). En TB Lev IL-6 se asoció positiva y significativamente con GR α ($p < 0.01$), mientras que IFN- γ lo hizo con GR β ($p < 0.01$) en Sev. Con respecto a las hormonas, DHEA se asoció positivamente a GR α en Mod ($p < 0.01$) y Sev ($p < 0.01$), y a GR β sólo en Sev ($p < 0.05$). En este último grupo GR α se correlacionó positivamente con la relación Cortisol/DHEA ($p < 0.05$). Ante niveles bajos de DHEA las modificaciones en su concentración influirían en la forma activa del receptor (GR α), habida cuenta de un 90% de correlación tanto en Mod como en Sev. Las modificaciones puestas de manifiesto tanto en los niveles sistémicos de las citocinas como de las hormonas adrenales condicionarían la expresión del GR de manera diferencial y según el grado de afectación pulmonar.

031. (695) INTERLEUCINA-6 Y DISTURBIOS METABÓLICOS EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS HUMANA. Pérez A.¹; Pezzotto S.²; Silva-barbosa S.³; Villar S.⁴; Bonantini A.⁵; Revelli S.⁶; Beloscar J.⁷; Savino W.⁸; Bottasso O.⁹

*Instituto de Inmunología. Fac de Cs Médicas.^{1 2 3 4 5 6 7 8 9}
<villar_silvina@hotmail.com>*

El establecimiento de un estado inflamatorio crónico se ha asociado al desarrollo de anomalías metabólicas. Dado que la fase crónica de la Enfermedad de Chagas cursa con un estado inflamatorio sostenido, nos propusimos analizar si existía una relación entre el nivel de citocinas inflamatorias, cambios metabólicos y la severidad de la patología cardíaca. Se estudiaron individuos chagásicos crónicos (no diabéticos) clasificados como indeterminados (I, n=17) o casos con miocardiopatía chagásica crónica - MCC- leve (L, n=14) o severa (S, n=12) de acuerdo al ECG y controles sanos de características similares (Co=16). Se evaluaron las concentraciones plasmáticas de IL-6 y TNF-alfa (ELISA), insulina, cortisol (EQL) y glucosa (método enzimático). Estos parámetros se correlacionaron entre sí y con variables vinculadas al estado metabólico del paciente [índice de masa corporal (IMC, kg/m²) e índice HOMA (glucemia x insulina/22.5)], mediante coeficientes de Spearman (rs). Los niveles de TNF-alfa e IL-6 aumentaron con la severidad de la MCC [por ej. IL-6 (pg/ml, media±es) Co=2.0±0.2, LEV=3.2±0.5*, SEV=3.5±0.5* (* $p < 0.05$ vs. Co)]. El IMC, la glicemia, la insulina y el índice HOMA tendían a incrementarse a medida que aumentaba la severidad de la MCC, sin alcanzar significado estadístico. Los niveles de IL-6 se correlacionaron con los niveles de insulina ($rs=0.27$; $p < 0.05$), con el IMC ($rs=0.26$ $p < 0.05$), con el índice HOMA ($rs=0.24$; $p < 0.05$) y con TNF-alfa ($rs=0.24$; $p < 0.01$). Los niveles de TNF-alfa no se correlacionaron con las demás variables estudiadas, excepto IL-6. Estos Resultados refuerzan la presunción acerca de la existencia de anomalías inmunoendócrinas y metabólicas en los pacientes chagásicos, las que en su conjunto contribuirían al desarrollo de la MCC.

METABOLISMO Y NUTRICION 1

032. (110) INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE CALCIO DE LA DIETA SOBRE LA COMPOSICION MINERAL Y EL METABOLISMO ÓSEO EN RATAS GENÉTICAMENTE OBESAS,

DURANTE EL CRECIMIENTO. Marotte C.¹; Weisstaub A.²; Hernández E.³; González Chaves M.⁴; Pellegrini G.⁵; Olguin M.⁶; Posadas M.⁷; Zeni S.⁸; Portela M.⁹

Sección Osteopatías médicas. Hospital de Clínicas. UBA.¹; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires²; Sección Osteopatías médicas. Hospital de Clínicas. UBA.^{3 4 5}; Facultad de Ciencias Médicas, Rosario^{6 7}; Sección Osteopatías médicas. Hospital de Clínicas. UBA.⁸; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁹ <clarisa¹²⁸@hotmail.com>

Se ha descrito correlación genética y fenotípica entre obesidad y osteoporosis, sugiriendo que la ingesta de Ca jugaría un rol fundamental. La obesidad afectaría al metabolismo óseo, con mayores efectos durante el crecimiento. Objetivo: estudiar el impacto del contenido de calcio dietario sobre el crecimiento y metabolismo óseo, en ratas macho genéticamente obesas (IIMbb). Metodología: ratas adultas (IIMbb), se alimentaron desde la preñez con dietas según AIN 93, variando Ca: 0.9 g % (GA), 0,5% (GN) o 0.3% (GB). Las crías macho recibieron "ad libitum" las mismas dietas hasta 50 días de edad (Tf). Se registró consumo de dieta y peso corporal (PC). A Tf se determinó: cenizas (método AOAC); calcio (Ca) (espectrofotometría de Absorción atómica) y fósforo (P) (método de Gomori), en suero: fosfatasa alcalina ósea (FAO)(colorimetría); osteocalcina (BGP) y telopéptido C-terminal del colágeno tipo I (CTX)(ELISA). Los Resultados (X±DS) fueron, a Tf: peso corporal (g): GA: 161.6±17.6 vs GN: 220,7± 37,4 y GB 217.7±30.7 ($p < 0.01$), sin diferencias en el consumo de dieta. Cenizas (g/100 g rata): GA: 2.51±0.41 y GN: 2.42±0.24 vs GB: 1.88±0.26 ($p=0.0261$). Ca corporal (mg/100 g rata): GA: 732.5±146.9; GN: 678.1±55.3; GB: 541.8±62.8 (GA vs GB $p < 0.001$). P corporal (mg/100 g rata): GA: 552.4±86.1; GN: 538.5±57.8; GB: 382.4±32.3 (ns). Relación Ca/P: GA: 1.32±0.07; GN: 1.27±0.12; GB: 1.42±0.09 (ns). FAO (UI/L): GA: 184 ± 30; GN: 193 ± 39; GB:186 ± 27 (ns). BGP (ng/dl) GA: 279 ± 73; GN: 375 ± 46; GB: 478 ± 45 ($p < 0.001$). CTX (ng/dl) fue más elevado ($p=0.048$) en GA (87,0 ± 4,4) que en GN: 69,2 ± 11,7 y GB: 69,7 ± 3,3. Conclusiones: Estos Resultados sugieren que, en estas ratas genéticamente obesas, el aumento del Ca de la dieta produce disminución del peso corporal durante el crecimiento, acompañado por aumento en el contenido mineral del hueso y modificaciones en el remodelamiento óseo. UBACYT (2008-10) B 091.

033. (266) EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN PULMÓN, LUEGO DE UNA EXPOSICIÓN AGUDA A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. Magnani N.¹; Marchini T.²; Tasat, D.³; Álvarez S.⁴; Evelson P.⁵

PRALIB-CONICET, Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2} ; Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín³ ; PRALIB-CONICET, Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{4 5} <nmagnani@ffyb.uba.ar>

La exposición a contaminantes ambientales se caracteriza por producir en el pulmón un síndrome inflamatorio donde la producción de especies activas del oxígeno y la mitocondria podrían estar involucradas en el mecanismo molecular fisiopatológico. El objetivo de este trabajo fue estudiar el metabolismo oxidativo y la función mitocondrial en pulmón de ratones expuestos a partículas ambientales (ROFA), en un modelo de exposición aguda mediante instilación intranasal (0,20 mg/kg peso). Se determinaron, luego de 1 h de exposición, el consumo de oxígeno tisular y mitocondrial por una técnica polarográfica, la actividad de los complejos respiratorios I, II y IV en partículas submitocondriales por espectrofotometría y la actividad de la NADPH oxidasa en homogeneizados con dos métodos: producción de anión superóxido (O₂⁻) y consumo de NADPH. La exposición a ROFA produjo un aumento del 77% del consumo de oxígeno del tejido (control: 224 ± 8 ng-at O/min. g tej., $p < 0,01$). En mitocondrias aisladas aumentó un 19% en el estado 3 o de respiración activa (control: 107±4 ng-at O/min. mg prot., $p < 0,01$), sin observarse diferencias en el estado

4 o de reposo. La actividad de los complejos I, IV no presentaron cambios, en tanto que la actividad del complejo II aumentó un 35% en los animales expuestos a las partículas (control: 13 ± 1 nmoles/min. mg. prot. $p < 0,01$). La actividad de la NADPH oxidasa mostró aumentos significativos del 55% tanto al evaluarse la producción de O_2^- (control: $0,78 \pm 0,04$ UA/mg. prot. $p < 0,01$), como la velocidad de consumo de NADPH (control: $0,78 \pm 0,02$ nmoles NADPH/min. mg. prot. $p < 0,01$). El aumento del consumo de oxígeno tisular podría explicarse por el aumento en la actividad de la NADPH oxidasa y las alteraciones en el consumo de oxígeno mitocondrial en estado 3. Estos cambios podrían contribuir a la morbilidad y mortalidad observadas luego de la inhalación de contaminantes particulados.

034. (14) VARIANTES DEL GEN FAAH Y FENOTIPOS RELACIONADOS AL SÍNDROME METABÓLICO. BURGUEÑO A.¹; Sookoian S.²; Fernandez Gianotti T.³; Gemma C.⁴; Pirola C.⁵

Instituto de Investigaciones Medicas "Alfredo Lanari"-CONICET^{1 2 3 4 5} <adriburgue@gmail.com>

Los endocannabinoides (CB) aumentan la ingesta de alimentos y promueven la ganancia de peso. Su acción está limitada por la degradación intracelular realizada por la enzima hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH). Nos propusimos estudiar si una variante frecuente ubicada en la región promotora del gen FAAH, el SNP rs6703669-T/C (real time PCR alelo específica), se encontraba asociada a los fenotipos relacionados al síndrome metabólico en una muestra aleatoria ($n=422$) de una población de hombres adultos descendientes de europeos. En los controles, los genotipos se hallaron en eq Hardy-Weinberg (MAF: 24.2%). No encontramos evidencia de asociación entre la variante y fenotipos asociados a la obesidad (BMI, circunferencia de cintura, grasa corporal medida por bioimpedancia, etc). Cuando analizamos las variables de lípidos séricos en relación al rs6703669 observamos una asociación significativa del alelo T con los niveles de triglicéridos plasmáticos (TG): CC $105,1 \pm 5,9$, CT $131,3 \pm 7,5$ y TT $119,2 \pm 15,5$ mg/dl $p < 0,015$. La hipertrigliceridemia como variable discreta (TG = 150 mg/dl) también mostró una asociación significativa con la variante (OR por alelo T: 1,31 95% CI 1,04-1,66 $p < 0,022$). Por último, observamos una asociación significativa con la hipertensión arterial (como variable discreta): OR por alelo T: 1,43, 95% CI 1,06-1,95, $p=0,01$, luego de ajustar por el logaritmo del BMI y la edad. También, la presión arterial diastólica como variable cuantitativa se encontró significativamente asociada con la variante ($p < 0,023$): CC: $74,2 \pm 0,6$, CT: $76,2 \pm 0,7$ y TT: $78,1 \pm 1,7$ mmHg. Estos datos, son de interés debido a que FAAH esta bajo evaluación como blanco terapéutico para el tratamiento de la hipertensión, no sólo por el potencial efecto benéfico de las drogas relacionadas al sistema CB sobre la presión arterial, sino también sobre el desarrollo de hipertrofia cardiaca hipertensiva. Además, sugieren que variantes del FAAH no están asociadas a la regulación del peso corporal.

035. (104) ROL DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA EN LA INTERACCIÓN MONOCITO-ENDOTELIO. SANDOVAL M.¹; Rauschemberger M.²; Massheimer V.³

Cátedra de Bioquímica Clínica II, Dpto de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur; Unidad Básica Química, Dpto de Ciencias Básicas, UTN-Facultad Regional Bahía Blanca.¹; Cátedra de Bioquímica Clínica II, Dpto de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur; CONICET.^{2 3} <msandova@criba.edu.ar>

Los fitoestrógenos (FE) son suplementos dietarios importantes por su valor nutritivo y su potencial acción beneficiosa en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Dado que la infiltración leucocitaria en la pared arterial es uno de los procesos claves en la patología vascular, el objetivo del presente trabajo

fue evaluar los efectos del FE genisteína (Gen) en la interacción monocito-endotelio vascular. Se emplearon cultivos primarios de células endoteliales (CE) a partir de aorta de rata y monocitos aislados de sangre entera por gradiente de densidad. Se evaluó el efecto de Gen sobre la adhesión de monocitos a CE, cuantificándose por recuento celular. Se usó lipopolisacárido bacteriano (LPS) como inductor de adhesión. Gen inhibió significativamente la adhesión monocítica (267 ± 36 vs $160 \pm 9,8$ cel/ μ L, C vs Gen, $p < 0,001$). El efecto inhibitorio del FE (30-17%, $p < 0,01$) se registró a distintos tiempos de tratamiento (13-46 h). El tratamiento con LPS incrementó la adhesión en un 60%. Cuando las CE se trataron con Gen previo al agregado del LPS, se suprimió el estímulo inducido por el proinflamatorio ($417 \pm 21,5$ vs $237 \pm 17,8$ cel/ μ L, LPS vs Gen+LPS, $p < 0,001$). La adhesión de leucocitos al endotelio depende de la presencia de moléculas de adhesión celular (CAMs). Se empleó RT-PCR para investigar el efecto de Gen sobre los niveles de ARNm de las CAMs: VCAM-1, P-selectina y E-selectina. Las CE se trataron con Gen 10 nM y/o LPS 1μ g/mL ensayándose diferentes tiempos de tratamiento (4-48 h). LPS estimuló la expresión del ARNm de las 3 CAMs mientras que Gen las inhibió respecto al control. En concordancia con los Resultados de adhesión monocítica, cuando el tratamiento con LPS se realiza en presencia del FE se suprime su efecto, tanto si Gen se agrega antes (4h) o después del LPS. Se usó GAPDH como control de expresión. Los Resultados presentados sugieren que la Gen inhibiría la adhesión de monocitos al endotelio a través de la regulación de la expresión del ARNm de las CAMs.

036. (174) METABOLISMO OXIDATIVO CARDÍACO EN UN MODELO AGUDO DE EXPOSICIÓN A PARTÍCULAS AMBIENTALES. MARCHINI T.¹; Magnani N.²; Tasat D.³; Alvarez S.⁴; Evelson P.⁵

PRALIB - CONICET. Química General e Inorgánica, FFyB, UBA.^{1 2}; Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín, Buenos Aires.³; PRALIB - CONICET. Química General e Inorgánica, FFyB, UBA.^{4 5} <tmarchini@ffybu.uba.ar>

Estudios epidemiológicos muestran una correlación positiva entre los niveles de exposición a contaminantes ambientales particulados y los incrementos en la morbilidad y mortalidad por diversas afecciones cardiovasculares. Dicha exposición desencadena una respuesta inflamatoria que repercute en el sistema cardiovascular, donde la producción de especies activas del oxígeno y del nitrógeno podrían estar involucradas en el mecanismo molecular fisiopatológico. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la cinética del metabolismo oxidativo cardíaco, en ratones expuestos a partículas de contaminación ambiental. Se utilizó un modelo de exposición aguda mediante instilación intranasal (ROFA, 1,0 mg/kg peso), en ratones Swiss hembras de 20-25 g. Se evaluó el consumo de oxígeno en cortes de tejido por polalografía, la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en homogeneizados de corazón mediante Western Blot y la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales I, II y IV en partículas submitocondriales de corazón por métodos espectrofotométricos. Se observó una disminución del consumo de oxígeno en cortes de tejido del 21% 1 h luego de la exposición, y del 35% a las 3 hs (control: 1173 ± 43 ng-át O/min g tejido, $p < 0,01$). El consumo de oxígeno retornó a los niveles correspondientes para el grupo control a las 5 hs posteriores al tratamiento. La expresión de la iNOS disminuyó un 43% a las 3 hs (control: $0,54 \pm 0,04$ DO relativa, $p < 0,05$). La actividad de los complejos respiratorios mitocondriales, transcurridas 3 hs de la instilación, mostró una disminución del 25% para el complejo II (control: 87 ± 5 nmol/min mg prot, $p < 0,01$), sin cambios en los complejos I y IV. Los Resultados muestran una alteración del metabolismo oxidativo cardíaco, que afecta a la expresión de la iNOS y a la mitocondria, la cual podría encontrarse relacionada con los efectos adversos provocados por la exposición a contaminantes ambientales particulados.

TRANSDUCCION DE SEÑALES 1

- 037 (389) INTERACCIÓN ENTRE EL RECEPTOR A CANNABINOIDEOS TIPO I Y EL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES – RELEVANCIA DE LAS PROTEINAS G.**
Tubio M.¹; Shayo C.²; Davio C.³; Fitzsimons C.⁴; Monczor F.⁵

Cátedra de Química Medicinal - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA¹; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular - Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET²; Cátedra de Química Medicinal - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA³; Medical Pharmacology Department - Leiden/Amsterdam Center For Drug Research - Lacdr⁴; Cátedra de Química Medicinal - Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA⁵. <charotubio@yahoo.com.ar>

En la actualidad existen diversos reportes acerca de la interacción entre la señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y del Receptor a Glucocorticoides (GR), pero aún no han sido completamente esclarecidas. Por otro lado, recientemente ha sido reportado que las subunidades $\beta\gamma$ de la proteína G interactúan directamente con el GR atenuando su actividad. La expresión funcional del CB1R (Receptor a Cannabinoides tipo 1, un GPCR acoplado a Gi/o) y del GR en células de neuroblastoma murino N1E-115 ya ha sido descrita. Nuestro objetivo es determinar si ligandos agonistas y agonistas inversos del CB1R son capaces de modular la actividad pro-transcriptora del GR en células N1E-115 y si dichas subunidades $\beta\gamma$ están involucradas en tal proceso. Para ello, en células N1E-115 transfectadas de manera transiente con la construcción reportera TAT3-Luciferasa (consta de tres GRE fusionados al promotor mínimo y gen de Luciferasa de Drosófila), realizamos ensayos de concentración-respuesta (C-R) a Dexametasona (Dex) en presencia y ausencia de ligandos del CB1R, o frente a la sobreexpresión de distintas isoformas de subunidades β o γ (β_1 , β_2 , γ_2 , γ_5 y γ_{11}). Determinamos que la respuesta máxima a Dex disminuye un 37%, 30%, 75%, 39% y 23% en presencia de ACPA, CP55.940, HU210, AM251 y O-2050 respectivamente ($p < 0,05$). En este sistema, mediante la cuantificación del AMPc formado en ensayos de C-R, determinamos que ACPA, CP55.940 y HU210 se comportan como agonistas, y AM251 y O-2050 como agonistas inversos, del CB1R. De todas las isoformas de β y de γ evaluadas, sólo la sobreexpresión de γ_2 modifica la respuesta máxima a Dex significativamente (48% de disminución; $p < 0,0001$). Estos Resultados sugieren la existencia de una interferencia en la actividad del GR relacionada con la señalización evocada por los ligandos del CB1R, tanto agonistas como agonistas inversos, en la cual probablemente la modulación de los niveles de subunidades $\beta\gamma$ libres esté involucrada.

- 038. (376) ROL DEL RECEPTOR TIROSINA QUINASA ERBB2 COMO COACTIVADOR DE LA PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE SEÑALES Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN³ (STAT³) EN EL CRECIMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA PROGESTÁGENO-DEPENDIENTE.** Béguelin W.¹; Tocci J.²; Díaz Flaqué M.³; Proietti C.⁴; Rosembli C.⁵; Rivas M.⁶; Tkach M.⁷; Charreau E.⁸; Schillaci R.⁹; Elizalde P.¹⁰

*Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3 4 5 6 7 8 9}
¹⁰ <beguelin@dna.uba.ar>*

Varios trabajos, incluyendo los nuestros, han mostrado la existencia de interacciones cruzadas entre las hormonas esteroideas y las vías de señalización del ErbB2: las hormonas esteroideas son capaces de activar al ErbB2 y el ErbB2 puede activar a los receptores de hormonas esteroideas durante la proliferación del cáncer de mama. En este trabajo estudiamos la interacción entre el ErbB2 y Stat3 inducida por el acetato de medroxiprogesterona (MPA) y una posible funcionalidad de esta interacción en el desarrollo del cáncer de mama dependiente de progestágenos. Demostramos que el MPA induce una rápida activación y translocación nuclear del 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 progestágeno-dependiente. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y ChIP secuencial, mostramos que el MPA 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 progestágenos. Células C4HD y T47D transfectadas con una construcción del promotor de ciclina D1-luciferasa mostraron un aumento de la actividad transcripcional al tratarlas con MPA, que fue prevenido por la cotransfección con un dominante negativo de Stat3 o con una mutante del ErbB2 humano incapaz de translocar al núcleo (hErbB2DNLS). Por el contrario, la cotransfección con una mutante constitutivamente activa de Stat3 o la sobreexpresión de ErbB2, incrementaron la actividad transcripcional basal. Por último, observamos una fuerte disminución de la proliferación progestágeno-dependiente de células C4HD transfectadas con hErbB2DNLS, y una inhibición del 50% del crecimiento de tumores con estas células en ratones singenéticos. Con estos Resultados sugerimos que el complejo nuclear Stat3/ErbB2 promueve el crecimiento de tumores mamaros inducido por progestágenos, mediante un mecanismo en el cual ErbB2 actúa como coactivador de Stat3.

- 039. (406) ESTUDIO SOBRE LA MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES A TRAVÉS DEL USO DE ANÁLOGOS RÍGIDOS DE ESTEROIDES.**
Presman D.¹; Alvarez L.²; Levi V.³; Digman M.⁴; Veleiro A.⁵; Burton G.⁶; Pecci A.⁷

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Química Orgánica, FCEN-UBA, UMYMFOR-CONICET²; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³; Laboratory for Fluorescence Dynamics, Department of Biomedical Engineering, University of California, Irvine, California⁴; Departamento de Química Orgánica, FCEN-UBA, UMYMFOR-CONICET^{5 6}; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires; IFIBYNE-CONICET⁷ <diegopres@qb.fcen.uba.ar>

El receptor de glucocorticoides (GR) es una proteína modular que se expresa en la mayoría de las células de mamíferos e interviene en numerosos procesos fisiológicos. En ausencia de ligando, el GR localiza en el citoplasma mientras que en su presencia transloca al núcleo y regula la expresión génica mediante diversos mecanismos que involucran la interacción directa del complejo ligando/receptor al ADN o su unión a otros factores de transcripción. La existencia de múltiples acciones glucocorticoides llevó a postular la posibilidad de diseñar ligandos con actividades disociadas capaces de mantener los llamados efectos benéficos minimizando aquellos no deseados. Utilizando los agonistas Dexametasona y 21-hemisuccinato-6,19-OP; el antagonista RU486 y el glucocorticoide disociado 21-OH-6,19-OP, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar qué cambios conformacionales del complejo ligando/receptor influyen en su actividad transcripcional y en consecuencia en la respuesta glucocorticoide final. Si bien todos los esteroides utilizados inducen la translocación del GR, su distribución intranuclear no correlaciona con su actividad agonista o antagonista. Mediante la técnica N&B (Number and Brightness), que permite calcular el brillo de moléculas fluorescentes y así determinar su estado de agregación en una dada región de la célula, demostramos que el GR oligomeriza in vivo, independientemente del tipo de ligando con el cual está interactuando. Por otra parte, de acuerdo a ensayos de co-inmunoprecipitación, la naturaleza del ligando afecta la capacidad del GR de interactuar con el coactivador TIF-2. En particular, el complejo 21-OH-6,19-OP/GR es incapaz de unir TIF-2. En su conjunto demostramos que la interacción GR/TIF-2 no sería necesaria para la dimerización del receptor. La potencial relevancia farmacológica de 21OH-6,19OP estaría dada al menos por su capacidad de generar respuesta glucocorticoide a través de mecanismos independientes de dicho co-factor.

041. (454) COMPLEJO ENZIMÁTICO DE PROTEÍNAS QUINASAS Y FOSFATASAS MITOCONDRIALES EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE DE COLESTEROL EN LA ESTEROIDOGENÉISIS. Poderoso C.1; Duarte A.2; Castilla R.3; Paz C.4; Podestá E.5

IIMHNO, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA^{1 2 3 4 5} <cepoderos@yahoo.com>

Hemos demostrado la presencia de un complejo enzimático formado por las proteínas quinasas, PKA/MEK/ERK en la mitocondria de células esteroideogénicas. Este complejo, en presencia de colesterol, permite la fosforilación transitoria de ERK y de la proteína StAR (Steroidogenic Acute Regulatory protein) obligatorias para el transporte de colesterol de la membrana mitocondrial externa a la interna, paso limitante en la esteroideogénesis. Dada la fosforilación transitoria de ERK y StAR postulamos que proteínas fosfatasa jugarían un papel en el balance de fosforilación regulando así el inicio y el cierre de la respuesta esteroideogénica. En el presente trabajo se observó por inmunocitoquímica y Western Blot la presencia de fosfatasa MKP1 y PP2A en mitocondria de células de Leydig de la línea MA-10. La desfosforilación de ERK mitocondrial por activación de fosfatasa se produce luego de 2 hs de estimulación con un análogo del AMPc (8Br-AMPc) (control: $6,79 \pm 0,3$ vs 8Br-AMPc: $2,7 \pm 0,09$ $p < 0,001$ en Unidades Arbitrarias (UA) fosfo-ERK/ERK total). Utilizando un disipador del potencial de membrana mitocondrial (carbonyl cyanide chlorophenylhidrazona, CCCP) que afecta el procesamiento de StAR a su forma madura (30 kDa), se observó que ERK no es desfosforilada cuando interactúa con la proteína StAR, aun con la fosfatasa activa (8Br-AMPc+CCCP 2hs/3hs CCCP: $0,54 \pm 0,03$ vs 8Br-AMPc+CCCP 2hs/3hs medio: $2,34 \pm 0,1$, $p < 0,001$ en UA fosfo-ERK/ERK total). Esto se observa debido a la presencia de StAR 30 kDa cuando se remueve el CCCP del medio de cultivo. La ausencia o presencia de StAR 30 kDa que une colesterol y es sustrato de ERK regula la acción de la fosfatasa sobre ERK en la mitocondria. Estos estudios nos permiten sugerir que la velocidad de síntesis de esteroides esta regulada a nivel mitocondrial por el balance en la fosforilación de ERK y StAR vía la activación de PKA y la regulación de la actividad de fosfatasa por la presencia de la forma madura de la proteína StAR.

ENDOCRINOLOGIA 1

042. (34) PARTICIPACION DE LA VIA DE SEÑALIZACION DEL NFκB EN LA ACCION PROAPOPTICA DEL ESTRADIOL EN CELULAS ADENOHIPOFISARIAS. Eijo Alvarenga G.1; Zárate S.2; Jaita G.3; Zaldivar V.4; Radl D.5; Magri L.6; Ferraris J.7; Pisera D.8; Seilicovich A.9

Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA^{1 2 3 4 5 6 7 8 9}. <geijo@fmed.uba.ar>

La activación del Factor Nuclear kappa B (NFκB) induce la expresión de genes involucrados en procesos proliferativos y antiapoptóticos. La actividad del NFκB está controlada por su translocación al núcleo por acción de diversos estímulos, incluyendo el TNFα. La activación de los receptores estrogénicos media la inhibición de la vía del NFκB en diversos tipos celulares. Los estrógenos ejercen un efecto sensibilizador a estímulos proapoptóticos en células adenohipofisarias. Para investigar si la modulación estrogénica de la actividad apoptótica de células adenohipofisarias involucra la inhibición de la actividad del NFκB determinamos el efecto del 17β-estradiol (E2) sobre la expresión del NFκB/p65 en células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas. La incubación de células adenohipofisarias con E2 no modificó significativamente la expresión del NFκB (por Western blot). Sin embargo, la translocación del NFκB inducida por el TNFα (60.3% NFκB nuclear/ total) disminuyó en presencia de E2 (36.5%). Para investigar si la inhibición de la vía del NFκB sensibiliza a las células adenohipofisarias a estímulos proapoptóticos utilizamos un inhibidor de la actividad del NFκB, BAY 11-7082 (BAY), compuesto que inhibe la fosforilación del IκB,

impidiendo la translocación nuclear del NFκB. El BAY (2.5 y 5 μM) aumentó el porcentaje de células apoptóticas (TUNEL, $p < 0.01$; $\times 2$). Sólo en presencia de BAY (1 μM, concentración que no tiene efecto per se), el TNF-α indujo apoptosis de lactotrofos (C: 3.8%, TNF-α: 4.1%, BAY: 3.7%, BAY + TNF-α: 17.5%). Estos Resultados sugieren que los estrógenos modulan la actividad del NFκB disminuyendo su translocación al núcleo inducida por TNF-α. La inducción de apoptosis de lactotrofos por la inhibición de la vía del NFκB sugiere que este factor es importante en la supervivencia de estas células. La acción sensibilizante de los estrógenos a estímulos proapoptóticos podría involucrar la inhibición de proteínas de la familia del NFκB.

043. (86) EL ESTRADIOL INDUCE RÁPIDA TRANSLOCACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO Á LA MEMBRANA PLASMÁTICA EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. Gutiérrez S.1; De Paul A.2; Petiti J.3; Sosa L.4; Mascanfroni I.5; Mukdsi J.6; Pellizas C.7; Torres A.8

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.^{1 2 3 4}; Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁵; Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁶; Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁷; Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁸ <silvina_gutierrez@hotmail.com>

El estradiol (E2) ejerce sus efectos a través de sus receptores (RE) α y β, citoplasmáticos/nucleares y de membrana plasmática, siendo el REα el principal mediador en adenohipofisis. Se ha demostrado que variaciones en la localización subcelular de los RE modifica tanto la señalización rápida como la genómica. Teniendo en cuenta estos antecedentes nos propusimos investigar si el E2 induce translocación del pool de RE intracelulares a la membrana plasmática en células adenohipofisarias normales. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra se trataron con E2 (10 nM) por 0, 5, 15 y 30min. Se realizó inmunofluorescencia (Microscopía confocal) en células permeabilizadas, para observar la redistribución intracelular del REα y se determinó su expresión en fracciones nuclear, citosólica y de membrana por western blot. Mediante citometría de flujo (CF) (en células sin permeabilizar) y microscopía electrónica (ME), se detectó REα y prolactina en células adenohipofisarias. Análisis estadístico ANOVA-Fisher. Por inmunofluorescencia se localizó REα en núcleo y citosol en células adenohipofisarias controles, mientras que a los 15 min de estímulo estrogénico se observó un incremento notable de la inmunomarcación en membrana plasmática. Estos Resultados se correlacionaron con un aumento significativo de la expresión de REα en la fracción de membrana y una disminución a nivel nuclear y citosólico en este tiempo. Por ME se detectó REα en la membrana plasmática de lactotrofos, dato confirmado mediante CF donde un 8% de lactotrofos expresaron REα en la superficie celular, sin observar variaciones en los diferentes tiempos. Estos Resultados indican que E2 induciría una rápida translocación del REα intracelular hacia la membrana plasmática. Además sugerirían la presencia de un pool de REα residente en la membrana plasmática de las lactotrofos, detectable en la superficie celular e independiente al estímulo estrogénico aplicado.

044. (106) CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR TERAPIA GÉNICA CON FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINO-SÍMIL TIPO I (IGF-I) EN PROLACTINOMAS EXPERIMENTALES. Camihort G.1; Luna G.2; Hereñú C.3; Bracamonte M.4; Goya R.5; Cónsole G.6

Facultad de Ciencias Médicas. UNLP.¹; CIC; Histología B. Fac. Cs. Médicas. UNLP.²; INIBIOLP; Histología B. Fac. Cs. Médicas. UNLP.³; Histología B. Fac. Cs. Médicas. UNLP.⁴; INIBIOLP; Histología B. Fac. Cs. Médicas. UNLP.⁵; CIC; Histología B. Fac. Cs. Médicas. UNLP.⁶ <hdelzotto@yahoo.com.ar>

Introducción: El factor de crecimiento insulino-símil tipo I (IGF-I) está presente a nivel pituitario. En adenomas estrógeno(E)-inducidos se han comunicado niveles descendidos de ARNmIGF-I y en cultivos de células lactotropas se halló que el estrógeno tiene efectos antiproliferativos en presencia de IGF-I. Objetivo: Analizar los cambios morfológicos y funcionales que produce la terapia génica, implementada mediante inyección intrapituitaria de un vector adenoviral RAD-IGFI, sobre las diferentes poblaciones pituitarias en ratas estrogenizadas. Material y métodos: Se utilizaron ratas hembras estrogenizadas durante 50 días. Se sacrificaron a los 7 días posteriores a la inyección estereotáxica de un vector recombinante control expresando proteína fluorescente verde (RAD-GFP) o RAD-IGF-I (día 0). Se inmunomarcó con anti-PRL-GH-ACTH-TSH-FSH-LH-Envision. Se realizó el estudio morfométrico de las poblaciones mediante analizador de imágenes. Se registraron: densidad de volumen (DVx10⁻²), densidad celular (DCx10⁻⁴) y tamaño celular (TCμm²). Resultados:

Grupo	PRL DC	PRL TC	GH DC	GH TC	ACTH DC	ACTH TC
Intacto	19.1±3	39.4±0.5	18.2±1.5	40.6±1	3.2±0.1	51±0.6
E	32.5±2**	60.1±1.5**	9.6±0.1**	59.9±1**	1.9±0.1**	47±2
E+GFP	33.8±3**	59.2±1.5**	10.1±0.1**	59.6±1**	2.1±0.1**	46.5±1
E+IGFI	31.6±1**	43.2±1*	11.3±0.7**	53.5±1*	1.8±0.1**	38.6±2*
Grupo	TSH DC	TSH TC	FSH DC	FSH TC	LH DC	LH TC
Intacto	3.1±0.4	76.3±1	4.1±0.1	88±0.1	6.2±0.1	79±1.7
E	0.3±0.1**	72.7±3	0.9±0.1**	62±1.6*	3.1±0.1**	69.6±1*
E+GFP	0.3±0.1**	70.4±2	0.9±0.1**	61±1.5*	3.2±0.1**	70±1.7
E+IGFI	0.5±0.1**	67.5±4	1.7±0.2**	85±3.4	4.5±0.1**	90±1.6

Conclusión: La terapia génica con IGF-I indujo efectos inhibitorios sobre las poblaciones lactotropa, somatotropa y corticotropa, revertiendo los efectos de los estrógenos sobre las células gona-dotropas. Por lo expuesto, podría emerger como un adyuvante de las terapias convencionales para el tratamiento de los prolactinomas.

045. (181) TRATAMIENTO ANTIANGIÓGENICO EN PROLACTINOMAS EXPERIMENTALES. Luque G.¹; Ornstein A.²; Pérez Millán M.³; Cristina C.⁴; Becu-villalobos D.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3 4 5}
<guillemluque@yahoo.com.ar>

Los prolactinomas son generalmente sensibles al tratamiento con agonistas dopaminérgicos, pero un subgrupo es resistente presentando una menor expresión o función del receptor dopaminérgico D2 (RD2), y son por lo general invasivos y agresivos. El ratón hembra knockout para RD2 (Rd2^{-/-}) es un modelo útil para estudiar terapias alternativas. Ya hemos descrito que el VEGF está aumentado en hipófisis hiperplásicas de hembras Rd2^{-/-}. En el presente trabajo evaluamos el efecto de un tratamiento anti-VEGF en el desarrollo de prolactinomas, provenientes de ratones Rd2^{-/-}, transplantados en tubos de silastic en ratones aceptores de la cepa C57. Se inyectó intratumoralmente 2μg/20μl de VEGF-TRAP o vehículo (control) por hipófisis transplantada cada tres días durante tres semanas. Los trasplantes controles se mostraron altamente vascularizados mientras que los inyectados con VEGF-TRAP casi transparentes. La concentración de prolactina intrahipofisaria resultó de 8.99 ± 0.55 y 4.84 ± 2.94 ng/mg de tejido extraído en el grupo control y tratado con VEGF-TRAP, respectivamente; y por inmunohistoquímica observamos un descenso en el porcentaje de las células positivas para prolactina de 59 ± 7 y 19 ± 4%, respectivamente (P<0.05). Evaluamos la expresión de VEGF por inmunohistoquímica, sin encontrar diferencias significativas; sin embargo el VEGF-TRAP impide su acción, al unirlo y secuestrarlo. Por otro lado, el área vascular relativa, (área inmunopositiva para CD31 y CD34 en función del área total), disminuyó en las hipófisis transplantadas tratadas, tanto en el tejido circundante como en la zona endócrina, en especial en esta última (P<0.05). El número de vasos totales por área también disminuyó, sin diferencias en el tamaño promedio de los vasos. Estos datos en su conjunto indican que una terapia antiangiogénica disminuye la vascularización y secreción de prolactina en un modelo de prolactinomas experimentales resistentes.

046. (182) ANANDAMIDA ESTIMULA LA SECRECIÓN HIPO-TALÁMICA DE OCITOCINA. De Laurentiis A.¹; Fernández-solari J.²; Mohn C.³; Rettori V.⁴

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFYBO-CONICET-UBA, Facultad de Medicina, UBA^{1 2 3 4}
<andredelaurentiis@yahoo.com>

Los endocannabinoides (EC) tienen amplia distribución en el sistema nervioso y participan en el control neuroendócrino de la secreción hormonal, fundamentalmente en la homeostasis. 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. Dado que estas neuronas producen principalmente vasopresina y ocitocina (OXT), es probable que los EC participen en la regulación de su secreción. Previamente demostramos que los EC participan en la regulación de los niveles plasmáticos de OXT en un modelo de infección. En el presente trabajo estudiamos in vitro el papel de anandamida (AEA) en la secreción de OXT (medida por RIA) desde fragmentos hipotalámicos (HMB) provenientes de ratas macho adultas Sprague Dawley. La AEA (10-9M) estimuló la secreción de OXT (C: 0.09±0.01 ng/HMB; AEA:0.25±0.02, n=5-6, p<0.01). Este efecto es mediado por el receptor CB1 ya que el antagonista específico AM251 (10-5M) bloqueó dicha estimulación. Más aún, el URB (10-10 y 5.10-10M) un inhibidor de la enzima que degrada AEA aumentó la secreción de OXT (p<0.01). Dada la presencia de la sintasa de óxido nítrico (NOS) en las neuronas magnocelulares, estudiamos la posible participación del óxido nítrico (NO) en el efecto de AEA sobre la secreción de OXT. La AEA (10-9M) estimuló (p<0.01) la actividad de la NOS (radioconversión de Arginina 14C) y un dador de NO, el nitroprusiato (NP 600 μM) inhibió la secreción de OXT, indicando que el NO actuaría como freno al estímulo de la AEA sobre la secreción de OXT. De hecho, con hemoglobina (Hb, 40 μg/ml), un secuestrador de NO, el efecto estimulador de AEA sobre la secreción de OXT es aún mayor. Nuestros Resultados indican que la AEA estimula la secreción hipotalámica de OXT y de NO, el cual ejercería una retroalimentación negativa sobre la secreción de OXT. (PICT 06-258, PIP 02546).

047. (211) REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA EN EL HIPOCAMPO. Moreno Piovano G.¹; Dudiuk C.²; Falco G.³; Varayoud J.⁴; Muñoz De Toro M.⁵; Luque E.⁶; Ramos J.⁷

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes^{1 2 3 4 5 6 7}
<gmoreno@fbc.unl.edu.ar>

Se ha demostrado que los estrógenos influyen sobre funciones neurobiológicas asociadas al hipocampo siendo los receptores de estrógeno alfa y beta (ERa y ERb) sus principales mediadores. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del 17beta-estradiol (E2) sobre la expresión del ERa y sus variantes transcripcionales en el hipocampo de ratones hembra ovariectomizadas (OVX) a los 90 días de edad. A los 10 días post OVX los animales fueron tratados con una única dosis de 2 mcg de E2 (grupo tratado; E; n=4) o con 100 μl de aceite de sésamo (grupo control C; n=4). El sacrificio de los animales se realizó a las 4 hs post inyección. Mediante microcirugía se extrajeron los hipocampos completos los cuales fueron procesados en forma individual. La expresión del ARNm del ERa y la actividad transcripcional de sus promotores A, B, C y F se evaluaron por RT-PCR en tiempo real. La presencia de isoformas de delección del ERa (S2, S3, S4, S5, S6 y S7) fue determinada por PCR anidada de punto final. Los animales tratados con estradiol (grupo E) mostraron una disminución significativa en la expresión del ARNm del ERa al compararlo con los controles (p< 0.001). Al estudiar la actividad relativa de cada uno de los promotores del gen ERa se observó que los animales E presentaban una disminución en la actividad de los promotores A y C (p< 0.001), en tanto que la actividad del promotor F se encontró aumentada (p<0.05) y la del B no presentó cambios (p=0,7). Ninguno de los dos grupos experimentales manifestó expresión de las variantes de delección analizadas. Estos

Resultados demuestran que en el hipocampo el E2 produce una regulación hacia abajo de la expresión del ERa. Esta "down-regulation" sería mediada, al menos en parte, por la disminución de la actividad de los promotores A y C del receptor, los cuales tendrían una mayor contribución que los promotores B y F en la regulación transcripcional estrógeno-dependiente del ERa.

048. (230) ALTERACIONES PRECOSES DEL PERFIL LIPOPROTEICO DURANTE EL DESARROLLO DE UN ESTADO DE INSULINORRESISTENCIA Y GLICOXIDATIVO.

García M.1; Marra C.2; Gagliardino J.3; Rebolledo O.4

CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada)-UNLP-CONICET¹ ; INIBIOLP (UNLP-CONICET)² ; CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada)-UNLP-CONICET³ 4 <marielisa_ar@yahoo.com.ar>

Objetivo: evaluar cambios en composición y grado de peroxidación de lípidos de lipoproteínas plasmáticas(LP) e índices de riesgo aterogénico(IRg) en período inicial de insulinoresistencia (IR) inducida por dieta rica en fructosa(DRF) (10% en el agua de bebida [F10] durante 3 semanas). Métodos: obtuvimos plasmas de ratas Wistar macho normales(F0) y F10 en condición basal, para determinar glucosa(G), insulina(I), triglicéridos(TG), fructosamina(F), ácidos grasos libres (AGL), colesterol total(CT) y fracciones (HDL-C, LDL-C y VLDL-C), composición de ácidos grasos de LP por HPLC y su cinética de peroxidación con Cu⁺⁺ (PICu). Resultados: F10 aumentaron en plasma: F(162.6±3.3 vs 146.2±5.6µmol/l; p<0.05), I(4.7±0.6 vs 2.7±0.5 ng/ml; p<0.02), y en mmol/l, TG (F10 vs F0: 1.80±0.14 vs 0.95±0.10; p<0.001), AGL(0.26±0.01 vs 0.22±0.01; p<0.05), VLDL-C(0.83±0.06 vs 0.44±0.05; p<0.001); disminuyeron HDL-C(0.58±0.04 vs 0.80±0.04; p<0.005) y LDL-C(0.50±0.12 vs 0.83±0.09; p<0.05) y sin cambios en CT y G. En HDL y (VLDL+LDL) de LP de F10 aumentó la relación AG saturados /AG monoinsaturados (2.40±0.15 vs 0.93±0.10; p<0.001 y 3.12±0.11 vs 2.40±0.12; p<0.001) y AGS/PUFA (0.72±0.03 vs 0.35±0.04; p<0.001 y 1.39±0.04 vs 1.04±0.03; p<0.001). En F10 disminuyó el tiempo de inicio de PICu en HDL y (VLDL+LDL) (33.3±2.9 vs 76.9±4.4min; p<0.01 y 25.4±3.2 vs 62.3±5.1; p<0.01) y aumentaron para (VLDL+LDL) la velocidad de propagación (vP) y valor máximo (vMax) (1.24±0.11 vs 0.86±0.04 MDA/min; p<0.01 y 96.0±3.7 vs 70.1±4.4 MDA/mgC; p<0.01); la vMax disminuyó para HDL (75.3±3.8 vs 98.8±3.1 MDA/min; p<0.01) y sin diferencias para vP. Los IRg CT/HDL-C y TG/HDL-C aumentaron para F10 (3.30±0.11 vs 2.64±0.16; p<0.01 y 3.20±0.34 vs 1.23±0.17; p<0.001). Conclusión: DRF induce un aumento precoz de perfil lipoproteico aterogénico y procesos de glicoxidación. El estrés glicoxidativo desencadenado contribuiría al desarrollo del síndrome metabólico observado en estos animales.

049. (284) CAPACIDADES PROLIFERATIVA Y ADIPOGÉNICA DE LA FRACCIÓN ESTROMA-VASCULAR DEL TEJIDO ADIPOSO RETROPERITONEAL EN UN MODELO DE OBESIDAD HIPOTALÁMICA EN LA RATA MACHO. Zubiria M.1; Vidal Bravo J.2; Spinedi E.3; Giovambattista A.4

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE-CICPBA-CONICET)¹ 2 3 4 <guillerminazubiria@gmail.com>

Durante el proceso adipogénico in vivo las células precursoras del tejido adiposo se diferencian a adipocitos, y ciertas señales endocrinas y paracrinas regulan el mismo. En el presente trabajo se evaluaron características (proliferación y diferenciación) de precursores adipocitarios provenientes de rata (S-D) adulta (60-90 días de edad) macho con obesidad hipotalámica, inducida por tratamiento neonatal con monosodio L-glutamato (MSG). Utilizamos un grupo de ratas control (CT) de igual sexo y edad. Luego del sacrificio, se dosaron niveles circulantes de insulina (INS), leptina (LEP) y corticosterona (B). Aislamos la fracción estroma-vascular (FEV) del tejido adiposo retroperitoneal (TARP) y cultivamos 1,5x10⁴ cél/pozo durante 9 días. Se realizaron recuentos celulares cada 24 hs. Adicionalmente, se indujo in vitro la diferenciación de precursores adipocitarios en cultivos de 10 días.

Luego determinamos el contenido intracelular de lípidos (Oil Red O) y la expresión génica de varios marcadores (Lep, Adiponectina, sustrato del receptor de INS (IRS)-1 y -2) por RT-PCR tiempo real. Las ratas MSG mostraron un incremento en los niveles circulantes de Lep y B (p<0,05 vs. CT). Entre los días 5-9 de cultivo encontramos un aumento (p<0,05 vs. CT) en la capacidad proliferativa de células de la FEV del grupo MSG. Al día 10 post-diferenciación, los adipocitos del grupo MSG desarrollaron una disminución en: a) el contenido lipídico vs. el grupo CT (p<0,01), y b) la expresión de los ARNm de LEP, adiponectina, IRS-1 e IRS-2 vs. los respectivos del grupo CT (100%; p>0,05). Nuestro estudio sugiere que los desbalances en las actividades del sistema nervioso autónomo y del neuroendocrino, entre otros, presentes en las ratas MSG, podrían impactar in vivo sobre células de la FEV del TARP generándose precursores adipocitarios con alteración de las capacidades proliferativa y adipogénica. (PICT 2007-1051 y PIP 2007-0704)

050. (326) ABT-510, ANÁLOGO DE TROMBOSPONDINA-1, COMO POTENCIAL TRATAMIENTO EN PROLACTINOMAS. Recouvreux M.1; Becu-villalobos D.2; Díaz-torga G.3

IByME¹ 2 3 <recouvreux@dna.uba.ar>

Trombospondina-1 (TSP1) es una glicoproteína multifuncional de la matriz extracelular, con funciones anti-angiogénicas y anti-tumorales en diversos tejidos, ambos efectos ligados a su capacidad de activar a TGFβ-1 a partir de sus complejos latentes. El TGFβ-1 en hipófisis media en parte los efectos inhibitorios de la dopamina sobre la proliferación y secreción de lactotropos. Con el objetivo de estudiar la participación de TSP1 en estos procesos, utilizamos el modelo de inducción de prolactinomas en ratas por tratamiento crónico con E2 por 4 semanas. Observamos por Western Blot una disminución de TSP1 y de TGFβ-1 activo en las hipófisis tumorales respecto de las controles (p=0.025 y 0.023, respectivamente). En segundo lugar, en hipófisis tumorales trans-plantadas en ratas receptoras tratadas con estrógenos, se aplicó localmente ABT-510, un análogo sintético de TSP1 (100 µl [1µM] 4 veces por semana, 2 semanas). ABT-510 recuperó los niveles de TGFβ-1 activo, y aumentó el contenido de prolactina en los trasplantes, restaurando el efecto inhibitorio sobre la secreción y no la síntesis de esta hormona. Por último, analizamos el efecto de ABT-510 sistémico (100mg/kg i.p. 2 veces por semana, durante 2 semanas) en ratas portadoras de prolactinoma generados por estrógenos. Se evidenció en Resultados preliminares, una reducción en el peso de las hipófisis y en los niveles de prolactina sérica, concomitantemente a un aumento del contenido de prolactina hipofisaria en las ratas tratadas in vivo con ABT-510. Nuestros Resultados sugieren que la restitución de los niveles de TSP1, con el consecuente aumento de TGFβ-1 activo, y normalización en la secreción de prolactina podrían contrarrestar la formación de tumores hipofisarios. Con el apoyo de CONICET y ANPCYT.

051. (341) EVIDENCIA MOLECULAR DE HIPERPLASIA ADRENAL MACRONODULAR INDEPENDIENTE DE ACTH (HAMIA) ASOCIADA A LA EXPRESION ILICITA DE RECEPTORES DE GLUCAGON: PRIMER CASO EN LA LITERATURA. Viale M.1; Redal M.2; De Miguel V.3; Kahan M.4; Glerean M.5; Beskow A.6; Giunta J.7; Fainstein Day P.8

Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires¹; Unidad de Medicina Molecular y Genómica. Hospital Italiano de Buenos Aires² ; Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires³; Unidad de Medicina Molecular y Genómica. Hospital Italiano de Buenos Aires⁴ ; Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires⁵ ; Departamento de Cirugía. Hospital Italiano de Buenos Aires⁶ ; Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires⁷ 8 <maria.viale@hospitalitaliano.org.ar>

HAMIA es una causa sumamente infrecuente de Síndrome de Cushing (SC). Se caracteriza por un agrandamiento nodular bila-

teral de las glándulas adrenales (GA) e hipercortisolismo en presencia de niveles de ACTH suprimidos. La síntesis de cortisol (F) es en respuesta a la activación de receptores adrenales ilícita o anormalmente activos asociado a proteína G trimérica, como hormona luteinizante y el péptido inhibidor gástrico o la vasopresina (V1) y 5-HT4 (serotonina), respectivamente. Presentamos un paciente con SC independiente de ACTH. Una tomografía computada de abdomen evidenció hiperplasia macronodular bilateral. Ante la sospecha de HAMIA se realizaron los siguientes tests de estímulo:

TEST	F µg/mL	F µg/mL 30 min	F µg/mL 60 min	F µg/mL 90 min	F µg/mL 120 min	F µg/mL 180 min
Mix meal	35	26.7	30.6	30.3	31	31
LHRH	32	30.6	31.2	31.6	31	30
ACTH	29	>50	>50	>50	-	-
Glucagon	31.5	25.6	27.6	>50	>50	>50

En base a los Resultados funcionales administramos un análogo de la somatostatina (octreotide), 20 mg/mes/4 meses obteniendo normalización del cortisol libre urinario/24 hs. El objetivo del presente estudio fue estudiar la expresión ilícita del receptor de glucagon (RcGC) en GA del paciente. La expresión del RcGC se evaluó por PCR en Tiempo Real (RT-PCR). Se utilizó cDNA de una línea celular de hepatocitos como control positivo de la expresión del RcGC, cDNA de GA normal como control negativo y gen de beta-actina como control de amplificación. Se evidenció la expresión del ARNm del RcGC en la GA del paciente con SC y la ausencia de expresión del mismo en la GA normal. La respuesta de síntesis de F post estímulo con glucagon in vivo, los niveles persistentemente inhibidos de ACTH circulante del paciente, la evidencia obtenida mediante la técnica de RT-PCR y la respuesta clínica al tratamiento con octreotide sugieren fuertemente que el mecanismo de producción de SC independiente de ACTH se debió al estímulo de RcGC. Se trata del primer caso publicado de HAMIA vinculado a RcGC.

052. (516) POSIBLE PAPEL DE LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES MITOCONDRIALES (UCP) EN LA ADAPTACIÓN DEL METABOLISMO HEPÁTICO A UNA SOBRECARGA DE FRUCTOSA. Castro M.¹; Pereyra A.²; Gagliardino J.³; Massa M.⁴; Francini F.⁵

CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, CCT-CONICET-UNLP)^{1 2 3 4 5} <mccastro05@yahoo.com.ar>

Introducción: La cadena mitocondrial transportadora de electrones cumple un papel importante en la producción de ROS, proceso regulado en parte por las UCPs. Por otro lado, los receptores PPAR modulan la expresión de las UCPs. No está claro qué ocurre con ellos a nivel hepático cuando aumenta la producción de ROS por sobreoferta de sustratos metabolizables. Para responder al interrogante utilizamos el modelo de ratas alimentadas con dieta rica en fructosa (DRF), que promueve el desarrollo de estrés oxidativo en distintos órganos. **Objetivos:** Evaluar la participación de UCP2, UCP3 y PPARs en el proceso de adaptación hepática frente a la sobrecarga metabólica generada por la DRF. **Materiales y Métodos:** Se alimentaron ratas Wistar macho normales con dieta comercial sin (C) o con el agregado de fructosa (DRF) al 10% en el agua de bebida durante 21 días. Se midieron glucemias (G) (GOD-PAP), triglicéridemias (TG) (Kit comercial), insulinemias (In) (RIA) y HOMA-R. En hígado se determinó: 1) contenido de TG y actividad de Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT), 2) ARNm (qPCR) de PPAR α , PPAR β y PPAR γ , SREBP-1c, FAS, UCP2 y UCP3 y 3) expresión proteica (Western blot) de UCP2. **Resultados:** (DRF vs. C): G 8.2 ± 0.3 vs. 7.5 ± 0.2 mM, $p < 0.005$; TG 1.4 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1 mM, $p < 0.001$; In 4.5 ± 0.5 vs. 2.6 ± 0.3 ng/ml, $p < 0.02$ y HOMA-R 43 ± 3 vs. 26 ± 2 ; $p < 0.001$ (insulinorresistencia). En las ratas DRF aumentó la expresión génica de PPAR α , SREBP-1c y UCP2 ($p < 0.05$), disminuyó la de PPAR γ ($p < 0.05$), sin cambios en PPAR β . No se registró expresión génica de UCP3. El nivel proteico de UCP2 fue mayor en animales DRF (100 ± 14.5 vs. $155.9 \pm 22.7\%$, $p < 0.05$). La expresión

génica de FAS, actividad de GPAT y contenido hepático de TG aumentó en las ratas DRF ($p < 0.05$). **Conclusiones:** Los Resultados sugieren que frente a la sobreoferta de sustratos metabólicos, la UCP2 y no la UCP3, asumiría un papel compensador y en estas condiciones, probablemente el PPAR α sería el modulador de la expresión de UCP2.

053. (601) ESPECTRO DE MUTACIONES EN EL GEN DE LA ENZIMA 21-HIDROXILASA (21-OH). CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO EN 360 PACIENTES ARGENTINOS CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA (HSC). Marino R.¹; Pepe C.²; Ramirez P.³; Galeano J.⁴; Perez Garrido N.⁵; Chaler E.⁶; Maceiras M.⁷; Ciaccio M.⁸; Warman M.⁹; Dujovne N.¹⁰; Geniuk N.¹¹; Gryngarten M.¹²; Bergadá I.¹³; Escobar M.¹⁴; Balbi V.¹⁵; Rivarola M.¹⁶; Belgorosky A.¹⁷

Servicio de Endocrinología. Hospital de Pediatría Garrahan^{1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11}; Servicio de Endocrinología. Hospital de Niños Ricardo Gutierrez.^{12 13 14}; Servicio de Endocrinología. Hospital Sor Ludovica de La Plata.¹⁵; Servicio de Endocrinología. Hospital de Pediatría Garrahan^{16 17} <marinorox@yahoo.com>

La deficiencia de 21-OH es la forma más frecuente de HSC. Analizamos las 11 mutaciones mas frecuentes descritas en el gen CYP21A2 por PCR alelo específica y southern blot en 360 pacientes (690 alelos no relacionados) con la forma clásica (FC, 192) y no clásica (FNC, 168). En 12 pacientes con un alelo no detectado se secuenciaron los exones y bases intrónicas flanqueantes. Las mutaciones mas frecuentes fueron In2 (36%) en FC perdedora de sal (PS), I172N (37.5%) en la FC virilizante simple (VS) y V281L (54.7%) en FNC. Las frecuencias fueron V281L 25.5%, In2 20.9%, I172N 9.0%, Q318X 7.2%, R356W 3.8%, C1E6 2.3%, R483fs 1.4%, Ex3 1.0%, P453S 1.0%, P30L 0.6%. La frecuencia de delección/conversión fue mas baja que en la mayoría de las poblaciones pero similar a las de Brasil y México (10.86%). El análisis de las 11 mutaciones permitió un porcentaje de detección de 88.1% (80.94% FNC y 94.4% FC). Se clasificaron los 295 casos con 2 alelos detectados en 5 grupos según la severidad de las mutaciones (Wedell y col. JCEM, 1994) cero:0%; A: In2 1%; B: I172N 7%; C: >20%; D: 20% gen quimera promCYP21P+P30L. En el grupo 0 el 100% de los casos presentó la FC PS, en el grupo A 82.7% la FC PS, en el grupo B 85.7% la FC VS y en el grupo C 99.2% la FNC. En el grupo D (n=4) una paciente presentó una FNC de aparición temprana y los otros 3 FC VS. La secuenciación reveló 8 mutaciones menos frecuentes descritas y en 2 pacientes una nueva mutación sin sentido Q41X (In2/Q41X, Q318X/Q41X). La presencia de un codón de terminación prematuro predice una proteína truncada sin actividad enzimática que correlaciona con el fenotipo hallado (PS). La alta correlación genotipo-fenotipo hallada confirma la utilidad del estudio molecular para predecir la clínica y para el consejo genético. El análisis de las 11 mutaciones permitió un alto porcentaje de detección. La diferencia de detección entre FC y FNC sugeriría la presencia de portadores heterocigotas en el grupo FNC y confirma la sobreestimación de la FNC por estudios hormonales

054. (627) ANGIOGÉNESIS EN ADENOMAS HIPOFISARIOS HUMANOS. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE VEGF Y DE LA DENSIDAD VASCULAR. Pérez Millán M.¹; Berner S.²; Casasco J.³; Becu D.⁴; Cristina C.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET¹; Santa Lucía^{2 3}; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁴; Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁵ <marpemi@yahoo.com.ar>

Los adenomas hipofisarios son los neoplasmas intracraneales primarios más frecuentes. Son en general benignos, aunque pueden volverse invasivos y agresivos. La angiogénesis es un proceso fundamental en el desarrollo de los tumores y se encuentran en práctica terapias antiangiogénicas para distintos tipos de cáncer. Sin embargo, el grado de vascularización y su

rol en la tumorigénesis hipofisaria son controvertidos. Nuestro objetivo fue estudiar la relación entre la angiogénesis y la proliferación en macroadenomas hipofisarios humanos. Se analizaron 60 muestras de tumores obtenidas de pacientes del Hospital Santa Lucía y se compararon con muestras de hipófisis normales. Los adenomas se clasificaron según su secreción hormonal en Prolactinomas, Somatotropinomas y Adenomas No Funcionantes. Se determinó la densidad microvascular (MVD) a través de la cuantificación de los vasos sanguíneos positivos para el marcador de endotelio CD34. Asimismo se evaluó la expresión de VEGF, un factor angiogénico potente, y del marcador de endotelio CD31 por western blot. Se analizó también el índice de proliferación celular a través de la determinación de Ki-67 por inmunohistoquímica. La MVD en las hipófisis normales resultó mayor que en los adenomas ($p < 0,05$), sin embargo los adenomas mostraron un mayor % de vasos chicos ($< 147 \mu\text{m}^2$) con respecto a los controles ($p < 0,05$). Todos los tumores analizados expresaron VEGF, y se obtuvo una correlación significativa de este factor con el marcador de endotelio CD31 ($r_2=0,524$ $P=0,010$). No hubo correlación en cambio entre Ki-67 y MVD, ni entre Ki-67 y VEGF. Concluimos que el factor angiogénico VEGF, que correlaciona con CD31, sería necesario para la vascularización en los tumores hipofisarios en los que los vasos pequeños podrían relacionarse con una activa angiogénesis. La ausencia de correlación entre marcadores de proliferación y angiogénicos indicaría que la proliferación de estos adenomas no está estrictamente limitada por su irrigación.

055. (705) 2-iodoHEXADECANAL COMO REGULADOR DE LA FUNCIÓN Y CRECIMIENTO DE LA GLÁNDULA TIROIDES.

Thomasz L.¹; Rossich L.²; Villamar Alvear S.³; Nicola J.⁴; Oglío R.⁵; Masini-repiso A.⁶; Pisarev M.⁷; Juvenal G.⁸

Comisión Nacional de Energía Atómica.^{1,2,3}; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología Universidad Nacional de Córdoba.⁴; Comisión Nacional de Energía Atómica.⁵; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología Universidad Nacional de Córdoba.⁶; Comisión Nacional de Energía Atómica; Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires.⁷; Comisión Nacional de Energía Atómica⁸ <thomasz@cnea.gov.ar>

Introducción: El yodo es utilizado por la glándula tiroides para sintetizar hormonas tiroideas pero además cumple un rol regulador a través de la síntesis de lípidos iodados. De ellos se han identificado y caracterizado dos: la 6-iodo-11,14-eicosatrienoico - δ -lactona (IL-d) y el 2-iodo-hexadecanal (IHD) que inhiben varios parámetros tiroideos. Objetivo: Analizar el efecto del IHD como regulador de la función tiroidea y de la proliferación celular en una línea de tiroides normal (FRTL-5). Metodología y Resultados: Células FRTL-5 fueron tratadas con dosis crecientes de IHD y KI durante distintos tiempos en presencia de TSH. El IHD reguló negativamente el efecto de TSH sobre la proliferación celular y la expresión de genes tiroideos específicos. Inhibió significativamente la proliferación celular en forma dosis dependiente. Los Resultados se presentan como porcentaje de inhibición respecto a TSH por el ensayo de MTT: a) Luego de 72 h de tratamiento con IHD 10 μM 10% ($p < 0,05$), 2,5 μM 6% ns, 0,6 μM 3% ns., b) Luego de 96 h de tratamiento con IHD 10 μM 20% ($p < 0,01$), 2,5 μM 15% ($p < 0,01$), 0,6 μM 5% ns, mientras que con esas dosis el yodo no tuvo efecto. El IHD produjo arresto del ciclo celular en G1 (TSH G1: 54,5%, IHD 10 μM G1: 65,3%, IHD 2,5 μM G1: 63%, $p < 0,01$), e inhibió algunos parámetros tiroideos como ser: la captación de ^{125}I (TSH: 753 cpm/ μg proteína, IHD 10 μM : 452 cpm/ μg proteína, IHD 2,5 μM 474 cpm/ μg proteína, KI 10 μM : 282 cpm/ μg proteína, KI 2,5 μM : 465 cpm/ μg proteína, $p < 0,001$) y la expresión de genes tiroideo específicos los cuales se analizaron por western blot. El IHD moduló negativamente la expresión de Tg (TSH: 100%, IHD 10 μM : 40%, IHD 2,5 μM : 57% $p < 0,001$) y NIS (TSH: 100%, IHD 10 μM : 74%, IHD 2,5 μM : 88% $p < 0,05$). Conclusión: el IHD es otro posible candidato como intermediario del yodo en el mecanismo autorregulatorio.

056. (723) EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO INDUCIDO POR BROMOCRIPTINA PROMUEVE LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2-NF-KB DESENCADENANDO PARAPTOSIS DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. Palmeri C.¹; Petiti J.²; Sosa L.³; Mukdsi J.⁴; Gutierrez S.⁵; De Paul A.⁶; Torres A.⁷

Centro de Microscopía Electrónica. Universidad Nacional de Córdoba.^{1,2,3,4,5,6,7} <mariepalmieri@hotmail.com>

En trabajos anteriores demostramos que Bromocriptina (BC) induce la regresión de tumores hipofisarios a través de un mecanismo de muerte celular caracterizado como paraptosis. En este proceso se destaca la dilatación del retículo endoplasmático (RE), indicativo de estrés celular. Sin embargo, las vías de señalización involucradas en esta alteración del RE no han sido completamente dilucidadas. El objetivo del presente trabajo fue investigar la participación de Akt, ERK1/2 y NF- κ B en la paraptosis de células adenohipofisarias inducida por BC. Se utilizaron ratas macho estrogezadas con benzoato de estradiol (15 mg) por 30 d (grupo E) y los últimos 5d se administró BC (0,3 mg/100g/d) (grupo E+BC). El grupo control fueron animales intactos (C). La muerte celular fue caracterizada por microscopía electrónica (ME). Mediante Western Blot se determinó la expresión de p-Akt en extractos totales y la de p-ERK1/2, I κ B α y NF- κ B en fracciones citosólicas y nucleares. La localización de ERK1/2 y NF- κ B fue analizada por inmunocitoquímica ultraestructural. Análisis estadístico ANOVA-Fisher. La muerte celular luego del tratamiento con BC, fue comprobada a nivel de ME observándose como signo inicial de involución la dilatación del RE. La administración de BC indujo un aumento de la expresión de p-ERK1/2 ($p < 0,05$ vs E) principalmente en la fracción nuclear y una disminución de la forma activada de Akt ($p < 0,05$ vs E). Además, BC provocó un incremento de los niveles de NF- κ B en la fracción nuclear ($p < 0,01$ vs C y E) con una consecuente disminución de I κ B α en fracción citosólica ($p < 0,01$ vs E), indicativo de la translocación nuclear del factor de transcripción. Por ME se observó una intensa inmunomarcación de NF- κ B y P-ERK1/2 en los núcleos de las células hipofisarias tratadas con BC. Estos Resultados sugieren que el estrés del RE inducido por BC activa la vía ERK1/2 -NF- κ B desencadenando paraptosis de células adenohipofisarias. Este mecanismo de muerte celular sería independiente de Akt.

057. (144) MELATONINA INHIBE LA FOSFORILACIÓN DE ERK42/44, P38 Y JNK46/54, Y LA EXPRESIÓN DE C-JUN, EN CÉLULAS DE LEYDIG DEL HÁMSTER DORADO: POSIBLES IMPLICANCIAS EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA. Rossi S.¹; Matzkin M.²; Calandra R.³; Frungieri M.⁴

Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET; Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA²; Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET³; Instituto de Biología y medicina Experimental, IBYME-CONICET; Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA⁴ <soledadrossi³@hotmail.com>

Previamente, hemos descripto que melatonina (Mel) a través de receptores mel1a, inhibe la expresión de StAR, enzimas esteroideogénicas claves y la producción de testosterona en el testículo del hámster Dorado (Endocrinology 146:1541,2005). El objetivo del presente trabajo ha sido investigar las vías de señalización intracelular/es asociadas a la acción de Mel en células de Leydig del hámster. Para ello, a partir de hámsteres Dorados adultos machos mantenidos en fotoperíodo normal (14hs de luz/día), se disecaron los testículos y purificaron las células de Leydig en un gradiente discontinuo de Percoll. Dichas células fueron tratadas con Mel determinándose, luego de 10 y 30min de incubación, la expresión de c-jun y c-fos (RT-PCR); y después de 3hs, la expresión de fosfo-P42/44, fosfo-P38 y fosfo-JNK46/54 (Western blot). Mel (10 μM) no alteró c-fos, pero inhibió ($P < 0,05$) la expresión de (densitometría, valor arbitrario asignado al con-

troil=1) c-jun (0.04±0.01), fosfo-P44 (0.24±0.04), fosfo-P42 (0.47±0.04), fosfo-P38 (0.13±0.02), fosfo-JNK54 (0.49±0.06) y fosfo-JNK46 (0.37±0.05). Además, la incubación de células de Leydig en presencia de inhibidores de P42/44 (U0126, 10 µM), JNK46/54 (SP600125, 20µM) y P38 (SB203580, 10 µM) redujo (P<0.05) la expresión de c-jun luego de 10min de incubación (densitometría, valor arbitrario asignado al control=1, U0126=0.34±0.05, SP600125=0.32±0.06, SB203580=0.58±0.04) y la producción basal de testosterona después de 3hs (pmol/millón de células de Leydig, control=17.28±3.59, U0126=5.52±1.09, SP600125=4.88±0.92, SB203580=6.86±0.85), indicando que estas vías modularían en forma positiva la síntesis de andrógenos en el testículo del hámster. En conclusión, este trabajo describe un efecto modulador negativo ejercido por Mel sobre la fosforilación de P42/44, P38 y JNK46/54, y la expresión de c-jun, que podría mediar en la inhibición de la síntesis de testosterona desencadenada por Mel en células de Leydig del hámster.

INMUNOLOGÍA 2

058. (622) SÍNDROME DE IPEX: REPORTE DE UN CASO DE PRESENTACIÓN TARDÍA. Nieves E.¹; Bernasconi A.²; Torgerson T.³; Rosenzweig S.⁴; Oleastro M.⁵

Hospital J P Garrahan¹; Departamento de Pediatría de la Universidad de Washington²; National Institute of Health⁴; Hospital J P Garrahan⁵. <eminieves@hotmail.com>

El síndrome de disregulación inmune, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al X, es una inmunodeficiencia primaria causada por mutación en el gen FOXP3. FOXP3 es una proteína reguladora involucrada en la tolerancia inmunológica. Característicamente se presenta en periodo neonatal con diabetes mellitus insulino dependiente y enteropatía. Posteriormente desarrolla dermatitis atópica, infecciones y otras manifestaciones autoinmunes. Reportamos el caso de un paciente con presentación atípica de esta inmunodeficiencia. Caso: Paciente varón, 2º hijo de pareja no consanguínea, sin antecedentes familiares de inmunodeficiencia que presenta como primera manifestación dermatitis atópica severa a los 2 meses de vida. A los 2 años agrega diarrea crónica cuyo estudio anatomopatológico evidencia enteropatía grado IV, infiltración eosinofílica sin incremento de LIES. A los 4 años y 11 meses desarrolla hepatitis autoinmune (Ac.antiLKM+), anemia hemolítica autoinmune e hipereosinofilia por lo que inicia corticoterapia. A la edad de 5 años 1 mes presenta cetoacidosis diabética con insulinemia baja. La valoración inmune demostró hipergamaglobulinemia Ig G (2220 mg/dl) e Ig M (193 mg/dl) con IgA e Ig E normales y ausencia de expresión de FOXP3 en células CD4+CD25+ (0,3% vs control 4,4%). La mutación (748_750delAAT) que afecta lisina en posición 250 en la región leucina-zipper del gen FOXP3, confirma el diagnóstico. Actualmente con 6 años y 3 meses se encuentra sin tratamiento inmunosupresor con buena evolución clínica. Conclusión: En nuestro paciente se evidencia una presentación tardía del compromiso endocrinológico y digestivo, un perfil de inmunoglobulinas no habitual y una evolución favorable sin tratamiento inmunosupresor en comparación con la presentada en las casuísticas internacionales.

059. (543) MENINGOENCEFALÍTIS CRÓNICAS (MEC) VIRALES (NO POLIO) EN INMUNODEFICIENCIAS HUMORALES. Portnoy M.¹; Tahuil M.²; Oleastro M.³

Hospital de Pediatría J. P. Garrahan¹; Hospital del Niño Jesus, Tucumán²; Hospital de Pediatría J. P. Garrahan³ <micaelaportnoy@yahoo.com.ar>

Introducción: Las deficiencias de anticuerpos (ac) son susceptibles a infecciones bacterianas y virales del SNC. Las MEC por enterovirus ocurren en pacientes (p) con Agamaglobulinemia ligada al X (XLA), y menos comúnmente en Inmunodeficiencia Común Variable (IDCV) o Deficiencia de CD40 ligando. Las MEC se presentan con un inicio insidioso y progresión lenta de los sín-

tomas neurológicos. Objetivos: presentar pacientes con deficiencia de ac seguidos por nuestro Servicio que desarrollaron MEC viral (no polio). Resultados: Se documentó infección viral (no polio) de SNC en 7 pacientes. Los diagnósticos inmunológicos fueron: Agamaglobulinemia Autosómica Recesiva (cadena µ) 1p, XLA 1p, Agamaglobulinemia no caracterizada 2p, IDCV 1p, Deficiencia CD40 ligando 1p y Deficiencia de IgA 1p. Las manifestaciones clínicas iniciales fueron: hipercinesia y trastornos de la marcha 4p, convulsiones y alucinaciones 2p, trastornos del aprendizaje y conducta 2p. La edad media de presentación fue de 7,7 años (r: 0,48 - 21,11). El aislamiento viral en LCR fue: enterovirus 5p, adenovirus 1p, herpes simplex 1p. Sólo 3 pacientes presentaron pleocitosis en LCR y 5p, alteraciones en imágenes del SNC. Tres p recibían GGEV en forma regular previo al diagnóstico de MEC. El tratamiento antiviral administrado fue: pleconaril 3p, aciclovir 3p, GGEV en altas dosis 4p. Secuelas observadas: compromiso motor 2p, trastornos de aprendizaje 3p. Dos p fallecieron por enfermedad neurológica progresiva. Conclusiones: Como está descrito en la literatura, las Agamaglobulinemias son las ID humorales que presentan mayor susceptibilidad a desarrollar MEC. Los enterovirus fueron los principales agentes implicados. Es necesario realizar búsqueda etiológica exhaustiva en estos pacientes, debido al dificultoso rescate viral.

060. (812) DEFICIENCIA SELECTIVA DE IG A (DSA) Y VALORACIÓN DEL LINFOCITO B (LB) DE SANGRE PERIFÉRICA. Bezrodnik L.¹; Carelli D.²; Gaillard M.³

Inmuologia del Hospital de Niños Ricardo Gutierrez¹ 2 3. <lbezrodnik@intramed.net.ar>

La DSA representa la inmunodeficiencia primaria (IDP) más frecuente, con formas de presentación y manifestaciones clínicas muy diversas: infecciones recurrentes, enfermedades intestinales (enfermedad celíaca), manifestaciones alérgicas, enfermedades autoinmunes. Este síndrome es en realidad más complejo de lo que se sospechaba hace unos años. Alteraciones en el compartimento B en sangre periférica han permitido definir patrones fenotípicos asociados a IDP. Objetivo: evaluar la posible asociación entre alteraciones fenotípica del LB y formas de presentación clínica DSA. Pacientes, materiales y métodos: Evaluación clínica de 35 DSA, Inmunofenotipo por citometría de flujo: CD19, CD27, IgD, IgM, siendo LB memoria (CD27+), vírgenes (CD27-IgD+IgM+), memoria no-switched (CD27+IgD-IgM+), memoria switched Bms (CD27+ IgD- IgM-), LB transicional (Bt) CD24 CD38 intensos. Los valores de las fueron comparados con un grupo control(N). Resultados: media de edad del diagnóstico fue de 12 años. En los 35 DSA los síntomas comenzaron antes de los 4 años de edad. El 60% fueron del sexo femenino. Las infecciones fueron las manifestaciones más frecuentes (74%), siendo preponderantes las respiratorias altas y bajas. El 50% presentó síntomas de atopia. En nuestro grupo el 21,1% de los pacientes asociaban enfermedad celíaca. El 31.5% de los pacientes presentaron como primera manifestación alguna enfermedad autoinmune. DSA y compartimento B: mayores de 11 años se observó disminución estadísticamente significativa de Bm (DSA: 26.00 ± 11.11 vs N: 33.15 ± 7.1 p< 0.05). Dos pacientes presentaron disminución de Bm y aumento de Bt. Comentario: El compromiso del compartimento LB no fue constante en este grupo de pacientes. La presencia de dos pacientes con clínica de infecciones desde temprana edad y defecto B (descenso Bm y aumento de Bt), plantea la necesidad de realizar el seguimiento por la alta posibilidad de virar a formas más severas de IDP como las IDCV

062. (459) CARACTERIZACIÓN POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE LA DEFICIENCIA DE FAS EN PACIENTES CON SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO CON AUTOINMUNIDAD Y FAMILIARES HETEROCIGOTAS PARA EL DEFECTO MOLECULAR C91Y EN LA PORCIÓN EXTRACELULAR DE LA MOLÉCULA. Perez L.¹; Danielian S.²; Oleastro M.³

Hospital de Pediatría Garrahan¹ 2 3 <leperez77@gmail.com>

El Síndrome Linfoproliferativo con Autoinmunidad (ALPS) se produce por defectos de la apoptosis linfocitaria. Se caracteriza por linfoproliferación benigna (esplenomegalia y/o linfadenopatías), manifestaciones autoinmunes, hipergamaglobulinemia y expansión de la población TCR alfa-beta(+) CD4(-) CD8(-) periférica. Los pacientes con ALPS con mutaciones que comprometen la porción extracelular (EC) de Fas (CD95) pueden presentar una expresión normal o reducida de la proteína de membrana en sus linfocitos. No obstante, la apoptosis inducida por la vía Fas in vitro está siempre afectada. Familiares heterocigotas para los defectos de Fas, aún cuando no presenten manifestaciones clínicas, muestran in vitro la misma deficiencia de Fas que los pacientes. Presentamos en 3 pacientes y familiares sanos heterocigotas con la mutación C91Y en la porción EC de Fas: 1) la expresión de la proteína Fas en la membrana linfocitaria con anticuerpos monoclonales (Ac): clones DX2 y APO 1-3 dirigidos contra la porción EC y clon B-10 dirigido contra la porción intracelular de la molécula y 2) la apoptosis inducida por APO 1-3 en linfocitos activados con fitohemaglutinina e Interleukina-2 por evaluación de núcleos hipodiploides por citometría de flujo. Los pacientes ALPS y familiares portadores presentaron disminución de la expresión de Fas con Ac DX2 y APO 1-3 y de la apoptosis inducida por Fas (43,2 a 76%) respecto del control. Sin embargo, la expresión de Fas resultó indistinguible de la del control usando B-10. Conclusión: La correcta investigación de la expresión de Fas en pacientes con ALPS y portadores sanos de la mutación C91Y requiere del uso de clones de CD95 dirigidos contra distintas regiones de la molécula. La reducida expresión de Fas obtenida con los Ac DX2 y APO 1-3 y la anormal apoptosis inducida por APO 1-3 podrían resultar de la incapacidad de estos Ac de unirse a Fas presente en la membrana debido al eventual impacto del defecto molecular en la región que reconocen estos Ac.

063. (579) SUCETIBILIDAD MENDELIANA A ENFERMEDAD POR MICOBACTERIAS (SMEM): EXPERIENCIA CLÍNICA DE CENTRO PEDIÁTRICO EN ARGENTINA. Nieves E.¹; Bernasconi A.²; Rossi J.³; Casimir L.⁴; Yancoski J.⁵; Cabanillas D.⁶; Oleastro M.⁷

Hospital J P Garrahan^{1 2 3 4 5 6 7} <eminieves@hotmail.com>

La SMEM se caracteriza por infección localizada o diseminada por micobacterias de poca virulencia (BCG, micobacterias ambientales). Hasta un 50% de los casos asocian salmonelosis. Defectos en INFG1, IFNG2, STAT1, IL12P40, IL12RB1, NEMO han sido documentados. Presentamos las características epidemiológicas, clínicas e inmunológicas de 10 pacientes (p) pediátricos con diagnóstico de certeza de dicha inmunodeficiencia. Resultados: De los 10 p (7 varones, 3 mujeres) 6 presentaron deficiencia de IL-12RB1, 1 con deficiencia parcial de INF γ R1, 1 p con deficiencia completa de INF γ R1 y 2 con mutación en NEMO. Nueve p presentaron BCGitis a una edad media de 0.41 años (r 0,08- 1). La búsqueda de diseminación se realizó en 9 p, 7 desarrollaron infección diseminada por BCG. Infección por micobacterias ambientales fue hallada en 2 p: 1 con *M. avium*, 1 con *M. chelonae*, éste último fue el único que asoció salmonelosis. Nueve pacientes recibieron antimicobacterianos, 8 de ellos asociaron INF γ subcutáneo. Un paciente en el que el diagnóstico microbiológico y molecular se realizó post mortem no recibió tratamiento alguno. Tres pacientes fallecieron: el p con déficit completo INF γ R1 por infección diseminada por *M. Avium* con compromiso de SNC, y los 2 p con defecto en NEMO por infección diseminada por BCG asociadas a otras infecciones (PCP, CMV, *Morganella morganii*). Conclusiones: La BCGitis representa la primera manifestación de la enfermedad con edades de aparición variables. En nuestra casuística, el déficit de RB1 IL-12 es el que prevalece. Tal como se refiere en la literatura, los defectos en NEMO y las deficiencias completas de INFG1 representan las formas clínicas más severas, de menor posibilidad terapéutica y peor pronóstico.

064. (479) SOBREVIDA Y PRODUCCIÓN DE IL-8 INCREMENTADAS EN RESPUESTA A ESTIMULACIÓN DE RECEPTORES DE TIPO TOLL (TLR) DE LOS NEUTRÓFILOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA LIGADA AL CROMOSOMA X. Fuxman Bass J.¹; Gabelloni M.²; Salamone G.³; Rosenzweig S.⁴; Rumbo M.⁵; Geffner J.⁶; Trevani A.⁷

IIHEMA - Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina^{1 2 3}; *Laboratory of Host Defenses, NIAID, NIH, Bethesda, MD, USA*⁴; *Laboratorio de Investigaciones en el Sistema Inmune, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina.*⁵; *IIHEMA - Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina*^{6 7} <jfuxman1@yahoo.com.ar>

Los fagocitos de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X (EGC-X) exhiben una incapacidad de producir intermediarios reactivos del oxígeno, y como consecuencia, presentan una susceptibilidad incrementada a infecciones bacterianas y fúngicas, desarrollando granulomas que impiden la función de órganos vitales. Teniendo en cuenta la relevancia de los receptores tipo Toll (TLR) en el reconocimiento de bacterias y hongos, y en el desarrollo de la respuesta inflamatoria subsecuente, en este trabajo evaluamos la respuesta de los neutrófilos de pacientes EGC-X (PMN-EGC-X) a la estimulación con agonistas de TLR2, TLR4 y TLR5. Los PMN EGC-X exhibieron una producción de IL-8 marcadamente superior a la de los PMN de donantes sanos (PMN-N) en respuesta a estimulación de todos los TLR mencionados ($p < 0,05$, $n=7$). Los agonistas de TLR mediaron una marcada prevención de la apoptosis de neutrófilos luego de 24 hs de cultivo; sin embargo, la sobrevivida de los PMN-EGC-X fue significativamente superior a la de los PMN-N en respuesta a la estimulación de todos los TLR estudiados ($p < 0,05$, $n=7$). Estos hallazgos no obedecieron a un incrementado reconocimiento de los agonistas de TLR2 y 4, dado que no observamos diferencias en la expresión de TLR1, TLR2, TLR4 y CD14 entre los PMN-N y los PMN-EGC-X. La incrementada respuesta a la estimulación de TLR5 observada en PMN-EGC-X podría ser consecuencia de la potenciada activación de las vías transduccionales de las MAPK p38 y ERK1/2, y de la PI3k/Akt que observamos en ensayos de western-blot; así como de una incrementada activación de NF κ B evidenciada por una mayor y sostenida degradación de I κ B α en respuesta a la estimulación con flagelina de *S.typhimurium*. En conjunto, estos Resultados sugieren que la estimulación de los PMN-EGC-X con agonistas de TLR podría incrementar su reclutamiento y sobrevivida en los focos de infección, contribuyendo a explicar las frecuentes complicaciones inflamatorias que sufren estos pacientes.

065. (804) HAPLOTIPOS HLA EN DEFICIENCIA SELECTIVA DE IG A (DSA) Y ENFERMEDAD CELIACA. Bezrodnik L.¹; Ginaca A.²; Carabajal P.³; Theiler G.⁴; Faimboin L.⁵; Marcos Y.⁶

Inmuología del Hospital de Niños Ricardo Gutierrez^{1 2 3}; *Inmunogenética Hospital de Clinicas*^{4 5}; *InmuoInmunogenética Hospital de Clinicas*⁶ <lbezrodnik@intramed.net.ar>

DSA representa la Inmuno Deficiencia Primaria más frecuente con una prevalencia entre 1/223 a 1/10000 en las diferentes poblaciones. Sus formas de presentación y manifestaciones clínicas son muy diversas: infecciones recurrentes, enfermedades intestinales (enfermedad celíaca), manifestaciones alérgicas, enfermedades autoinmunes o asintomáticas. Este síndrome es en realidad más complejo de lo que se sospechaba hace unos años. Desde el laboratorio de rutina inmunológico no existen parámetros que permitan diferenciar la evolución de un paciente al diagnóstico. Objetivo: Establecer asociación entre haplotipos HLA A, B o DR y diferentes presentaciones de DSA. Material y métodos: De

220 pacientes con diagnóstico definitivo de DSA, se seleccionaron al azar 55 pacientes. Se realizaron estudios de histocompatibilidad por PCR-SSO-quimioluminiscencia de los haplotipos de HLA A, B y DR. Resultados: No se hallaron haplotipos de Clase A ni B comunes entre los 55 pacientes. Se encontró en 14/55 pacientes un haplotipo HLA DR 03(17), todos ellos con Enfermedad Celiaca (EC). De ellos, 5 compartían también el haplotipo DR 01 y 4 el HLA DR07. Comentario: La enfermedad celiaca es la enfermedad autoinmune más frecuente asociada a DSA (21% en nuestro grupo de pacientes). El hallazgo del haplotipo HLA DR 03(17) en nuestra población permitió agrupar a los DSA con EC. Este hallazgo debe seguir siendo investigado para poder darle valor pronóstico en el seguimiento de pacientes con DSA.

066. (277) MEMORIA INMUNOLÓGICA B EN PACIENTES CON SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO ASOCIADO AL CROMOSOMA X (XLP). Coraglia A.¹; Galassi N.²; Belmonte L.³; Felippo M.⁴; Malbran A.⁵; De Elizalde De Bracco M.⁶

IIHEMA. Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4}; Hospital Británico de Buenos Aires OSPITAL BRITANICO DE BUENOS AIRES⁵; IIHEMA.ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA⁶. <ana.coraglia@gmail.com>

La hipogamaglobulinemia en XLP podría asociarse a fallas en los linfocitos T (LT) foliculares (TFH) que participan en la generación de memoria B. Para comprobar la calidad de los linfocitos B (LB) de memoria remanentes, estudiamos su fenotipo en sangre periférica en 2 pacientes XLP (#4 y #9) con igual mutación, diferente edad de infección por EBV (virus Epstein Barr) y distinto tratamiento, en muestras tomadas durante 36 meses, y en controles normales (N). Las TFH se caracterizaron por citometría de flujo, comprobando la presencia de CXCR5, CD57 y CD62L en linfocitos CD4+. Se analizó la expresión de CD27 en células CD19+ y la expresión conjunta de CD27, IgD e IgM, que identifica LB de memoria que no pasaron por la reacción de recombinación y "class switch" en centros germinales (CG). El porcentaje de LT CD4+CXCR5+ fue menor en XLP que en N (% CD4+CXCR5+ X+ES, #9: 1.97±0.24; #4: 2.66±0.22; N: 7.45±0.88, n=15). Lo mismo se observó para linfocitos T CD4 + CD62L + CXCR5 +. No hubo diferencias significativas entre XLP y N en los L TFH CD4+CXCR5+CD57+. En sangre periférica, los valores de LB CD27+ fueron menores en XLP que en N (cel. x 103/ml, X+ES, #9: 4682±583; #4: 1280±292; N: 38172±5472). En cuanto a los LB que coexpresan IgM+, IgD+, fueron mayores en #9 que en #4 y N (cel. x 103/ml, X+ES, #9: 17041±1392; #4: 363±152; N: 861±244). En #9 el 85 % de estos eran CD27 negativos (naïve). Luego del cultivo sin estímulo (Ruibal et al, 2001), los valores de LB CD27+ IgD+IgM+ (memoria B "non switched") fueron similares en XLP #4 y #9. La falla en la generación de memoria B en XLP no se asocia al descenso de TFH CXCR5+ a diferencia de otras deficiencias B (ICOS y de CD40L) con ausencia de CG. Los cambios en expresión de IgD+IgM+ en LB circulantes de #9 respecto a #4 y N parecen relacionados al tratamiento y/o magnitud de la infección original con EBV. Durante el cultivo prolongado se conservan o enriquecen en XLP y en N los LB CD27+, IgM+, IgD+.

067. (810) ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS EN SUEROS Y MATERIAS FECALES DE BOVINOS INFECTADOS CON MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS. Fernández B.¹; Jolly A.²; Gilardoni L.³; Colavecchia S.⁴; Fernández E.⁵; Mundo S.⁶

Área de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires¹; Área de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires^{2 3 4}; Clínica de Rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires⁵; Área de Inmunología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires⁶ <barbarafer@yahoo.com.ar>

La Paratuberculosis es una enfermedad intestinal crónica, causada por Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (Map). La respuesta inmune humoral específica se la relaciona con los

últimos estadios de la enfermedad, y ha sido descripta principalmente con fines diagnósticos. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la respuesta inmune humoral local y sistémica de bovinos infectados. Se identificaron y compararon los niveles de isotipos de inmunoglobulinas (Ig) presentes en sueros y materias fecales (MF) de bovinos en distintos estadios de la enfermedad y sanos. La categorización se realizó por: procedencia, signología, proteinemia, aislamiento de Map de MF y ELISA-PPA. Se analizaron los sueros y MF de 6 bovinos infectados: 2-Asintomáticos (IA), 2-Sintomáticos (IS) y 2-Terminales (IT), y 5 bovinos controles (C) por ELISA, obteniendo los niveles de isotipos totales (it) y específicos a Map (ie). Se detectaron variaciones en los niveles de it en suero sin observarse diferencias significativas. Mientras que en MF se notaron mayores niveles de los it IgM e IgG en los IS (p< 0.05). Los Resultados de ie se expresan en la tabla:

µg/ml Suero	IgG1 MF	IgG2 Suero	IgG3 MF	Suero	MF	
C	<0.08	<0.08	3.4±0.7	<0.08	<0.08	9.2±0.8
IA	2.07±0.1	<0.08	10.2±2.8*	<0.08	18.5±8.8*	10.3±0.8
IS	679.2±10*	14.8±3*	14.1±0.7*	0.09	17.5±6.7*	18.9±13
IT	1160.3±30*	<0.08	10.4±3.7*	<0.08	19.5±14*	<0.08

* p< 0.05

Los Resultados muestran que la infección por Map no altera la producción de Igs a nivel sistémico. Los mayores niveles de it en MF de los IS podrían relacionarse con la lesión intestinal. El aumento de IgG específica en IS e IT se debería principalmente a IgG1. Además, se identifica a la IgG3 en los infectados, predominando en IA. Dado que los reactivos de diagnóstico identifican principalmente IgG1 e IgG2, este hallazgo podría impactar en la identificación de animales asintomáticos.

069. (476) EFECTO INMUNOADYUVANTE DE OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS CON MOTIVOS CPG (CPG-ODN) VEHICULIZADOS EN SISTEMAS NANOESTRUTURADOS (COAGELES). Sánchez Vallecillo M.¹; Palma S.²; Ullio G.³; Allemanni D.⁴; Morón G.⁵; Pistori M.⁶; Maletto B.⁷

CIBICI (CONICET) Facultad de Ciencias Químicas UNC¹; Departamento de Farmacia Facultad de Ciencias Químicas UNC^{2 3 4}; CIBICI (CONICET) Facultad de Ciencias Químicas UNC^{5 6 7} <mvallecillo@fcq.unc.edu.ar>

Los CpG-ODN tienen actividad como inmunoadyuvantes, pero su biodisponibilidad es reducida lo que representa una limitación para su uso clínico. CpG-ODN fue vehiculizado en nanoestructuras (coageles) formadas a partir del 6-O-ascorbil palmitato (Coa-ASC16) con el objeto de optimizar su biodisponibilidad. Previamente mostramos que esta estrategia potencia la actividad inmunoadyuvante de CpG-ODN, ya que ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/coagel desarrollaron mayores títulos de anticuerpos (IgG, IgG1 e IgG2a) específicos e INF-γ que aquellos tratados con OVA/CpG-ODN. En este trabajo evaluamos si esta potenciación de la respuesta inmune se mantiene en el tiempo y si Coa-ASC16 tiene actividad inflamatoria "per se". Para ello, se inmunizaron ratones por vía s.c. en los días 0, 7 y 15 con OVA (60µg/animal/dosis) más CpG-ODN (75µg/animal/dosis) u OVA más CpG-ODN/coagel y en los días 30 y 44 pos 3ra. inmunización se evaluaron los niveles séricos de anticuerpos específicos. En los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN el título de IgG (log10) fue de 3,0±0,2 en el día 30 y 4,50±0,03 en el día 44, en los inmunizados con OVA/CpG-ODN/coagel fue de 4,7±0,2 en el día 30 y 5,3±0,1 en el día 44 (p<0,05). Otros animales se inyectaron i.p. con coagel o solución al 5% de dextrosa (grupo control) y 10hs más tarde se obtuvo lavado peritoneal y suero. En el peritoneo de los animales inyectados con coagel hubo un reclutamiento de neutrófilos (Ly6Ghigh, CD11bhigh, F4/80-) (49,8±15,5 vs 1,4±0,2, p< 0,001) y de células CD11bint, F4/80- (20,7±5,5 vs ND) y en suero un aumento de IL-6 (13670 ± 2000 vs ND). Estos mismos experimentos se realizaron en animales TLR4-/- observándose Resultados similares. En conclusión observamos que la carga de CpG-ODN en Coa-ASC16: a) potencia una respuesta in-

mune específica a largo tiempo y b) provoca un estado inflamatorio "per se". Esto último podría ser uno de los mecanismos por el cual opera Coa-ASC16 como potenciador de la respuesta de CpG-ODN.

- 070. (539) INNATE IMMUNITY STIMULATION BY BACULO-VIRUS CONFERS COMPLETE PROTECTION AGAINST FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS IN MICE.** Molinari P.¹; García Nuñez S.²; Gravisaco M.³; Carrillo E.⁴; Berinstein A.⁵; Taboga O.⁶

Instituto de Biotecnología, INTA^{1 2 3 4 5 6}
 <pmolinari@cna.inta.gov.ar>

Foot and mouth disease (FMD) is one of the most contagious and economically devastating diseases of cloven-hooved animals. The mouse model has been successfully used to study FMD virus (FMDV) infection. Particularly, C57BL/6 mice injected with FMDV die within 48 hours. The virus spreads to almost all organs, causing systemic infection. In this model, protection against FMDV by innate immune response stimulation has been previously demonstrated. Baculoviruses infect different mammalian cells but cannot replicate. Baculoviruses strongly activate innate immune responses within few hours post injection by inducing inflammatory cytokines and IFN type I expression. We have evaluated the ability of baculovirus to protect mice against FMDV infection. We inoculated wild type baculoviruses (5x10⁷PFU) to C57BL/6 adult female mice by intravenous injection. At different times post injection, mice were challenged intraperitoneally with a lethal dose of FMDV A/Arg/2001 (8.5x10³PFU). Injection of mice with baculovirus 3 hours or 3 days prior challenge resulted in complete abrogation of mortality, complete or partial suppression of viraemia and no seroconversion, although systemic spread of FMDV was detected 24 hours post challenge. Our results show that baculovirus injection up to three days before FMDV challenge confers an antiviral status that fully protects mice against the virus.

- 071. (93) RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR EL SISTEMA BACMAM, EXPRESANDO LA NUCLEOPROTEÍNA DEL VIRUS DE INFLUENZA A EN RATÓN : MODELO DE DELIVERY DE VACUNA.** Sanchez M.¹; Cargnelutti D.²; Alvarez P.³; Mattion N.⁴; Scodeller E.⁵

IMBECU-CCT-MENDOZA^{1 2} ; Centro de Virología Animal-Centro Cesar Milstein, Buenos Aires.³ ; Centro de Virología Animal-Centro Cesar Milstein, Buenos Aires.⁴ ; IMBECU-CCT-MENDOZA⁵ <vicky_sanchez_@hotmail.com>

Introducción: La gripe o influenza es una enfermedad respiratoria aguda con un elevado impacto sobre la salud pública mundial. Su agente causal es el virus de la Influenza y la vacunación es la mejor manera para controlar esta patología. El uso de la nucleoproteína (NP) de Influenza A como inmunógeno se debe a que es una proteína altamente conservada y no muestra la variación antigénica que se producen en las glicoproteínas de la superficie del virus, hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA). El modo no replicativo de baculovirus mediando la expresión de un transgen dentro de células de mamíferos, puede ser usado como estrategia de delivery de antígenos vacunales en contra de numerosas enfermedades. El objetivo del presente trabajo es describir la producción y el uso de BacMan-NP como delivery vacunal, expresando la NP del virus de influenza, bajo el control del promotor temprano de citomegalovirus. Metodología: Ratones BALB/C fueron vacunados con un régimen de prime/boost homólogo de 8x10⁸ PFU de baculovirus recombinante. Al final del protocolo de inmunización los sueros fueron recolectados, y los anticuerpos específicos contra NP fueron titulados por ELISA. Resultados: Los ratones inmunizados mostraron una significativa respuesta inmune humoral con títulos de IgG entre 800 y 1600. Conclusión: Este trabajo demuestra que el vector BacMam-NP expresa eficiente-mente la NP "in vivo" e induce una respuesta inmune contra el virus de Influenza. Esta es la primera evidencia que demuestra que el modo no replicativo de este vector puede actuar como delivery de la NP como antígeno vacunal contra el virus de la influenza.

- 072. (313) EXPRESIÓN EN LACTOCOCCUS LACTIS DE UN ANTÍGENO NO TÓXICO DERIVADO DE TOXINA SHIGA² (STX²).** Mejias M.¹; Bentancor L.²; Hollmann A.³; Panek C.⁴; Ramos M.⁵; Fernández Brando R.⁶; Ghiringhelli P.⁷; Palermo M.⁸

Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina; Instituto de Leucemia Experimental. Academia Nacional de Medicina.¹; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.²; LMM, Universidad Nacional de Quilmes³ ; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.⁴; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.⁵; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina; Instituto de Leucemia Experimental. Academia Nacional de Medicina.⁶; LIGBCM, Universidad Nacional de Quilmes⁷ ; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina; Instituto de Leucemia Experimental. Academia Nacional de Medicina.⁸ <mpilarmejas@hotmail.com>

La infección con *Escherichia coli* productor de Stx2 causa colitis hemorrágica y puede complicarse en la forma de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), el cual es un desorden multisistémico caracterizado por presentar anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia, e insuficiencia renal aguda. En Argentina, El SUH es endémico y presenta la mayor incidencia del mundo. Las vacunas experimentales ensayadas contra el SUH no fueron efectivas debido, en parte, a que la subunidad B tiene bajo potencial inmunoprolifáctico y la subunidad A es tóxica. *L. lactis* es una bacteria del ácido láctico (BAL) no patogénica, no invasiva y no colonizadora que posee status GRAS (Generally Recognized As Safe). Este microorganismo es considerado el modelo de BAL y un excelente candidato para el desarrollo de vacunas vivas para inducir inmunidad en mucosas. En este trabajo se clonó la subunidad B de Stx2 (Stx2b, principal factor patogénico asociado a SUH) en un vector para la expresión citoplasmática inducible por xilosa (pXYCYT-stx2b). Luego, se transformó este vector en la cepa *L. lactis* NCDO2118 y los cultivos se indujeron a DO600 = 0.2 y se incubaron 20 hs sin agitación. Se inocularon por vía intragástrica ratones BALB/c adultos con 10⁹ UFC utilizando dos protocolos de inmunización alternativos (0, 1, 2, 28, 29, 30, 35 días y 0, 7, 14, 21, 56, 57, 58 días). Se recolectó suero y materia fecal a distintos tiempos para determinar el título de anticuerpos específicos. Sin embargo, en suero no se obtuvieron diferencias significativas entre la respuesta generada con *L. lactis* conteniendo pXYCYT-stx2b y la cepa control. Por esta razón, se analizó la expresión de Stx2b a distintos tiempos post inducción mediante dot blot, observándose una disminución significativa en la expresión luego de las 7 hs de cultivo. Estos Resultados indican que probablemente luego de 20 hs de inducción stx2b se esté expresando en cantidades insuficientes para generar una respuesta inmune eficiente.

- 073. (395) FORMACION DE ESTRUCTURAS PSEUDOLINFÓIDES ASOCIADAS A LA ADMINISTRACION DE CÉLULAS DENDRITICAS COMO VACUNA ANTITUMORAL.** Gazzaniga S.¹; Mackeon S.²; Bravo A.³; Mallerman J.⁴; Mordoh J.⁵; Wainstok R.⁶

Laboratorio de Biología Tumoral QB-63 Dpto Química Biológica Facultad de Cs Exactas y Naturales UBA¹ ; Laboratorio de Biología Tumoral QB-63 Dpto Química Biológica Facultad de Cs Exactas y Naturales UBA; Laboratorio de Cancerología, Fundación Instituto Leloir²; Laboratorio de Patología Molecular, Htal. Eva Perón³; Laboratorio de Biología Tumoral QB-63 Dpto Química Biológica Facultad de Cs Exactas y Naturales UBA⁴ ; Laboratorio de Cancerología, Fundación Instituto Leloir⁵ ; Laboratorio de Biología Tumoral QB-63 Dpto Química Biológica Facultad de Cs

Exactas y Naturales UBA; Laboratorio de Cancerología, Fundación Instituto Leloir⁶ <sgazza@qb.fcen.uba.ar>

Previamente demostramos que al inyectar subcutáneamente 4 dosis de una vacuna (vac) de células dendríticas (CDs) cocultivadas con células de melanoma murino B16F1 apoptóticas/necróticas se logra una protección de ~ 70% frente al desafío tumoral con células B16F1 viables. Con el fin de avanzar en el estudio del mecanismo de protección, quisimos averiguar si en el sitio de administración (s.ad.) de la vacuna se genera un microambiente de estimulación local. Para ello, se extirparon los s.ad. (piel + celular subcutáneo) (n=10) para su evaluación histológica. Veinticuatro horas después de la 4^a dosis de vac se encontraron las CDs con cuerpos apoptóticos en su citoplasma rodeadas de un acúmulo de leucocitos polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos. A las 120 hs post 4^a vac. se observaron estructuras bien organizadas de leucocitos, rodeados o atravesados por tabiques semejantes a los de un ganglio linfático con imágenes vasculares inmunoreactivas para PN adreína, molécula de adhesión presente en las HEV (high endothelial venules). Una vez finalizado el esquema de vacunación, los s.ad. se disgregaron enzimáticamente y se analizaron las poblaciones linfocitarias presentes por citometría de flujo, observándose un reclutamiento significativo de linfocitos T CD4+ (p<0,03), T CD8+ (p<0,02) y B (p<0,01) respecto de piel de ratones no vacunados. No se halló formación de estas estructuras ni la presencia de células adreína positivas luego de 1 o 2 dosis de vac. La vacunación con CD solas, Apo solas o la mezcla de ambas, no genera protección significativa (p=0,01) coincidiendo con la ausencia de formación de estructuras pseudolinfoides organizadas. Por lo tanto, las evidencias sugieren que la inflamación crónica producto de la vacunación local reiterada induciría la formación de estructuras linfoides terciarias con presencia de células PNadreína positivas, células T y B que podrían contribuir a la protección. S.G. y S.M. contribuyeron equitativamente en el trabajo

074. (98) RELACIÓN ENTRE EL EFECTO INMUNOADYUVANTE Y LA TOXICIDAD DE LAS CARGAS POSITIVAS EN LIPOSOMAS POLIMERIZABLES. Gasparri J.¹; Speroni L.²; Chiaramoni N.³; Alonso S.⁴

Laboratorio de Biomembranas Departamento de Ciencia y Tecnología Universidad Nacional de Quilmes^{1 2 3 4}. <jgasparri@unq.edu.ar>

En la actualidad los compuestos de aluminio, descubiertos hace más de 70 años, son el único inmunoadyuvante aprobados por la FDA (Food and Drug Administration, USA). Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar inmunoadyuvantes adecuados para los ensayos clínicos de nuevas vacunas. En este trabajo se estudió la respuesta inflamatoria y el efecto biológico de la polimerización y la adición de un lípido catiónico (DOTAP) en una formulación liposomal, en vista de la potencial aplicación de los liposomas como inmunoadyuvantes. Las formulaciones ensayadas fueron DC8,9PC:DMPC polimerizados (P0) y no polimerizados (NP0), y DC8,9PC:DMPC:DOTAP polimerizados (P+) y no polimerizados (NP+). Los liposomas NP+ redujeron significativamente el metabolismo en las células Vero luego de 24 hs de incubación. Cuando la incubación se realizó por 48 hs, ambos liposomas catiónicos, P+ y NP+ disminuyeron la viabilidad de las células. Resultados similares se obtuvieron con las células murinas de la cavidad peritoneal. Paradójicamente, los liposomas que presentaron efectos citostáticos y citotóxicos in vitro, estimularon el metabolismo y tuvieron un efecto mitogénico in vivo. Finalmente, el efecto adyuvante fue probado a través de la inoculación en ratones Balb/c, con liposomas asociados a β-lactamasa, una proteína no inmunogénica. La respuesta de anticuerpos más importante se obtuvo con los liposomas NP+. En coherencia con este resultado se observó que los liposomas NP+ inyectados en la dermis generan una respuesta inflamatoria notable, la cual presenta características histopatológicas de un granuloma de inoculación. En conclusión, las cargas positivas jugarían un rol muy importante en el efecto adyuvante, al conferirle a los liposomas capacidad citotóxica.

075. (591) DESARROLLO DE VACUNAS EXPERIMENTALES CONTRA FIEBRE AFTOSA: EFECTO DE DOS ADYUVANTES Y ROL DE LOS MACRÓFAGOS EN LA RESPUESTA PROTECTORA TEMPRANA. Quattrocchi V.¹; Langellotti C.²; Pappalardo J.³; Olivera V.⁴; Di Giacomo S.⁵; Van Rooijen N.⁶; Mongini C.⁷; Waldner C.⁸; Zamorano P.⁹

INTA¹ ; CONICET² ; CONICET; INTA³ ; INTA^{4 5} ; Free University Medical Center⁶ ; CONICET^{7 8} ; INTA; CONICET⁹ <quattrocchi@cnia.inta.gov.ar>

La Fiebre Aftosa (FA) es una enfermedad aguda causada por el virus de la Fiebre Aftosa (VFA). Durante un brote el ganado infectado debe ser eliminado y el que rodea al foco debe ser vacunado con una vacuna capaz de conferir inmunidad protectora a corto plazo. El conocimiento de la respuesta inmune contra VFA en los hospedadores naturales es limitado, debido a las complicaciones prácticas y económicas de trabajar con animales grandes. El modelo de ratón ha sido muy utilizado para el estudio de esta enfermedad y a pesar de las diferencias en cuanto a infección y patogenia se han encontrado numerosos paralelismos entre este modelo y los hospedadores naturales. El objetivo del trabajo fue estudiar la protección temprana y la respuesta inmune inducida por vacunas inactivadas e inmunomoduladas en un modelo murino. Los animales vacunados fueron desafiados, se dosaron anticuerpos por ELISA y seroneutralización, se midieron poblaciones por citometría de flujo, se depletaron células NK y macrófagos con reactivos comerciales y se midió la fagocitosis del VFAi opsonizado por citometría de flujo. La formulación del VFA inactivo (VFAi) con los adyuvantes IMS802 (vacuna 802-VFAi) o ISA206 (vacuna 206-VFAi), incrementó la protección frente al desafío viral y los niveles de anticuerpos totales contra VFA, no así los neutralizantes, respecto del grupo VFAi. La depleción de los macrófagos disminuyó los porcentajes de protección indicando que esta población cumple un rol fundamental en la respuesta inmune inducida por estas vacunas. La opsonofagocitosis del virus se vio significativamente incrementada en los animales vacunados con 802-VFAi o 206-VFAi respecto de VFAi. Estos Resultados demuestran la capacidad de los adyuvantes estudiados de aumentar la respuesta protectora específica y a corto plazo de la vacuna inactivada y señala el rol preponderante que juegan la opsonización y la fagocitosis mediada por anticuerpos en la respuesta inmune temprana contra este virus en el modelo murino.

076. (666) DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES PROINFLAMATORIOS EN MUCOSA INTESTINAL COMO PREDICTORES DE RECHAZO EN TRANSPLANTE INTESTINAL. Cagnola H.¹; Meier D.²; Zambarnadi A.³; Rumbo C.⁴; Docena G.⁵; Chirido F.⁶; Gondolesi G.⁷; Rumbo M.⁸

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN). Facultad de Cs. Exactas UNLP^{1 2} ; Unidad de Rehabilitación, Nutrición y Transplante Intestinal, Fundación Favalaro^{3 4} ; Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN). Facultad de Cs. Exactas UNLP^{5 6} ; Unidad de Rehabilitación, Nutrición y Transplante Intestinal, Fundación Favalaro⁷; Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN). Facultad de Cs. Exactas UNLP⁸ <cghernan@biol.unlp.edu.ar>

El transplante de intestino (ITx) es indicado en pacientes con insuficiencia intestinal irreversible y complicaciones de la alimentación parenteral total. El rechazo es la primera causa de pérdida del injerto. El seguimiento postransplante se realiza mediante endoscopia y biopsia para evaluar cambios histológicos patológicos. El objetivo del presente trabajo fue determinar niveles de expresión de genes en mucosa del injerto durante el seguimiento post ITx a fin de caracterizar los procesos inmunes involucrados en el rechazo agudo e identificar genes que permitan predecir eventos de rechazo. Se determinaron los niveles de inducción de IFN-γ, CXCL10, CXCL11, CXCR3 y CCL20 mediante RT-qPCR a partir de biopsias durante los primeros 3 meses postransplante. Se analizaron 20 muestras provenientes de 5 pacientes pediátricos transplantados. Durante el seguimiento realizado se

presentaron tres eventos de rechazo, en grado variable de leve a severo. En el caso de rechazo severo analizado se observó un incremento en la inducción de IFN- γ (incremento relativo respecto a las muestras normales IR: 8 ± 2 veces), CXCL11 (IR 6 ± 1), CXCL10 (IR 36 ± 34) y CCL20 (IR 21 ± 2). Los niveles de inducción observados correlacionan con la severidad de las alteraciones histológicas y el grado de rechazo, siendo muy bajas las diferencias entre los casos de rechazo leve y los normales. La expresión de CXCR3 no se ve incrementada. Entre los marcadores analizados, cambios en la expresión de CXCL11 podrían anticiparse al diagnóstico histológico de rechazo, dado que muestras previas a eventos de rechazo severo mostraron un incremento en este marcador (10 ± 1). Si bien se debe abarcar un mayor número de situaciones clínicas para lograr una mejor comprensión de los procesos involucrados, estos Resultados indican que la determinación de niveles de expresión de un panel de genes en mucosa intestinal del injerto permite observar diferencias atribuibles al rechazo.

077. (776) ACTIVIDAD INMUNOSUPRESORA DEL SLPI EN MODELOS IN VIVO. Guerrieri D.¹; Romeo H.²; Incardona C.³; Chuluyan H.⁴

³o Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina UBA¹; Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA²; Laboratorios Gador S.A. Buenos Aires, Argentina³; ³o Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina UBA⁴ <guerrieri_diego@hotmail.com>

El inhibidor secretorio de proteasas leucocitario (SLPI) disminuye la proliferación linfocitaria y los niveles de IFN γ , aumentando los niveles de IL-10 e IL-4. El objetivo de este trabajo fue analizar la relevancia in vivo de estos hallazgos en un modelo de trasplante de piel murino y en modelos de hipersensibilidad retardada (HSR). Para el modelo de trasplante se utilizaron como receptores ratones BALB/c (H-2Kd) y el injerto de piel provino de orejas de ratones C57BL/6 (B6) (H-2Kb). Los animales receptores recibieron el tratamiento tres días previos al implante como condicionamiento, y diariamente a lo largo del experimento. Se consideró rechazo total cuando se perdió el 80% del implante. En los ensayos de HSR se evaluó la actividad del SLPI en dos modelos: i) células alogénicas (C57BL/6) para sensibilizar a ratones (BALB/c), y ii) 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (DNCEB). Trasplante de piel: al 8vo día se observó un rechazo del injerto del 60% para el grupo control, 20% para el grupo SLPI (s.c. 10 μ g) y 0% para los animales que recibieron tacrolimus (i.p. 40 μ g). Al 9no día, se observó un rechazo del 82% para el grupo control, 79% para el grupo SLPI, 20% para tacrolimus y 25% para tacrolimus+SLPI. Al día 11 el 90 % de los animales que recibieron tacrolimus rechazaron el injerto vs el 50% de los animales que recibieron tacrolimus+SLPI. En este último grupo, el 100% de rechazos se alcanzó al día 13. Ensayo de HSR: la administración de células alogénicas o DNCEB provocó un edema localizado en la oreja en los animales del grupo control. Sin embargo, el edema no se observó cuando los animales fueron tratados con SLPI desde 3 días previo a la etapa de sensibilización con el antígeno (p<0.05 datos apareados). Conclusión: El SLPI induce una mayor sobrevida de los implantes de piel alogénicos y disminuye la respuesta inflamatoria en dos modelos de HSR. Estos Resultados sugieren que el SLPI tiene actividad inmunosupresora y podría ser una nueva herramienta terapéutica.

078. (42) EFECTO DE XENOTRÁSPLANTE DE ISLOTES DE LANGERHANS ENCAPSULADOS COMO TRATAMIENTO PARA LA DIABETES EN RATAS CON SUMINISTRO MÍNIMO DE INSULINA. Shalom F.¹; Siciliano E.²; Potilinski M.³; Corti T.⁴; Abalovich A.⁵; Amorena C.⁶

CEsYMA - UnSaM^{1 2 3 4 5 6} <fabianshalom@gmail.com>

La diabetes mellitus es una patología crónica caracterizada por la desregulación de la concentración de la glucosa en sangre. En

el laboratorio se están aislando y encapsulando islotes de Langerhans de cerdo para el tratamiento de la diabetes tipo 1 con xenotrasplantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del xenotrasplante de islotes de Langerhans en la evolución de los parámetros metabólicos que caracterizan enfermedad en 5 ratas diabéticas y 5 diabéticas transplantadas. La diabetes fue inducida mediante inyección de streptozotocina. Las ratas fueron transplantadas a razón de 10.000 islotes por kg. de peso. Se evaluaron glucemia, acetonemia, y proporción de hemoglobina glicosilada durante 30 días sin regulación exógena de glucosa. Veinticuatro horas después de la inducción diabética todas las ratas presentaron hiperglucemias con valores mayores a 300mg/ml. La glucemia presentó valores altos en ambos grupos aunados de los cinco animales transplantados presentaron valores normales de 80mg/dl. Los animales diabéticos presentaron valores mayores a 500mg/dl en un 80% de las mediciones mientras que los transplantados en un 32%. Considerando los valores menores a 500mg/dl, los animales transplantados tuvieron menor glucemia que los diabéticos, 400 ± 11 mg/dl vs. 449 ± 7 mg/dl (p<0,05). La hemoglobina glicosilada aumentó llegando a los 21 días del trasplante a $7,7\% \pm 0,1$ y $6,9\% \pm 0,3$, diabéticos vs. transplantados (p<0,05). La acetonemia fue normal durante los primeros días post trasplante con valores de $1,2 \pm 0,3$ mM para los diabéticos y $0,6 \pm 0,1$ mM para los transplantados (p<0.05). Estos Resultados demuestran que si bien en estas condiciones no se pudo revertir la diabetes, el xenotrasplante mejoró el perfil de la enfermedad.

079. (746) ATENUACIÓN DE LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (EAE) POR ADMINISTRACIÓN ORAL DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN ENTRE EL PÉPTIDO DE SINAPSINA ABC Y LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA LÁBIL AL CALOR DE ESCHERICHIA COLI. Bibolini M.¹; Scerbo M.²; Roth G.³; Monferran C.⁴

Centro de Investigación en Química Biológica de Córdoba. CIQUIBIC. CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina^{1 2 3 4} <mbibolini@fcq.unc.edu.ar>

La EAE es una enfermedad inflamatoria demielinizante del sistema nervioso central que requiere la activación de células T autoreactivas principalmente contra la proteína básica de mielina (PBM). En el presente trabajo describimos el efecto de una proteína de fusión entre la subunidad B de la toxina lábil al calor de E. coli (LTB) y los dominios ABC de sinapsina la de rata (LTBABC) en la EAE. Las proteínas LTBABC y LTB recombinantes obtenidas en E. coli fueron purificadas y renaturalizadas observándose que la afinidad de LTBABC por su receptor GM1 en células HT29 fue 5-10 veces menor que la de LTB. Teniendo en cuenta esta relación se administraron oralmente 6 dosis de 100 μ g de LTBABC, 2 μ g de LTB o diluyente a ratas Wistar luego de la inducción activa de la enfermedad con mielina bovina en adyuvante de Freund completo. A los 9 días pos inducción (dpi) se realizó la reacción de DTH contra la PBM y a los 11-14 dpi se extrajeron células mononucleares (CMN) de ganglios poplíteos, nódulos linfáticos mesentéricos y bazo para ensayos de proliferación contra PBM y determinación de citoquinas (INF- γ e IL10) en los sobrenadantes de cultivo. El tratamiento con LTBABC disminuyó el grado de severidad de la enfermedad a los 12 y 13 dpi, la DTH y la proliferación de CMN específicas contra PBM con respecto al grupo control y al tratado con LTB. Además, los animales tratados con LTBABC mostraron menores niveles de INF- γ e incrementos de IL10 en los tres órganos respecto del grupo control y el tratado con LTB. Estos Resultados indican que la administración oral de LTBABC luego de la inducción de la EAE reduce los síntomas clínicos de la EAE a los 12 y 13 dpi a través de la generación de tolerancia periférica. Los Resultados presentados sugieren que péptidos de sinapsina conjugados a la subunidad B de la toxina lábil al calor de E. coli tienen un rol protector con potencial terapéutico para el tratamiento de la EAE como de la múltiple esclerosis.

080. (597) CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS CULTIVADAS CON ANTÍGENOS DE FASCIOLA HEPÁTICA Y CPG INDUCEN UN PERFIL REGULADORIO CAPAZ DE DISMINUIR LA INFLAMACIÓN EN UN MODELO DE ARTRITIS REUMATOIDEA. Carranza F.¹; Falcon C.²; Cervi L.³

Facultad de Ciencias Químicas - Dpto Bioquímica Clínica (CIBICI-CONICET) Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3} <fcarranza@fcq.unc.edu.ar>

Es conocido que células dendríticas murinas (CD) inmaduras o semimaduras pueden inducir tolerancia. Esta propiedad permitió su uso como una herramienta terapéutica para inhibir respuestas inflamatorias como las que ocurren en enfermedades autoinmunes. Resultados previos muestran que, un extracto total de Fasciola hepática (TE) disminuye la producción de citoquinas inflamatorias de CD estimuladas con ligandos para TLR. En el modelo murino, artritis inducida por colágeno (AIC), se ha demostrado que CpG, ligando para TLR9, es clave en la determinación de la severidad de la inflamación en esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estudiar la capacidad de CD estimuladas con TE, en presencia o ausencia de CpG, para inducir un perfil regulatorio y modular los síntomas clínicos en el modelo de AIC. Las CD de médula ósea de ratones DBA/1J cultivadas con TE junto con CpG, mostraron una producción incrementada de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β , $p < 0.05$), un fenotipo de activación intermedio y niveles bajos de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-12, IL-23, $p < 0.05$), con respecto a las CD cultivadas con CpG. El modelo de AIC se desarrolló mediante inyecciones s.c. de colágeno bovino tipo II (CII) en AFC (día 0 y 21) en ratones DBA/1J. Doce días posteriores a la primera inmunización, CD cultivadas con medio control, TE, CpG y CpG/TE en presencia de CII se inocularon i.p. Durante 23 días se analizó macroscópicamente la progresión de la inflamación en las extremidades. Los ratones que recibieron CD tratadas con CpG/TE presentaron un menor índice artrítico ($p < 0.05$, en los días 14, 17, 20 y 23), una menor incidencia y severidad ($p < 0.05$) en las articulaciones con respecto a los animales no inmunizados con CD. Nuestros Resultados sugieren que el tratamiento de CD con TE/CpG genera en las CD un perfil regulatorio, capaz de modular negativamente los síntomas clínicos de AIC, probablemente mediado por los altos niveles de IL-10 y TGF- β , secretado por esta células.

ONCOLOGIA 1

081. (103) EFECTO INHIBITORIO DE PUFAS Y MELATONINA DIETARIA SOBRE EL DESARROLLO DE UN ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO. García C.¹; Lamarque A.²; Berra M.³; Silva R.⁴; Pasqualini M.⁵

I^a Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, UNC; Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC.¹; Cátedra de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC.²; I^a Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, UNC^{3 4 5} <caroafs@hotmail.com>

Introducción: Los factores dietarios como los ácidos grasos poli insaturados (PUFAs) y antioxidantes como la melatonina afectan la oncogénesis pero sus mecanismos aún no han sido completamente dilucidados. OBJETIVOS: Evaluar el efecto sinérgico de la melatonina y PUFAs w-6 y w-3, aportados por una dieta suplementada con harina y aceite de nuez, y de algunos eicosanoides derivados a través de las vías de las lipoxigenasas (LOX) y ciclooxigenasa (COX), sobre el desarrollo de un adenocarcinoma de mama murino (M3). Materiales y Métodos: Ratones Balb/c fueron distribuidos en tres grupos alimentados con una dieta base enriquecida: Grupo control: (GrC) 6% de aceite de maíz; Grupo Melatonina Farmacológica (MF): igual que GrC más melatonina en el agua (3mg/l) y Grupo Nuez (GN): 6% de aceite de Nuez y

8% de harina de nuez. Se analizó el perfil lipídico de membranas de 108 células neoplásicas (CN) por GC. Los eicosanoides de 108 CN via COX (12-HHT) y via LOX (12-HETE, 15-HETE y 13-HODE) por HPLC. La apoptosis y necrosis de las CN se evaluaron por citometría de flujo (CF) con Anexina V-FITC y propidio iodado, respectivamente. La infiltración leucocitaria (IL) se analizó empleando anti-CD3-FITC a través de CF. Los Resultados se analizaron con ANOVA y por un MLG. RESULTADOS: Las membranas de CN de los grupos MF y GN presentaron menores % de ácido linoleico y mayores % respecto al GrC. El 12- HHT y el 13- HODE fueron significativamente menores en los grupos MF (7.16; 0.51 ng) y GN (21.49; 0.86 ng) que el GrC (61.34; 13.7ng) $p < 0.001$. La apoptosis fue mayor en MF (42.88%) y GN (47.85%) que en GrC (34.31%). La IL fue mayor en MF (68.56 %) y GN (61.25%) que en GrC (41.47%). CONCLUSION: La melatonina dietaria ejerció un efecto inhibitorio y del desarrollo tumoral a través de la modulación de los PUFAs y eicosanoides derivados.

082. (121) FRACCIONAMIENTO DE LUZ EN TERAPIA FOTODINÁMICA A PARTIR DE ALA IN VIVO E IN VITRO. Rodríguez L.¹; Di Venosa G.²; Buijtin H.³; Mamone L.⁴; Robinson D.⁵; Battlle A.⁶; Casas A.⁷

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias^{1 2 3}; Center for Optical Diagnostics and Therapy, Department of Radiation Oncology, Erasmus MC, Rotterdam, The Netherlands^{4 5}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias^{6 7}. <lorenagabrielarodriguez@yahoo.com.ar>

La Terapia fotodinámica (TFD) empleando ácido 5-amino-levúlico (ALA) como precursor del fotosensibilizante Protoporfirina IX ha sido empleada desde el principio de la década del 90 en el tratamiento de varios tipos tumorales, especialmente superficiales. Algunos estudios indican que si la luz activadora del proceso fotosensibilizante se administra en dosis fraccionadas, se aumentaría la eficiencia de la terapia debido a que el intervalo entre dosis lumínicas permitiría la reoxigenación del tumor, y consecuentemente mayor generación de especies reactivas de oxígeno. Como modelo in vivo se empleó rhabdomyosarcoma de rata con iluminación transdérmica. Un grupo de ratas recibió una única dosis de luz de 200 J/cm² luego de 2,5 hs de la administración i.p. de ALA, y un segundo grupo recibió dos dosis de 100 J/cm² divididas en 1 h y 2,5 hs post inyección de ALA. Este último esquema de luz demoró significativamente el tiempo de duplicación tumoral (18,9 \pm 2,9 días) respecto al grupo que recibió una única dosis lumínica (8,6 \pm 0,8 días). También se observó un aumento en la concentración de Protoporfirina IX luego de la iluminación, en tumor, tejido normal, arteriolas y vénulas, debido a una re-síntesis de dicho fotosensibilizante. Para su cuantificación se emplearon cámaras de observación inyectadas subcutáneamente, y el seguimiento de la concentración de Protoporfirina IX se realizó mediante la emisión de fluorescencia, que fue registrada en una cámara CCD. Sin embargo, in vitro el esquema de luz fraccionada no mejoró la efectividad de la TFD ni en el adenocarcinoma mamario murino LM3, ni en la línea de queratinocitos PAM212 ni en la línea microendotelial vascular HMEC-1, demostrando que no se trata de un proceso simple de re-síntesis local de Protoporfirina IX en un tipo celular particular, sino que la arquitectura tumoral y el estroma estarían probablemente involucrados en el proceso.

083. (125) EFECTO ANTITUMORAL DE UNA NUEVA FTALOCIANINA CATIÓNICA CON POTENCIAL USO EN TERAPIA FOTODINÁMICA. Marino J.¹; García Vior M.²; Dixelio L.³; Awruch J.⁴; Roguin L.⁵

IQUIFIB, Departamento de Química Biológica, FFyB, UBA¹; Departamento de Química Orgánica, FFyB, UBA²; INQUIMAE, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, FCEyN, UBA³; Departamento de Química Orgánica, FFyB, UBA⁴; IQUIFIB, Departamento de Química Biológica, FFyB, UBA⁵ <julietamarino@yahoo.com.ar>

La terapia fotodinámica (PDT) combina el uso de un fotosensibilizador y luz visible para el tratamiento de tumores. Si

bien las ftalocianinas son compuestos promisorios para ser utilizados en este tipo de terapia, poseen alta tendencia a agregarse en soluciones acuosas. Con el propósito de mejorar las propiedades anfífilicas, se sintetizó una ftalocianina catiónica conteniendo un grupo amino cuaternario (Pc). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de esta Pc sobre el crecimiento de la línea tumoral KB (carcinoma nasofaríngeo humano). Demostramos que la citotoxicidad del compuesto fue dependiente de la dosis de energía aplicada. El valor de IC50 obtenido fue $2,7 \pm 0,6 \mu\text{M}$ con una dosis de luz de $4,7 \text{ J cm}^{-2}$ y longitudes de onda entre 630-700 nm. No se observó efecto citotóxico de Pc en la oscuridad. Cuando se estudió la captación de la ftalocianina por las células KB observamos un máximo de incorporación luego de 4h de incubación. Con el propósito de determinar la localización subcelular, se evaluó por microscopía confocal la fluorescencia intrínseca del compuesto en presencia de marcadores de mitocondrias y lisosomas. Las imágenes obtenidas mostraron que, en ausencia de luz, Pc se distribuye en el citosol y muestra preferentemente una ubicación lisosomal. Luego de exponer las células a la luz, Pc se redistribuye y se localiza también en el núcleo. Con el fin de caracterizar el mecanismo de acción antitumoral, evaluamos si Pc induce una respuesta apoptótica luego de la irradiación. En estas condiciones demostramos un aumento significativo de la actividad de caspasa 3 y el clivaje de la proteína PARP (Poli (ADP-ribosa) polimerasa), un sustrato de caspasa 3 involucrado en la apoptosis. En su conjunto los Resultados obtenidos indican que la ftalocianina catiónica en estudio se comporta in vitro como un potente agente antitumoral, capaz de inducir apoptosis. La eficacia de este compuesto en PDT será posteriormente evaluada en modelos murinos in vivo.

- 084. (166) ROL ANTITUMORAL DE INTERFERÓN ALFA: DISMINUCIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT/ β -CATENINA EN HEPATOCITOS AISLADOS DE HÍGADOS PRENEOPLÁSICOS DE RATA.** Ceballos M.¹; Parody J.²; Alvarez M.³; Quiroga A.⁴; Ingaramo P.⁵; Carnovale C.⁶; Carrillo M.⁷

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)^{1 2 3 4 5 6 7} <ceballos@ifise-conicet.gov.ar>

El Interferón alfa (IFN- α) se utiliza como terapia en el tratamiento de infecciones virales y desórdenes oncológicos. Numerosos estudios informan que la incidencia del Hepatocarcinoma Celular (HCC) podría ser reducida luego de la terapia con IFN- α en pacientes con hepatitis B o C crónicas. Sin embargo, el beneficio de este tratamiento en HCC es aún controversial. La vía canónica Wnt/ β -catenina se encuentra frecuentemente activada en HCC e involucra la acumulación citosólica de β -catenina y su migración al núcleo, donde promueve la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular. La mayoría de los estudios de esta vía se efectuaron en HCC humanos o en modelos animales con un grado avanzado de esta enfermedad. Decidimos, por lo tanto, estudiar el estado de la vía en una etapa temprana de la carcinogénesis hepática y el efecto del IFN- α sobre la misma. Empleamos hepatocitos aislados de animales controles (C) y con preneoplasia hepática (IP). Los hepatocitos fueron cultivados con IFN- α 2b o dejados sin tratar durante 2 y 10 h. Por inmunoblotting observamos a tiempo cero una disminución en los niveles proteicos de p-Ser33- β -catenina en citosol (-80%*) y de β -catenina total en membrana plasmática (-80%*), aumento del receptor Frizzled-7 en membrana plasmática (+100%*) y ausencia de cambio de β -catenina total en lisado, en los animales IP respecto de C. A las 2 y 10 h apreciamos un aumento de p-Ser33- β -catenina en citosol (+180%*, +120%*) y ausencia de cambio de β -catenina total en membrana y lisado en los hepatocitos IP tratados con IFN- α 2b respecto de los IP sin tratar (*p<0,05). Estos Resultados indican la activación de la vía Wnt/ β -catenina en nuestro modelo IP y la atenuación de la misma durante el tratamiento con IFN- α 2b. Resultados preliminares con líneas celulares de hepatoma humano (HepG2) ratifican estos datos. Concluimos entonces, que el efecto antitumoral del IFN- α 2b se debe, en parte, a la atenuación de la activación de la vía Wnt/ β -catenina.

- 085. (246) CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA METALOTIONEÍNA 1G (MT1G) EN EL EPITELIO DE TUMORES COLORRECTALES HUMANOS.** Arriaga J.¹; Levy E.²; Bravo A.³; Morales Bayo S.⁴; Barrio M.⁵; Roberti M.⁶; Aris M.⁷; Huertas E.⁸; Larripa I.⁹; Mordoh J.¹⁰; Bianchini M.¹¹

Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA), Ciudad de Buenos Aires^{1 2}; HIGA, Eva Perón, San Martín, Provincia De Buenos Aires³; Hospital Municipal Prof. Dr B. A. Houssay, Vicente López⁴; Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA), Ciudad de Buenos Aires^{5 6}; Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, Ciudad De Buenos Aires⁷; Instituto Médico Especializado Alexander Fleming, Ciudad De Buenos Aires⁸; Academia Nacional de Medicina, IHEMA, Buenos Aires.⁹; Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, Ciudad De Buenos Aires; Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA), Ciudad de Buenos Aires¹⁰; Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA), Ciudad de Buenos Aires¹¹ <jm_arriaga@yahoo.com.ar>

Las metalotioneínas (MT) constituyen una familia de pequeñas proteínas ricas en cisteína, que cumplen una variedad de funciones asociadas al metabolismo de metales, a la inflamación y también al proceso oncogénico. En el ser humano existen cuatro isoformas, estando la MT1 compuesta por 9 subtipos funcionales, entre ellos la MT1G. En cáncer colorrectal, si bien se sabe que estas proteínas se encuentran sub-expresadas con respecto a la mucosa normal adyacente, la falta de anticuerpos capaces de discriminar entre sus isoformas hace que no se conozca su expresión individual. Previamente en nuestro laboratorio realizamos un estudio de microarreglos de cDNA, en el cual el cuarto transcripto de mayor sub-expresión tumoral resultó ser la MT1G. En el presente trabajo, validamos la sub-expresión tumoral de la MT1G por qRT-PCR en muestras enteras de tumores y mucosas normales del mismo paciente, obteniendo sub-expresión tumoral en 3/7 casos (media=175 veces), sin alcanzar diferencias significativas. Sin embargo, el análisis de las células epiteliales aisladas por microdissección láser muestra sub-expresión significativa (p<0,05) en 7/9 casos (media=121 veces). Por inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal anti-MT (clon E9, DAKO), corroboramos la sub-expresión de las MT1 y 2 en 16/17 tumores y 7/13 adenomas, y confirmamos la correlación entre la expresión proteica de éstas MTs y el mRNA de MT1G. Sin embargo, en contraste con lo observado in vivo, el análisis de 5 líneas colorrectales muestra que aquellas líneas positivas por inmunocitoquímica para MT1 y 2 son negativas para MT1G, y viceversa, indicando que probablemente haya otras isoformas alteradas en cáncer colorrectal. En conclusión, demostramos que la MT1G es una de las metalotioneínas sub-expresada in vivo en el epitelio de tumores colorrectales con respecto a la mucosa normal adyacente. Será interesante estudiar el rol que dicha sub-expresión pueda tener en la oncogénesis colorrectal y su posible valor pronóstico.

- 086. (278) INFLUENCIA DE LOS ADIPOCITOS SOBRE CÉLULAS EPITELIALES DE CÁNCER DE PRÓSTATA.** Tesone A.¹; Sacca P.²; Pistone Creydt V.³; Jalón M.⁴; Mazza O.⁵; Calvo J.⁶

Laboratorio de Matriz Extracelular y Proteoglicanos, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina^{1 2 3}; Cátedra de Urología, Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Buenos Aires, Argentina^{4 5}; Laboratorio de Matriz Extracelular y Proteoglicanos, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET, Buenos Aires, Argentina; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA⁶ <jtesone@dna.uba.ar>

El tejido adiposo se dispone en la periferia de la próstata y en la mayoría de los sitios metastásicos, aunque no está claro aún

el papel del mismo en el cáncer de próstata (CaP). Exploramos el efecto de factores solubles de adipocitos en el comportamiento de células tumorales prostáticas, LNCaP (sensible a andrógenos) y PC3 (insensible a andrógenos). Obtuvimos medio condicionado de preadipocitos 3T3-L1 (preA1) y de preadipocitos de cultivo primario de tejido adiposo periprostatico de un paciente con CaP (preA2). Los preadipocitos fueron diferenciados a adipocitos y el medio resultante fue recolectado (A1 y A2, respectivamente). LNCaP y PC3 fueron incubadas con los preAs y As a 24 y 48 h. Cuantificamos los niveles de proliferación (por MTS), migración (por cicatrización de herida) y actividad de metaloproteasas (por zimografía). El A1 estimuló la proliferación de LNCaP a 24 y 48 h (40%, 87%, $P < 0,001$ vs control) y el efecto fue mayor que con preA1 a los mismos tiempos ($P < 0,01$). Los preA2 y A2 sólo promovieron la proliferación de LNCaP a 24 h (21%, 11%, $P < 0,001$ y $P < 0,05$ vs control, respectivamente). La incubación de PC3 con preA1 y A1 estimuló su proliferación a 24 h (41%, 44%, $P < 0,001$ vs control), mientras que la incubación con preA2 y A2 estimuló la proliferación después de 48 h de exposición a dichos medios (13%, 22%, $P < 0,05$ y $P < 0,001$ vs control, respectivamente). La exposición de PC3 a A1, preA2 y A2 provocó mayor migración celular (42%, 33%, 46%, $P < 0,001$ vs control). Detectamos altos niveles de actividad de pro-MMP9 en medios derivados de incubar PC3 con preA1, A1, preA2 o A2 (32%, 51%, 50%, 97%, respectivamente, $P < 0,05$ preAs y $P < 0,001$ As vs control). Contrariamente, no observamos efectos de los medios analizados sobre la migración y actividad de metaloproteasas en LNCaP. Por lo tanto, los factores solubles secretados por preadipocitos y adipocitos podrían modular diferencialmente, según la sensibilidad a andrógenos de las células de CaP, la cascada metastásica.

- 087. (282) ESTUDIOS IN VITRO DE LOS EFECTOS RADIOBIOLÓGICOS DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT).** Dagrosa A.¹; Thomasz L.²; Pontiggia O.³; Perona M.⁴; Thorp S.⁵; Simian M.⁶; Juvenal G.⁷; Pisarev M.⁸

Comisión Nacional de Energía Atómica^{1 2}; Instituto de Oncología "Angel Roffo"³; Comisión Nacional de Energía Atómica^{4 5}; Instituto de Oncología "Angel Roffo"⁶; Comisión Nacional de Energía Atómica⁷; Comisión Nacional de Energía Atómica; Facultad de Medicina (UBA)⁸ <dagrosa@cnea.gov.ar>

BNCT es una diferencia de la radioterapia convencional una terapia de alta transmisión lineal de energía (LET) que utiliza compuestos enriquecidos con ¹⁰B y neutrones. En estudios previos demostramos un aumento en la formación de micronúcleos como indicador de lesiones cromosómicas en función de la dosis física absorbida y una disminución de la sobrevida en las células irradiadas por BNCT en comparación a las irradiadas con neutrones solos (sin boro) o con gamma. En este trabajo evaluamos como mecanismo de respuesta al daño celular por radiación, la expresión de proteínas que intervienen en la regulación del ciclo celular. Las células de la línea de cáncer de colon humano (HT29) fueron distribuidas en los siguientes grupos: 1) ¹⁰BPA (borofe-nilalanina) (10 ppm) + neutrones; 2) ¹⁰BOPP (2,4-bis (a,b-dihidroxyethyl)-deutero-porphyrin IX) (10 ppm) + neutrones; 3) neutrones; 4) gamma. La irradiación fue realizada con el haz de neutrones del reactor nuclear RA3 (flujo = 7.5 ¹⁰n/cm² seg) y con ⁶⁰Co (1Gy/min) de manera de obtener dosis físicas de 3 Gy ($\pm 10\%$). Se estudiaron a distintos tiempos post irradiación (24 y 48 h) la expresión de p53 y p27/Kip1 por Western Blot. La radiación de alto LET proveniente de la reacción BNCT usando ¹⁰BPA o ¹⁰BOPP produjo un aumento de p53 relativo al control a las 24 h que se mantuvo a las 48 h. Por el contrario en los grupos irradiados con gamma o neutrones solo se observó un aumento significativo de p53 recién a las 48 h. La expresión de p27/Kip1 mostró una down regulation de todos los grupos irradiados, a los dos tiempos siendo significativamente mayor en los grupos irradiados por BNCT y a las 24 h. Estos Resultados preliminares sugieren diferentes respuestas radiobiológicas para las células expuestas a radiaciones provenientes de BNCT en comparación a las irradiadas con el haz de neutrones solo y con gamma. Estudios futuros permitirán establecer la radiosensibilidad de BNCT asociada al ciclo celular.

- 088. (299) TERAPIA DEL MELANOMA ESPONTÁNEO CANINO CON GEN SUICIDA: CORRELACIONES ENTRE LOS TUMORES IN VIVO Y SUS RESPECTIVOS ESFEROIDES MULTICELULARES IN VITRO.** Gil Cardeza M.¹; Villaverde M.²; Fiszman G.³; Altamirano N.⁴; Riveros M.⁵; Cwirenbaum R.⁶; Glikin G.⁷; Finocchiaro L.⁸

Unidad de Transferencia Génica, Área Investigación, Hospital de Oncología^{1 2 3 4 5 6 7 8} <lourgilcardeza@hotmail.com>

Con el objetivo de validar el uso de esferoideas multicelulares para predecir la eficacia de la terapia con el gen suicida de la timidina quinasa del herpes virus simplex/ganciclovir (HSVtk/GCV) en los respectivos tumores in vivo, se establecieron quince líneas derivadas de tumores de melanoma caninos extirpados por cirugía. Tres líneas celulares lipofectadas con el gen de HSVtk no fueron sensibles al GCV en ninguna configuración espacial, otras cinco mostraron sensibilidades similares tanto en monocapa como en esferoideas y sólo una línea resultó ser más sensible en esferoideas. Otras seis líneas celulares presentaron un fenotipo de resistencia multicelular (RMC) al ser cultivadas como esferoideas. La relación inversa ($R^2=0,81$) entre el RMC y el porcentaje de supervivencia de las monocapas a HSVtk/GCV sugiere que una de las posibles causas del RMC sería la rápida repoblación celular luego del tratamiento con gen suicida. La alta correlación del RMC con el crecimiento radial de los esferoideas ($R^2=0,98$) y con el índice mitótico de los respectivos tumores originales ($R^2=0,93$) apoya la teoría de re-crecimiento. Un descubrimiento interesante fue la alta correlación observada entre la sensibilidad a HSVtk/GCV de los tumores in-vivo y los correspondientes esferoideas ($R^2 = 0,85$) que no se produjo con las respectivas monocapas ($R^2=0,29$). Estos Resultados respaldan la implementación de los esferoideas como un modelo experimental más real para optimizar y predecir la respuesta in vivo de los respectivos tumores a las estrategias terapéuticas.

- 089. (311) CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIANGIÓGENICAS DE UN COMPUESTO PEPTÍDICO INHIBIDOR DE LA ACTIVIDAD DE LA CASEÍNA KINASA² (CK²).** Benavent Acero F.¹; Perea S.²; Perera Y.³; Acevedo B.⁴; Gomez R.⁵; Gomez D.⁶; Alonso D.⁷; Farina H.⁸

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina¹; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba^{2 3 4}; Laboratorio Elea, Buenos Aires, Argentina⁵; Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Buenos Aires, Argentina^{6 7 8} <ferbenavent@gmail.com>

La enzima CK2, es una serina/treonina quinasa que participa en una gran variedad de funciones celulares. La sobreexpresión de esta quinasa se encuentra asociada al desarrollo de distintas variantes tumorales. Anteriormente demostramos que el péptido cíclico denominado CIGB-300 (P15-Tat) induce apoptosis en células tumorales y disminuye el crecimiento tumoral al ser administrado en modelos murinos. En este trabajo exploramos los efectos del péptido CIGB-300 sobre los principales eventos del proceso angiogénico utilizando como modelo in vitro a las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC). Como primer punto se evaluó la sensibilidad in vitro de las células endoteliales al compuesto, encontrándose valores de IC50 de entre 91,5 y 121 μ M en períodos de tratamiento de 24 a 72 horas. Por medio de estudios de inmunofluorescencia se corroboró la rápida penetración intracelular del péptido y su localización en citoplasma y núcleo. El compuesto CIGB-300 fue capaz de inhibir la migración de las células endoteliales en las dosis evaluadas de 10 a 50 μ M ($p < 0,01$, Dunnett test) y la formación de cordones vasculares desarrollados por las células HUVEC crecidas sobre Matrigel® ($p < 0,01$, ANOVA). Mediante el uso de microarreglos se estudió la expresión de 113 genes asociados al fenómeno angiogénico. Se encontraron descensos significativos en los niveles del ARNm de los genes KDR, NOTH4, JAG1 y PGF en las células HUVEC tratadas con CIGB-300 (50 μ M). Por último, con el fin de evaluar la actividad antiangiogénica in vivo del compuesto se utilizó el

modelo de membrana corioalantoidea de embriones de pollo. A una dosis de péptido de 0,25 mg/kg (3,2 mM), se obtuvo una disminución significativa del número de vasos en el grupo tratado ($p < 0.05$, t-test). Los Resultados obtenidos sugieren un efecto antiangiogénico directo del compuesto CIGB-300 sobre endotelio humano.

090. (356) EFECTO ANTITUMORAL DE UN NUEVO ANÁLOGO DE VASOPRESINA EN UN MODELO PRECLÍNICO DE CARCINOMA MAMARIO MURINO. Garona J.¹; Ripoll G.²; Iannucci N.³; Cascone O.⁴; Gomez D.⁵; Alonso D.⁶

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes^{1 2}; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{3 4}; Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes^{5 6} <juan_garona@hotmail.com>

La desmopresina (DDAVP) es un nonapéptido sintético derivado de la vasopresina con propiedades antimetastásicas. En la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales, desarrollamos un nuevo análogo peptídico por sustitución racional en las posiciones 4 y 5, denominado VQ (1-deamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina). Investigamos la acción antitumoral in vivo del análogo VQ, con o sin la aplicación de ciclos de quimioterapia, utilizando el modelo F3II de carcinoma mamario, un tumor altamente agresivo en ratones singénicos Balb/c. Los animales fueron inoculados con 2×10^5 células F3II en el espacio subcutáneo del flanco y, luego de la toma tumoral, se trataron con 3 dosis semanales del compuesto VQ (0,3 µg/kg, i.v.), sumado o no a ciclos semanales de carmustina (20 mg/kg, i.p.). El tratamiento durante al menos 5 semanas con VQ redujo el volumen tumoral en un 40%, produciendo una acción aún mayor combinando el análogo peptídico a los ciclos de carmustina (Control= 1547 ± 322 ; Carmustina= 955 ± 167 ; Carmustina+VQ= 639 ± 42 mm³; $p < 0,001$). Además, la administración de VQ previno por completo la progresión metastásica espontánea hacia pulmón, tanto en combinación a carmustina como aplicado como único tratamiento. Se exploró también el efecto de VQ sobre la formación de metástasis experimentales, administrando dosis de 0,3 µg/kg al momento de la inyección de 2×10^5 células F3II en la vena lateral de la cola. La aplicación de VQ redujo significativamente la colonización metastásica en pulmón (Control= 90 ± 18 ; VQ= 34 ± 13 nódulos/ratón; $p < 0,001$). Los datos muestran que el nuevo análogo peptídico VQ derivado de DDAVP despliega una interesante acción antitumoral en un modelo preclínico de cáncer de mama.

091. (362) RELOCALIZACIÓN DE PROTEÍNAS MAGE-A EN RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA DE P53. Toledo M.¹; Peche L.²; Laiseca J.³; Galigniana M.⁴; Schneider C.⁵; Monte M.⁶

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA¹; LNCIB, Trieste, Italia²; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{3 4}; LNCIB, Trieste, Italia⁵; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA⁶ <mftoledo@qb.fcen.uba.ar>

El factor de transcripción y oncosupresor p53 se activa en respuesta a distintos estímulos que pongan en peligro la estabilidad genómica induciendo arresto celular y apoptosis. La vía más estudiada de activación de p53 es la respuesta al daño al ADN mediante agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, p53 también se activa para inducir senescencia, un estado de arresto celular irreversible, a través de PML3, o como respuesta a la activación de oncogenes, mediante la expresión p14ARF. PML3 es una proteína que localiza en los cuerpos nucleares (NBs) y p14ARF en los nucléolos (No). Nuestros estudios sobre la interferencia Mage-A2 (miembro de las proteínas tumorales de la familia MAGE-A) en estas vías de activación de p53 indican un comportamiento común: la expresión de PML3 o p14ARF causa la relocalización de Mage-A2 hacia estas estructuras sub-nucleares (NBs o No). Observamos que la expresión de PML3 causa la activación de p53, que Mage-A2 cambia su localización del núcleo a los NBs y

reprime fuertemente esta función de PML3. Por el contrario, Mage-A4 (70% de homología con Mage-A2) que posee una localización distribuida entre el núcleo y el citoplasma, no colocaliza con PML3 ni reprime p53. Esta función no depende de su localización celular ya que Mage-A4-NLS, que contiene una secuencia de localización nuclear (NLS), se comporta como Mage-A4. Por otro lado, la expresión de p14ARF revierte la represión que Mage-A2 ejerce sobre p53. Estudios de inmunofluorescencia indican que p14ARF causa la relocalización de Mage-A2 (y otros miembros MAGE-A) a los nucléolos, sugiriendo que el "secuestro" de Mage-A2 a estos compartimentos sub-nucleares podría formar parte del mecanismo de p14ARF para impedir la represión de p53. Nuestros Resultados sugieren que Mage-A2 puede interferir en la senescencia inducida por el eje PML3/p53, mientras que p14ARF se mostró capaz de controlar la función represora de Mage-A2 sobre p53 mediante su relocalización a los nucléolos.

092. (383) PAPEL DEL CFTR EN LA RESISTENCIA A IMATINIB INDUCIDA EN CELULAS LEUCEMICAS K562. Assef Y.¹; Kotsias B.²

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA - CONICET^{1 2} <yaniasssef@yahoo.com.ar>

La multidroga resistencia (MDR) es una de las razones principales del fracaso de la quimioterapia y está asociada a la sobreexpresión de la P-glicoproteína (P-gp) en las células tumorales. La expresión de P-gp en células leucémicas humanas K562 confiere resistencia al imatinib, entre otras drogas. Este efecto es revertido por inhibición de la vía del NF-κB con BAY 11-7082 que está asociado a una disminución de P-gp. Como P-gp y el canal de cloruro mutado en la fibrosis quística CFTR, poseen gran homología estructural nuestro objetivo fue evaluar la posible contribución del CFTR en el fenómeno de resistencia a drogas. Para determinar si NF-κB también está involucrado en la expresión de CFTR, incubamos células K562 y sus derivadas MDR positivas (K562-Vinc) con BAY (2,5 µM, 72h). Observamos por western blot que la inhibición de NF-κB disminuye la expresión de la forma madura de CFTR en las células K562-Vinc, mientras que no se observan cambios en las K562. Para evaluar el efecto del CFTR en cuanto al incremento de la sensibilidad a drogas citostáticas inducida por BAY estimamos la proliferación celular luego del tratamiento con concentraciones crecientes de imatinib en presencia o ausencia de BAY y de bloqueantes de canales de Cl. La coadministración de BAY no modificó la sensibilidad al imatinib en las células K562 mientras que incrementó su citotoxicidad en K562-Vinc siendo las IC₅₀ 2.2 ± 0.9 y 1.0 ± 0.7 µM en presencia y ausencia del inhibidor. El tratamiento con DPC, un bloqueante de canales de Cl, no alteró la sensibilidad al imatinib con índices de resistencia similares en presencia o ausencia de DPC para ambos tipos celulares. Nuestros Resultados indican que el incremento de la citotoxicidad del imatinib inducida por BAY en las células K562 está mediado por P-gp mientras que la actividad como canal del CFTR no estaría contribuyendo en este fenómeno aunque no podemos descartar un efecto del CFTR independiente de su actividad como canal iónico.

093. (396) BIOMARCADORES LIPÍDICOS EN SALIVA DE SUJETOS PORTADORES DE TUMORES PROSTÁTICOS Y SU RELACIÓN CON LA DIETA. Defagó M.¹; Valentich M.²; Pasqualini M.³; Muñoz S.⁴; Villarreal C.⁵; Eynard A.⁶; Actis A.⁷

Escuela de Nutrición e Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba¹; Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba^{2 3 4}; Servicio de Urología, Hospital Tránsito Cáceres de Allende, Córdoba⁵; Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba⁶; Cátedra B de Anatomía, Facultad de Odontología e Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba⁷ <danieladefago@hotmail.com>

Introducción: Los tumores de próstata representan la primera causa de muerte en hombres en Argentina. La dieta es uno de los factores que influye en la tumorigénesis prostática y se ha sugerido una relación inversa entre la ingesta de ácidos grasos (AG) poliinsaturados ω -3 y el riesgo de desarrollar este tipo de neoplasia. Los AG esenciales son precursores de eicosanoides (EI) que participarían activamente en el proceso tumoral. La saliva humana, fluido biológico de fácil acceso, muestra una correlación entre los niveles de AG y EI con el tipo de AG consumidos. **Objetivo:** Determinar el perfil de AG y EI salivales en sujetos portadores de tumores prostáticos en relación con la ingesta. **Diseño del estudio:** Se formó el Grupo Tumores de Próstata (GP) con 16 sujetos con diagnóstico incidente de tumores prostáticos benignos y malignos y el Grupo Control (GC) con 19 sujetos aparentemente sanos asistentes a dos hospitales de la ciudad de Córdoba, Argentina. La participación fue voluntaria y los aspectos éticos fueron aprobados por los respectivos Comités de Investigación en Salud hospitalarios. El consumo de AG (mg/día) fue obtenido mediante encuestas validadas de frecuencia de consumo alimentario cuali-cuantitativo, procesadas con el programa Interfood v.1.3. Las muestras de saliva fueron obtenidas según normas internacionales y los AG salivales fueron determinados y cuantificados por cromatografía de gas (mg/ml). Los EI salivales fueron analizados por HPLC (ng/ml). Los Resultados se analizaron con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. **Resultados:** El consumo de AG no presentó diferencias entre los grupos estudiados, pero la saliva del GC mostró una concentración superior del AG 18:1 ω -9 (18.8) y del metabolito 15-HETE (6.98) en relación al GP (6.5-4 y 5.40, respectivamente) ($p < 0.05$). **Conclusiones:** La mayor proporción de 18:1 ω -9 y de 15-HETE en saliva podría comportarse como un marcador diferencial entre pacientes portadores de tumores prostáticos y sujetos sanos.

094. (425) LA RE-EXPRESIÓN DE LA ENZIMA QUE CATALIZA LA SÍNTESIS DE GANGLIÓSIDOS N-GLICOLILADOS MODULA LA TUMORIGENICIDAD EN LOS TUMORES MURINOS B¹⁶ Y F^{3II}. Segatori V.¹; Otero L.²; Gomez D.³; Alonso D.⁴; Gabri M.⁵

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes^{1 2 3 4 5}. <mrgabri@gmail.com>

Los gangliósidos (GLS) son glicolípidos que presentan uno o más residuos de ácido siálico. El NeuGcGM3 es un GLS con un único ácido siálico N-glicolilado (NeuGc), de relevancia como antígeno en ciertos tumores humanos. En mamíferos, la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa (CMAH) cataliza la formación de NeuGc a partir de su variante acetilada (NeuAc). Muchas líneas tumorales murinas anulan la síntesis de NeuGcGM3, como es el caso de los modelos B16 de melanoma en ratones C57BL/6 y F3II de carcinoma mamario en Balb/c, a través del silenciamiento de la expresión de la enzima. Mediante técnicas de clonación de la secuencia CMAH y transfección por lipofección, desarrollamos poblaciones con expresión estable de CMAH denominadas B16-H y F3II-H. En este trabajo exploramos el impacto de la recuperación de la síntesis del NeuGc en el comportamiento tumoral. Por citometría de flujo, confirmamos que la transfección de CMAH incrementa las células positivas para NeuGcGM3 en las poblaciones B16-H y F3II-H. La presencia de NeuGcGM3 disminuyó significativamente la tumorigenicidad. Mientras que en ratones singénicos las líneas parentales alcanzaron el 100% de toma tumoral con desafíos subcutáneos en el flanco de 1×10^4 (B16) y 2×10^5 (F3II) células, se requirieron desafíos de 5×10^5 y 3×10^6 células usando B16-H y F3II-H, respectivamente. Particularmente, las células F3II-H mostraron un desarrollo tumoral bifásico que alcanzó los $193 \pm 97 \text{ mm}^3$ (media \pm SEM, $n=9$) de diámetro promedio al día 15 post-desafío, seguido por una llamativa disminución y reabsorción tumoral. Utilizando ratones atímicos, en cambio, tanto B16-H como F3II-H mostraron una tumorigenicidad similar a las líneas parentales. Los Resultados obtenidos sugieren que el GLS NeuGcGM3 podría modular el desarrollo tumoral en ratones, probablemente a través de la interacción con el sistema inmune del huésped.

095. (441) EVALUACIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO (RE) Y DE PROGESTERONA (RP) POR INMUNOHISTOQUÍMICA EN 7276 CASOS DE CÁNCER DE MAMA REGIONALES. Gervasoni S.¹; Sarancone S.²; Sanchez Granel G.³

Laboratorio de Patología QUANTUM de la Clínica Diagnóstica Médico Oroño de Rosario^{1 2 3} <silvia_gervasoni@hotmail.com>

La evaluación por inmunohistoquímica (IHQ) de receptores hormonales en cáncer de mama es ampliamente usada para predecir la respuesta a la terapia endocrina y como parámetro biológico relacionado al pronóstico de la enfermedad. Con el uso de anticuerpos monoclonales según datos basados en estadísticas extranjeras el 75% de los casos son positivos para RE y el 55% para RP. El objetivo de este trabajo es determinar la frecuencia de receptores hormonales positivos y la posible variabilidad de la misma en relación a los diferentes tipos tumorales en un Laboratorio de referencia en IHQ que cubre gran parte de los casos de la Pcia de Santa Fe y el Litoral de nuestro país a fin de conocer y aportar los datos de nuestra zona. Se realizó un estudio retrospectivo y observacional en el Laboratorio de Patología Quantum de la clínica de Diagnóstico Médico Oroño de Rosario, en pacientes con cáncer de mama, desde enero de 1999 hasta diciembre de 2008. Se determinó la frecuencia de receptores de estrógeno y progesterona por IHQ y su variabilidad en los 10 años del estudio, así como la diferencia en la positividad de receptores hormonales en tumores de mama de diferentes tipos histológicos. A lo largo del estudio, se utilizaron Acs. monoclonales NOVOCASTRA, sistema detección ABC de Vector y revelado con DAB. El análisis estadístico se realizó con programa GraphPad Prism. Se estudiaron 7276 pacientes con cáncer de mama cuyo rango de edades fue 26-92 años. La frecuencia de RE (+) y RP (+) fue de 77,92% y 62,22% respectivamente. Discriminado por tipo de tumor, la frecuencia de receptores hormonales en tumores lobulares [90,97% para RE (+) y 72,76% para RP (+)] fue mayor que en tumores ductales [76,07% para RE (+) y 60,36% para RP(+)], siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en ambos tipos de receptores. La frecuencia de receptores hormonales en cáncer de mama en la región analizada no difirieron estadísticamente a los registros del resto del mundo.

096. (446) RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN LA LÍNEA TUMORAL DE CARCINOMA ESCAMOSO SCC-13. Milla L.¹; Rodríguez E.²; Zamarrón A.³; Juarranz á.⁴; Rivarola V.⁵

Universidad Nacional de Río Cuarto¹; Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Dpto. de Biología Molecular, UNRC. Argentina.² ; Facultad de Ciencias. Dpto. de Biología. UAM. España.^{3 4}; Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales. Dpto. de Biología Molecular, UNRC. Argentina.⁵ <lauramilla2002@yahoo.com.ar>

La terapia fotodinámica (TFD) utilizando Me-ALA es empleada para tratar el cáncer cutáneo no melanoma. Uno de los problemas de este tratamiento es la aparición de poblaciones celulares resistentes. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar poblaciones de células de carcinoma escamoso de la línea SCC-13 resistentes (R) a TFD con Me-ALA, a través del estudio de proteínas de adhesión, MDR (Pgp) e inhibidoras de apoptosis (survivina). La población original (parental) fue sometida a 10 ciclos repetidos de TFD, aislándose así 10 generaciones de R. Mediante citometría de flujo se estudió el ciclo celular. La localización del fotosensibilizador producido a partir del Me-ALA (PpIX) fue analizada por microscopía de fluorescencia. Empleando Western Blot se determinaron niveles de expresión de proteínas de adhesión celular (E-cadherina, β 1-integrina y vinculina). Por inmunofluorescencia indirecta se analizaron los patrones de expresión de proteínas E-cadherina, β -catenina, vinculina y p-FAK, α -tubulina y F-actina y survivina. El fotosensibilizador se localizó

en membrana y lisosomas, tanto en las células R como parentales. Las células R no mostraron alteraciones en el ciclo celular, pero presentaron una mayor expresión de proteínas de adhesión célula-sustrato (β 1-integrina y vinculina) y de F-actina y cambios en la distribución de F-actina. Los Resultados permiten concluir que alteraciones en estas proteínas podrían actuar como una estrategia de resistencia a la TFD.

097. (464) USO DE D²⁻⁴⁰ ANTI-PODOPLANINA EN EL ESTUDIO DE VASOS LINFÁTICOS EN MELANOMA HUMANO.

Roberti M.¹; Arriaga J.²; Bianchini M.³; Bravo A.⁴; Mordoh J.⁵; Barrio M.⁶

Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA) Ciudad de Buenos Aires^{1 2 3}; HIGA Eva Perón, San Martín, Prov. Buenos Aires⁴; Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA) Ciudad de Buenos Aires; Fundación Instituto Leloir, IIBBA-CONICET, Buenos Aires⁵; Centro de Investigaciones Oncológicas de la Fundación Cáncer (CIO-FUCA) Ciudad de Buenos Aires <pau_roberti@hotmail.com>

El melanoma cutáneo (MC) es el más letal de los cánceres de piel. A través del sistema linfático local, metastatiza inicialmente los ganglios linfáticos regionales. La relevancia clínica de las metástasis a ganglios linfáticos está bien establecida, pero no existían marcadores específicos de células linfáticas, lo cual limitaba su estudio. El descubrimiento de nuevos marcadores, como la proteína de membrana podoplanina, ha permitido comenzar a esclarecer la interacción entre las células tumorales con los vasos linfáticos (VL). 16 biopsias de MC primario humano (Breslow > 3.0mm) fueron analizadas por inmunohistoquímica (IHQ) con el anticuerpo monoclonal D2-40 (anti-podoplanina). Se estudió el área tumoral completa y las zonas peritumorales adyacentes. Se calculó la Densidad de Vasos Linfáticos (DVL), incluyendo los vasos y microvasos; y se registró la Invasión Linfática (IL). El área intratumoral se subdividió en Nidos de células tumorales y estroma tumoral para la cuantificación. La marcación con D2-40 mostró una tinción de membrana exclusivamente en vasos linfáticos, sin tinción en vasos sanguíneos. En 13/16 (81.2%) biopsias se observó mayor DVL en las regiones peritumorales (4.3 ± 1.1), respecto de las intratumorales (1.4 ± 0.7). En las regiones intratumorales los VL se concentraron en el estroma IT (3.6 ± 2.2 estroma IT vs. 1.2 ± 0.8 Nido tumoral, n=10). Se observó IL por células tumorales o émbolos en 13/16 pacientes. En ciertas biopsias se observó tinción positiva en las células tumorales ó zonas difusas de débil tinción. El uso de D2-40 nos permitió aumentar la sensibilidad y especificidad permitiendo discriminar correctamente los VL de los vasos sanguíneos sin glóbulos rojos o retracciones del tejido. D2-40 permite identificar los microvasos (neolinfangiogénesis) que no son distinguibles anatomopatológicamente. El valor predictivo de la DVL en los tumores primarios deberá ser validado en mayor número de pacientes correlacionándolo con la evolución clínica.

098. (470) ENSAYO CLÍNICO: QUIMIOTERAPIA METRÓNOMICA (QTM) CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y CELECOXIB (CEL) EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA, PROGRESADAS A QUIMIOTERAPIA ESTÁNDAR. INFORME PRELIMINAR. Rozados V.¹; Rossa A.²; Alasino CM³; Rico M.⁴; Giordano R.⁵; Queralt F.⁶; Pezzotto S.⁷; Scharovsky O.⁸

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR^{1 2}; Instituto de Oncología³; Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR⁴; Laboratorio Cibic⁵; Instituto de Oncología⁶; C.I.U.N.R.⁷; Instituto de Genética Experimental; C.I.U.N.R.⁸ <viviana.rozados@gmail.com>

La QTM consiste en la administración crónica de drogas en dosis bajas, a intervalos regulares y sin períodos largos de descanso. Nuestros ensayos pre-clínicos de QTM con Cy + Cel mostraron efecto antitumoral, antimetastásico y baja toxicidad. El ob-

jetivo de este ensayo es evaluar toxicidad, calidad de vida y marcadores de respuesta a la terapia en pacientes con cáncer de mama sin otra opción terapéutica, con QTM con Cy + Cel (Ensayo clínico aprobado por la Comisión de Bioética institucional). Los pacientes ingresadas hasta el momento (n=4) recibieron medicación oral (50 mg Cy + 400 mg Cel diarios) por períodos que van desde 4 hasta 12 semanas y realizaron controles clínicos y de laboratorio cada 15 días. Las células mononucleares circulantes se marcaron con anticuerpos unidos a diferentes fluorocromos: CD45, para excluir células hematopoyéticas, CD31 para células endoteliales circulantes (CEC) y CD133 para células endoteliales progenitoras (CEP) y se evaluaron por citometría de flujo. No se observaron modificaciones en la concentración de leucocitos y plaquetas en 3 pacientes mientras que 1 presentó un descenso de grado II que requirió una reducción de la dosis diaria de Cy a 25 mg; no se observaron variaciones en el % de CEC y CEP; el seguimiento de la calidad de vida mostró ausencia de modificaciones negativas a lo largo del tratamiento. En los esquemas quimioterapéuticos convencionales (EQC) la Cy se administra en dosis altas cada 21 días, debido a los efectos adversos. Aún cuando en la QTM, la dosis de Cy acumulada/paciente en 21 días es similar a la administrada en los EQC, no se detectaron los efectos tóxicos característicos de la mismos. Los Resultados de este análisis descriptivo preliminar sugieren una buena tolerancia a los terapia, sin toxicidad significativa y sin alteración de la calidad de vida, características que apoyan la continuación del protocolo clínico a fin de determinar su utilidad como terapia antitumoral en el cáncer de mama avanzado.

099. (488) EXPRESIÓN DE LOS ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN MELANOCÍTICA MART-1 Y GP100 EN CÉLULAS CLONOGÉNICAS DE MELANOMA HUMANO Y SU SUSCEPTIBILIDAD A LA LISIS POR CLONES DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS ESPECÍFICOS. Aris M.¹; Rodríguez M.²; Colombo M.³; Barrio M.⁴; Alperovich M.⁵; Bravo A.⁶; Mordoh J.⁷

Fundación Instituto Leloir; Centro de Investigaciones Oncológicas - FUCA¹; Fundación Instituto Leloir^{2 3}; Centro de Investigaciones Oncológicas - FUCA⁴; Maestría Biología Molecular Médica, UBA⁵; Hospital Interzonal General de Agudos Eva Perón⁶; Fundación Instituto Leloir; Centro de Investigaciones Oncológicas - FUCA⁷ <mariana.aris@gmail.com>

El melanoma cutáneo (MC) expresa antígenos de diferenciación melanocítica (MD-Ags), como MART-1 y gp100, y la inmunoterapia es la terapéutica más utilizada. Sin embargo, no siempre se alcanzan respuestas clínicas, y proponemos que ello se debe, entre otras causas, a la expresión parcial de MD-Ags por el MC. Nuestro objetivo fue estudiar los MD-Ags MART-1 y gp100 en células clonogénicas (CC) de MC, validar los Resultados en biopsias de MC primario, y estudiar la lisis de CC por linfocitos T citotóxicos (LTCs) específicos. Estudiamos CC derivadas de colonias de líneas celulares como modelo de proliferación in vitro. Empleamos la línea celular MEL-XY1 (HLA-0201), colonias de 7 días (cultivando la línea en metilcelulosa 1,5%), y CC obtenidas a partir de las colonias. Se analizaron MART-1, gp100 y Ki67 por inmunohistoquímica (IHQ) en colonias y 15 MC primarios (Breslow >3 mm). Para los experimentos de lisis se utilizaron los clones anti-gp100 (G154: KTWGQYWQV) y anti-MART-1 (M27: AAGIGILTV) restringidos a HLA-A0201 (células efectoras), enfrentando a las CC MEL-XY1 (target) en una relación 5:1. Se determinó el % de lisis y la expresión de MD-Ags en las células sobrevivientes. Las colonias MEL-XY1 expresaron heterogéneamente estos MD-Ags, encontrándose colonias positivas (49%), negativas (21%) y mixtas (30%), todas con índices proliferativos (IP) similares (Ki-67+). Las CC fueron parcialmente susceptibles (70%) a la lisis por ambos clones: < 1% de las células positivas para estos MD-Ags, siendo el resto CC negativas que sobrevivieron al ataque por clones LTC específicos. En las biopsias de MC se observó expresión heterogénea de MD-Ags con IP comparables. Estos Resultados, junto con la existencia en MC primarios de poblaciones proliferantes que no expresan estos MD-Ags, sugieren

que las estrategias inmunoterapéuticas eficaces para el MC deberían contemplar la eliminación de ambas poblaciones.

REPRODUCCION 1

- 100. (88) EFECTOS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE DIETA CON CALCIO SOBRE EL TESTICULO EN RATAS DE LA LINEA "B".** Vazquez S.¹; Tardivo A.²; Gonzalez D.³; Posadas M.⁴; Hisano N.⁵

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR¹; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR²; Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR³; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR⁴; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR⁵ <noriyuki@cimero.org.ar>

El calcio de la dieta regula el metabolismo energético y se relaciona con el peso y la glicemia. La obesidad produce una variedad de alteraciones en el aparato reproductor masculino. En este trabajo se estudió los efectos sobre el testículo de dos tipos de dietas isocalóricas con distinto contenido de calcio en ratas macho de la línea β. Al comprobarse la preñez de ratas adultas de la línea obesa β se dividieron en tres grupos y recibieron dieta hipercálcica (H) (0.9g%), hipocálcica (h) (0.2g%) o dieta control normocálcica (N) (0.6g%) respectivamente. De las crías se seleccionaron al destete los machos, que continuaron hasta los 50 días de edad con la misma dieta recibida por la madre durante la preñez. Tras su sacrificio con sobredosis de éter, los testículos (n=10 cada grupo) fueron disecados, pesados, fijados en Carnoy y refijados en formaldehído 4% en PBS. Los especímenes fueron procesados con las técnicas histológicas de rutina y coloreados con H-E. El peso testicular fue mayor en las ratas que ingirieron la dieta hipocálcica (3.69 ± 0.39 g) que las hipercálcica (2.45 ± 0.13 g) y controles (2.34 ± 0.04 g). En la histología testicular se observó distintos cambios morfológicos. En las ratas β con dieta hipercálcica hallamos túbulos seminíferos de contorno irregular, acúmulos celulares intraluminales, gran cantidad de espacios intercelulares con pérdida de la arquitectura epitelial e imágenes compatibles con apoptosis. En el grupo β con dieta hipocálcica se observó túbulos sin espacio luminal, células germinales con imágenes compatibles con apoptosis. Los diferentes patrones histológicos encontrados sugerirían que tanto el aumento como la disminución del contenido de calcio en la dieta ingerida por las madres y/o las crías afectan en distinta forma el desarrollo normal del epitelio seminífero influyendo en forma diferencial en el metabolismo testicular.

- 101. (189) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y EL NITRÉRGICO EN LA LIBERACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL EPITELIO OVIDUCTAL EN BOVINOS.** Osycka Salut C.¹; Gervasi M.²; Perez Martínez S.³

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO) - Conicet - UBA¹ ^{2 3} <claudia.osycka@gmail.com>

Previamente demostramos en bovinos que la anandamida (AEA), principal endocannabinoide, y su análogo estable MetAEA, favorecen la capacitación espermática promoviendo la liberación de los espermatozoides (ESP) unidos a células epiteliales del oviducto (CEO). Además varios estudios revelan la participación del óxido nítrico (NO) en la capacitación del ESP. Es sabido que los receptores de cannabinoides pueden activar vías de señales que regulan los niveles de NO intracelular. Por lo tanto, se propuso estudiar la posible interacción entre el sistema endocannabinoide y el nitrérgico en la capacitación espermática y en la interacción ESP-oviducto. Para ello, se realizaron experimentos de capacitación in vitro de ESP bovinos criopreservados. La evaluación de la capacitación se realizó mediante las técnicas de clorotetraciclina y de inducción de la reacción acrosomal por lisofosfatidilcolina analizada con la lectina PSA unida a FITC. En ambos casos, la incubación de los ESP con MetAEA (1.4 nM) o

AEA (1 nM) incrementó el porcentaje de ESP con patrón capacitado (15%; p<0,01). La presencia de L-NAME (inhibidor de NO sintetas) ó de Hemoglobina (Hb: 30 µg/ml; secuestrador de NO) en el medio de incubación inhibió el efecto capacitante de los endocannabinoides (p<0,01). A su vez, se realizaron co-cultivos de ESP con CEO. Luego de 1 h de incubación se agregó al medio los distintos agentes para evaluar la liberación de los ESP. Los Resultados indicaron que la incubación con NOC18 (1 µM; dador de NO) o L-Arginina (10 mM; sustrato de las NOS) induce la liberación de los ESP de las CEO al igual que la AEA o MetAEA (NOC18: 40%; L-Arginina 30%; AEA: 35%; MetAEA: 43%; p<0,05). La presencia de L-NAME o Hb revirtió el efecto de ambos endocannabinoides (p<0,01). En conjunto, los Resultados obtenidos sugieren que la AEA podría inducir la capacitación espermática y/o promover la liberación de los ESP de las CEO a través de la activación de la vía que involucra al NO en bovinos.

- 102. (291) ALTERACIONES DE LA CAPACIDAD DE ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS DEL EPITELIO SEMINÍFERO DE LA RATA DURANTE EL DESARROLLO DE UNA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE).** Pérez C.¹; Sobarzo C.²; Jacobo P.³; Jarazo Dietrich S.⁴; Denduchis B.⁵; Lustig L.⁶

Instituto de Investigaciones en Reproducción^{1 2 3 4 5 6} <ceciliaperez77@yahoo.com.ar>

La OAE se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomonocitario intersticial y daño severo del epitelio seminífero (ES) que presenta apoptosis y descamación de las células germinales (CG). El objetivo de este trabajo es estudiar el estado funcional de las uniones adherentes entre células de Sertoli (S) y S-CG durante el desarrollo de la OAE. Se indujo OAE en ratas por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes. Ratas del grupo control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes, estudiándose también ratas sin tratar (N). Las ratas se sacrificaron a los 30 días (d) de la primera inmunización, 50d (orquitis focal) y 80d (orquitis severa). Previamente observamos un aumento de la expresión de N-cadherina (N-cad) en las ratas con OAE comparadas con las C. En este trabajo analizamos por Western blot (Wb) la expresión de proteínas asociadas a la N-cad [β -catenina (β -cat), p120 y α -catenina (α -cat)] que unen la N-cad con la actina. Se detectó, en la OAE, un aumento en la expresión de α -cat a los 50 y 80 d (media \pm SEM, 50d: C: 0,9 \pm 0,05, OAE:1,39 \pm 0,11*; 80d: C:0,42 \pm 0,13, OAE:2,21 \pm 0,5*, p<0,05) no observándose cambios en la expresión de β -cat y p120. Por microscopía confocal se observó la pérdida de la co-localización de N-cad/ β -cat y N-cad/p120, presente en los animales N y C. Un test de adhesión celular aplicado a células obtenidas del ES reveló la presencia de grupos de células S-CG adheridas entre sí en ratas N y C, mientras que en las ratas con OAE las células sólo se presentaron en forma aislada. La pérdida de la co-localización mencionada asociada a la falta de adhesión celular (que correlaciona, en la histopatología testicular, con la descamación de CG) demuestra, en las ratas con OAE, una alteración en la funcionalidad de las uniones. Datos preliminares sugieren que la alteración en la adhesión de las células del ES en la OAE se debe a cambios en el estado de fosforilación en tirosina de N-cad y β -cat, moléculas que componen las uniones adherentes.

- 103. (715) ¿EXISTEN SUB-POBLACIONES DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS QUE EXPRESAN DIFERENCIALMENTE INTEGRINAS Y EL RECEPTOR DE PROGESTERONA?.** Diaz E.1; Pozo P.2; Martinez E.3; Morales P.4

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta^{1 2 3 4} <esdiaz@uantof.cl>

Previamente, demostramos que espermatozoides humanos incubados en presencia de progesterona y fibronectina estimulan de manera sinérgica la reacción acrosómica. El objetivo de este trabajo fue determinar si en una muestra seminal normal, existen subpoblaciones de espermatozoides que expresen diferencial-

mente integrinas y el receptor de progesterona. Para ello, espermatozoides móviles, seleccionados por Percoll, fueron capacitados durante 18 hr. Luego, los espermatozoides fueron tratados con: 1) anticuerpo anti-a6 (subunidad de la integrina que reconoce laminina) conjugado con ficoeritrina (PE); 2) anticuerpo anti-receptor de progesterona (rP) y un anticuerpo anti IgG (anticuerpo secundario) conjugado con Cy5; o 3) con el péptido RGD (que reconoce todas las integrinas que unen fibronectina) conjugado a FAM-5. Adicionalmente, los espermatozoides fueron tratados con una combinación de los mismos. Los Resultados fueron analizados por citometría de flujo y microscopía confocal.

Tabla 1. Porcentaje de espermatozoides humanos que exhiben marca:

RGD	a6	rP	RGD + a6	RGD + rP	a6 + rP	a6 + RGD + rP
76%	30%	20%	16%	20%	18%	6%

Los Resultados muestran que existen subpoblaciones de espermatozoides humanos que expresan de manera diferencial receptores para fibronectina, laminina y el receptor de progesterona. Además, los datos sugieren que todos los espermatozoides que expresan el rP coexpresan el receptor de laminina y fibronectina. No todos los espermatozoides que expresan el receptor de laminina y fibronectina coexpresan el rP. Fondecyt 11070051, 1080028.

104. (697) LA INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN ACROSÓMICA INDUCIDA EN ESPERMATOZOIDEOS POR LA SECRECIÓN DE TEJIDO OVIDUCTAL HUMANO EN CULTIVO SE DEBERÍA A FACTORES PROTEICOS. Zumoffen C.¹; Caille A.²; Munuce M.³; Cabada M.⁴; Ghersevich S.⁵

Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.^{1 2 3}; Área de Biología, IBR, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.⁴; Laboratorio de Estudios Reproductivos, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.⁵ <czumoffen@hotmail.com>

En contacto con la secreción oviductal, los espermatozoides (ESP) completan el proceso de capacitación, adquiriendo la habilidad de sobrellevar la reacción acrosómica (RA). En presencia de un inductor adecuado los ESP capacitados son capaces de desarrollar la RA in vitro. En este trabajo se evaluó la influencia de los componentes proteicos presentes en la secreción de tejido oviductal humano en cultivo (MC) sobre la RA inducida en ESP incubados en condiciones capacitantes. El tejido tubárico de mujeres premenopáusicas se cultivó por 48 hs en medio DMEM/Ham's F-12. Los MC colectados se dializaron (membrana de 10 kDa). ESP móviles (swim up) de donantes normozoospermicos se incubaron bajo condiciones capacitantes por 6 h en presencia de MC ([proteínas] 0, 0.2, 0.8 y 1.6 mg/ml) o de MC (1.6 mg/ml) tratado por calor (100°C, 10 min). Al cabo de la incubación se tomaron algunas alícuotas de los ESP y se removió el MC por lavado, y se continuó la incubación por 4 h. A las 6 y 10 h se evaluó la RA inducida por fluido folicular humano, utilizando *Pisum sativum*-FITC, considerando como población inducible (PI) = % RA inducida - % RA basal. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA, seguido por el test de Tukey-Kramer. La incubación con el MC causó una disminución dosis-dependiente en la PI ($p < 0.001$). La disminución en la PI en presencia del MC sugiere que el mismo estabiliza la membrana espermática. En los ESP lavados, la PI-10h fue significativamente mayor que la PI-6h ($p < 0.001$). Al retirarse el MC la respuesta al inductor de RA fue similar a la del control, sugiriendo que el efecto era mediado por factores removibles. En ESP que fueron incubados 6 h en presencia de MC que fue inactivado previamente por calor no se observó disminución en la PI respecto del control, indicando que el efecto era mediado por factores termolábiles. Estos datos sugieren que los factores del MC involucrados en esta modulación de la RA serían de naturaleza proteica. PICT 0115092, FONCYT.

105. (824) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROTEOSOMA DURANTE LA ESPERMATOGÉNESIS DE RATÓN. Jara González M.¹; Ordenes K.²; Zapata H.³; Pereira A.⁴; Díaz E.⁵

Departamento Biomédico, Facultad Ciencias de la Salud. Universidad de Antofagasta. Antofagasta - Chile^{1 2 3 4 5} <mjara@uantof.cl>

La espermatogénesis corresponde a un conjunto de eventos celulares que se desarrollan dentro del epitelio seminífero de los mamíferos y que tiene como finalidad la formación de espermatozoides. En el ratón estos eventos pueden ser ordenados en doce asociaciones celulares diferentes, conocidas como los estados del epitelio seminífero. Durante la serie de transformaciones celulares que ocurren durante la espermatogénesis se ha demostrado que existe degradación de proteínas citosólicas, la que puede ser mediada por catepsinas, calpains y por el sistema ubiquitina proteosoma (SUP). Utilizando ratones machos sexuales maduros, obtuvimos por transiluminación, segmentos de túbulos seminíferos que corresponden a los estados IX, X y XI (segmento PZ); XII, I y II (segmento WS); III, IV y V (segmento SS) y VI, VII y VIII (segmento DZ). En homogenizados obtenidos de los diferentes segmentos se evaluó la actividad tipo quimotripsina y tipo tripsina del proteosoma, tanto en presencia o ausencia de un inhibidor específico de éste (epoxomicina). Nuestros Resultados indican que existe actividad tipo quimotripsina en todas las zonas del epitelio seminífero del ratón, siendo la actividad específica mayor en el segmento DZ, menor en los segmentos WS y SS y más baja aun en el segmento PZ. La actividad tipo tripsina sigue un patrón similar siendo mayor en el segmento DZ, pero no muestra diferencias estadísticas entre los otros segmentos. El uso de epoxomicina inhibe ambas actividades enzimáticas en todos los segmentos estudiados. La presencia del proteosoma en los diferentes segmentos fue confirmada por Western blot para algunas subunidades de éste. El análisis de Western blot, indica que no existen diferencias en la expresión del proteosoma en las diferentes zonas del epitelio seminífero estudiadas, lo que sugiere que el proteosoma podría estar diferencialmente regulado en cada estado del epitelio seminífero del ratón.

106. (244) DESARROLLO IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS ELECTROFUSIONADOS PRODUCIDOS POR FIV. Hiriart M.¹; Salamone D.²

Laboratorio de Biotecnología Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires^{1 2} <mineshiriart@gmail.com>

La fusión de blastómeras de embriones de 2 células es el método más efectivo para la generación de embriones tetraploides (4n). La agregación de blastómeras 4n con células madre produce tejidos extraembrionarios 4n con baja contribución de las mismas al embrión propiamente dicho. El objetivo de este trabajo fue fusionar a distintos voltajes embriones bovinos de 2 células generados por FIV y evaluar su desarrollo in vitro. Para ello, complejos ovocitos-cúmulus fueron obtenidos por punción folicular de ovarios de mataderos y madurados durante 22h en condiciones estándar. Se realizó FIV en medio BO, empleando 16 x 106 espermatozoides/mL y coincubando durante 5 h. Los presuntos cigotos fueron cultivados en medio SOF, incubados a 39°C en atmósfera húmeda y 5%CO₂. Tras 20-22h de cultivo, embriones de 2 células fueron electrofusionados con 2 pulsos de 2; 1,6; 1,2 y 0,8 kV/cm aplicados por 25us y a un intervalo de 100ms (mínimo 2 réplicas por grupo); luego fueron retornados a cultivo. La valoración de la fusión de los embriones se realizó 1h después. Como control se emplearon embriones producidos por FIV que no fueron fusionados. Se evaluó el N° de blastocistos a los 6 o 7 días post-FIV. En la Tabla 1 se muestran los Resultados obtenidos. Tabla 1. Desarrollo in vitro de embriones bovinos de 2 células fusionados a distintos voltajes

Voltaje (kV/cm)	N° total	N° fusionados (%)	Blastocistos (%) [*]
2,0	31	28 (90,32)	4 (14,29)a
1,6	43	40 (93,02)	9 (22,50)a
1,2	39	30 (76,92)	11 (36,67)ac
0,8	21	20 (95,24)	10 (50,00)bc
Control	16	16 (100)	9 (56,25)bc

*: En función del n° de embriones fusionados

a,b,c: Diferencia significativa entre tratamientos (Fisher, p<0,05)

Los Resultados indican que cuanto menor fue el voltaje aplicado, la capacidad de desarrollo de los embriones fusionados fue significativamente mayor. Si bien resta analizar la ploidía de los blastocistos obtenidos, sorpresivamente embriones fusionados y posiblemente 4n pueden desarrollar en alta proporción y a niveles similares a los no fusionados 2n.

107. (819) EFECTO DEL INHIBIDOR DE MICROUBULOS DEMECOLCINE SOBRE LA ENUCLEACIÓN QUÍMICA DE OVOCITOS BOVINOS. Moro L.¹; Salamone D.²

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, UBA¹ ² <luciamoro⁰⁴@hotmail.com>

La enucleación del ovocito es un paso crítico en la clonación animal y se logra por un sofisticado proceso de micromanipulación. Un método más sencillo es utilizar el inhibidor de microtúbulos demecolcine (DMC) para inducir enucleación química. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de este método de enucleación en el bovino. Ovocitos fueron colectados de ovarios de matadero y madurados in-vitro en condiciones estándar. Se activaron con ionomicina seguido por tratamiento con DMC 4x10⁻³ µg/ml y cicloheximida (CHX) para inducir la enucleación. Una fracción de este grupo se agitó mecánicamente para evaluar si favorecía el proceso. Los grupos control fueron ovocitos activados con 6-DMAP y sometido a vórtex, sin ser tratados con DMC. Los embriones se cultivaron en medio SOF y se evaluó el desarrollo embrionario. Al día 8 los presuntos cigotos fueron teñidos con Hoechst 33342 y evaluados con microscopio de fluorescencia para determinar la efectividad de la enucleación. Los Resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla1. Desarrollo de ovocitos bovinos enucleados y activados partenogénicamente, sometidos a tratamiento con DMC y CHX

Grupo	n	Clivados (%)	Mórulas (%)	Blastocitos (%)	Evaluados	Enucleados (%)
DMC+CHX	48	20 (41,6)a	7 (14,6)ab	3 (6,3)a	39	15 (38,5)a
DMC+CHX + Vórtex	53	14 (26,4)a	4 (7,5)b	1 (1,9)a	23	7 (30,4)ab
6-DMAP	48	32 (66,6)b	18 (37,5)c	13 (27,1)b	36	4 (11)bc
6DMAP + Vórtex	45	20 (44,4)a	13 (28,9)cb	10 (22,2)b	29	1 (3,4)c

a, b, c Diferencia significativa entre tratamientos (Fisher p<0,05)

Los Resultados indican que el tratamiento con DMC y CHX indujo la enucleación de hasta el 38,5 % de los ovocitos. Los efectivamente enucleados no desarrollaron, el grupo control mostró porcentajes significativamente menores de enucleación y altas tasas de blastocistos. El grupo DMC+CHX+Vórtex no varió con respecto a DMC+CHX. En conclusión, la utilización de DMC permite producir ovocitos enucleados de manera sencilla para ser empleados en clonación, sin necesidad de disponer de micromanipulador.

108. (433) REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA ACTIVIDAD ENDÓCRINA DE CÉLULAS DE LA GRANULOSA HUMANA POR VARIANTES GLICOSILADAS DE FSH. Loreti N.¹; Andreone L.²; Ambao V.³; Campo S.⁴

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)^{1 2 3 4} <lnazareth@cedie.org.ar>

Hemos observado que cambios en el grado de sialización y complejidad de los oligosacáridos de FSH se asocian con variaciones en los niveles de inhibinas en distintas condiciones fisiológicas de la mujer. El objetivo del trabajo fue determinar el posible efecto diferencial de las variantes glicosiladas de FSHr sobre la actividad esteroidogénica y la producción de inhibina/activina en una línea celular de granulosa humana: KGN. Se aislaron análogos de carga de FSHr en un rango de pH 2.6-7.5 por isoelectrofoque preparativo. Se obtuvieron dos preparaciones: ácidas (AC; pH<4) y básicas (BA;pH>5). Cromatografía en ConA fue utilizada para aislar isoformas con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos: complejos (NR) y de tipo híbrido (FR). Las células fueron estimuladas con FSHr entera o isoformas (20ng/ml) para determinar estradiol (E2) en presencia de androstenediona 100nM (24hs, RIE) e inhibina/activina (72hs, ELISA). En condiciones basales las células produjeron: E2: 45.9±1.4pg/ugDNA; activina A, inhibina A y subunidad α de inhibina (Pro-αC): 178.6±16.1, 2.9±0.4, 4.0±0.1 pg/ugDNA, respectivamente. La producción de E2, InhA y Pro-αC fue estimulada significativamente por FSHr entera (p<0.01), sin embargo, resultó un estímulo más potente para la producción de péptidos: 1.2±0.04; 2.1±0.2; 2.2±0.1, respectivamente, p<0.01 (x±EEM, veces de estímulo respecto del basal). La producción de E2 fue estimulada por análogos de carga menos sialilados (BAvsAC, p<0.01), conteniendo oligosacáridos complejos (NRvsFR, p<0.01). Isoformas menos sialiladas favorecieron la producción de Pro-áC e InhA (BAvsAC, p<0.001); variantes glicosiladas con oligosacáridos de tipo híbrido (FRvsNR, p<0.001) fueron las más biopotentes para estimular la producción de inhibinas. Estos Resultados sugieren que el grado de sialización y complejidad de los oligosacáridos de la FSHr modula en forma diferencial la actividad esteroidogénica y la capacidad de producir inhibinas en células KGN.

109. (480) ANEXINA A² Y S^{100A}¹⁰ EN EL EPITELIO OVIDUCTAL DE MAMÍFEROS. Teijeiro J.¹; Marini P.²

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario; Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario. IBR-CONICET^{1 2} <teijeiro@ibr.gov.ar>

En mamíferos euterios la interacción espermatozoide-oviducto genera la formación de un reservorio y permite la selección de espermatozoides con ciertas cualidades. Para la formación del reservorio, hemos propuesto a anexina A2 como el componente oviductal para la interacción con el espermatozoide. Esta proteína también ha sido reportada como cumpliendo esta función en bovinos, junto con las anexinas A1, A4 y A5. Anexina A2 es una proteína calcio dependiente que se encuentra en muchos tejidos y diferentes tipos celulares asociada a S100A10, formando un complejo heterotetramérico. En este trabajo detectamos por western blot la presencia de anexina A2 y S100A10 en el oviducto de varias especies de mamífero, indicando que podría tratarse de un mecanismo extendido entre estos animales. Además, utilizando técnicas de inmunohistoquímica localizamos ambas proteínas en células epiteliales ciliadas del oviducto de cerdo. Por procedimientos de extracción diferencial a partir de membranas de células oviductales y de células oviductales aisladas demostramos semicuantitativamente por western blot la liberación de anexina A2 y S100A10 de forma creciente al extraer con Tritón X-100, NaCl y EGTA, sugiriendo que el calcio podría estar involucrado en la interacción de estas proteínas con la membrana. Experimentos de coinmunoprecipitación utilizando extractos proteicos de membrana de células oviductales demuestran que anexina A2 forma complejos con S100A10 en esta localización. De estos Resultados podríamos concluir que el complejo anexina A2/S100A10 está presente en el oviducto porcino y que su interacción con proteínas espermáticas podría ser parte del proceso de unión del espermatozoide al oviducto.

110. (739) PATRÓN DE EXPRESIÓN DE OCT⁴ EN EL TEJIDO GERMINAL DEL OVARIO FETAL Y PRE-PÚBER DE LAGOSTOMUS MAXIMUS. Freysselinard A.¹; Leopardo N.²; Inserra P.³; Fraunhofer N.⁴; Willis M.⁵; Vitullo A.⁶

Universidad Maimonides (CEBAD)^{1 2 3 4 5 6}
 <leopardo.noelia@maimonides.edu>

OCT-4 es un factor de transcripción encargado de la regulación de la expresión de genes tejido-específico. Juega un rol en el mantenimiento de la totipotencialidad de las células madres embrionarias y en el establecimiento de la línea germinal. *Lagotomus maximus*, roedor caviomorfo, manifiesta supresión de la apoptosis en el tejido germinal femenino en desarrollo, con proliferación germinal irrestricta, que hace sospechar una renovación permanente de masa germinal aun luego del nacimiento. En consecuencia se analizó la expresión de OCT4 durante el desarrollo de la línea germinal femenina en *L. maximus* mediante inmunohistoquímica y westernblot en ovarios de 9 embriones en estadios temprano, medio y tardío de gestación y de 3 hembras prepúberes. OCT4 mostró localización nuclear en las células germinales primordiales durante la colonización y establecimiento en la gónada, en estadio temprano. Ésta disminuyó a medida que comenzó la foliologénesis a mitad de la gestación donde la proteína se transloca al citoplasma de células germinales en estadios de la primera profase meiótica. En gestación tardía la expresión se localizó tanto en citoplasma como en núcleo de los folículos primordiales. En hembras prepúberes se observó en el citoplasma de folículos primordiales, primarios y secundarios y se detectaron células germinales no foliculares en la corteza del órgano con expresión nuclear. Estos Resultados ponen de manifiesto que OCT4 muestra un patrón de distribución y expresión diferencial espacio-temporal relacionado a la potencialidad de la célula germinal. La localización es nuclear en la etapa de proliferación mitótica de oogonias y formación de oocitos, en tanto que su localización citoplasmática se relaciona a los estadios tempranos de la foliologénesis. La detección nuclear en células germinales tipo oogonia (no foliculares) en el ovario prepúber sostiene la idea de una potencial renovación postnatal de masa germinal en el ovario de *L. maximus*.

111. (815) RELACIÓN ENTRE LA REDUCCIÓN DE LA POBLACIÓN FOLICULAR DURANTE DESARROLLO Y LA SIMULTÁNEA EMERGENCIA DE ESTRUCTURAS NEUROFIBRILARES/AXONALES EN EL OVARIO. Manzur T.¹; Lahoz M.²; Porta M.³; Torres M.⁴; Farinati Z.⁵; Nagle C.⁶

CIRHE; CEMIC^{1 2 3 4 5 6} <pyk@fibertel.com.ar>

Justificación: Las células germinales primordiales (CGP) y las foliculares conforman el folículo primordial (FP), que sufren una reducción cuantitativa, pre y postnatal, atribuyéndose a fenómenos apoptóticos. Las CGP pluripotentes y pueden diferenciarse hacia los tres linajes embrionarios. La reducción podría relacionarse con la diferenciación hacia otros tejidos, como las proyecciones neuronales ováricas. Objetivos: Establecer si la depleción de CGP se relaciona con su diferenciación, como células madre, hacia estructuras neurogénica. Metodología: Bloques útero-ováricos de fetos de monas *Cebus apella* de 120 días (n=4), 160 días (n=2) y neonatos de 30 días (n=2), fueron procesados para histología e inmunohistoquímica para MAP2 y NF11. Los FP fueron contabilizados a 200X. Se definieron secciones y se determinó el volumen para estimar la población folicular por área ovárica. Resultados: Los ovarios fetales mostraron reacción positiva para MAP2 y NF11 fundamentalmente en el ovocito y signos de activación FP en los folículos primarios al nacimiento. En neonatos de 30 días se observaron estructuras filamentosas NF11 positivas estrechamente vinculadas en su origen a los ovocitos que se extendían hasta el útero. Sin embargo fueron MAP2 negativas. No se observaron en esta etapa neonatal otro tipo de estructuras neuronales. En fetos a término tamaño relativo ovárico fue superior neonatos al de 30 días. Los fetos de 120 días mostraron ovarios completamente poblados de FP (2160 x mm2). En fetos a término disminuyó de la población de FP (330 x106 por mm2), relacionado con activación a estadios primarios. Los ovarios neonatos de 30 días presentaron una significativa disminución de FP (125 x106 x mm2). Conclusiones: Se observó una relación directa entre la reducción de FP y la emergencia de estructuras neurofibrilares/axonales desde los ovocitos, sugiriendo que la

sobrepoblación de FP fetales podría vincularse a una función progenitora en la neurogénesis ovárica-uterina.

INMUNOLOGÍA 3

112. (399) LESIÓN POR ISQUEMIA REPERFUSIÓN HEPÁTICA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE OCLUSIÓN VASCULAR EN RATÓN: ROL DE LOS TOLL-LIKE RECEPTOR(TLR). De Santibañes M.¹; Cristiano A.²; Picco P.³; Destefano S.⁴; Rodríguez P.⁵; Perez S.⁶; Bonoffiglio C.⁷; Resio N.⁸; Argibay P.⁹

Hospital italiano^{1, 2, 3 4 5 6 7 8 9}

<martin.desantibanese@hospitalitaliano.org.ar>

Introducción: La isquemia y reperfusión (IR) es definida como la acentuación del daño celular en un órgano isquémico después del restablecimiento del flujo de O₂. Se han descriptos numerosas proteínas en relación a la fisiopatología de dicha lesión, tal es el caso de los Toll-Like Receptors (TLR). Hipótesis: Relación entre la valoración cuantitativa de los receptores TLR y la viabilidad de la célula hepática en diferentes periodos de IR. Material y métodos: Se utilizaron 50 ratones machos de cepa C57BL/6. Se incluyeron 3 grupos experimentales, un grupo control y un grupo de cirugía simulada. Se realizó el clampeo del pedículo hepático por diferente cantidad de tiempo: 5 minutos, 10 min, 20 min. Todos los grupos tuvieron un tiempo de reperfusión de 3 horas. Se realizó dosaje de enzimas hepáticas (GOT-GPT). Estudio histológico con Hematoxilina-eosina (H-E). Inmunofluorescencia anti TLR 4. Resultados: Los test estadísticos utilizados fueron el análisis de varianza (ANOVA), y el test de Bonferroni. Los valores de GOT y GPT mostraron un incremento significativo a mayor tiempo de IR. Los cambios histológicos con H-E demostraron daños celulares que variaron desde tejido normal (cirugía simulada) hasta necrosis focal (20 minutos). La inmunohistoquímica, muestra que la expresión de TLR aumentó a medida que se incrementó el tiempo de isquemia, siendo la máxima intensidad a los 10 minutos. Para evaluar la existencia de correlación entre los valores de GOT y GPT, como indicadores de lesión celular y el patrón inmunohistoquímico de tinción, se utilizó una correlación no paramétrica (Spearman). Se consideró como punto de corte un valor de p menor de 0,05.

	GOT vs IHQ	GPT vs IHQ
Valor de p	0.0207	0.0235

Conclusión: La correlación entre los valores de GOT y de GPT con relación al patrón de dispersión de inmunohistoquímica, así como las descripciones de los cortes teñidos con hematoxilina, evidencian que las lesiones por IR presentan una relación directa con el tiempo de clampeo vascular.

113. (747) ROL DEL ÁCIDO HIALURÓNICO EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN PULMONAR. Ernst G.¹; Cordo Russo R.²; Mascaró M.³; Álvarez E.⁴; Hajos S.⁵

Cátedra de Inmunología - IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET^{1 2 3 4 5} <glenda.uba@gmail.com>

El ácido hialurónico (AH), a través de su interacción con CD44, actúa como modulador de la respuesta inflamatoria en pulmón, función que depende de su tamaño molecular. El AH de bajo peso molecular (AH-BPM), pero no AH de alto peso molecular (AH-APM), estimula la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias. El objetivo de este trabajo fue evaluar en el fluido broncoalveolar (BAL) de ratones con hipersensibilidad inducida por un alérgeno los niveles de AH, la expresión de CD44 y la capacidad migratoria de dichas células hacia AH. Se estableció un modelo que produce inflamación pulmonar por inoculación intranasal con Dermatofagoides *Pteronyssinus* (Dp) en ratones BALB/c, siendo el grupo control inoculado con solución fisiológica (SF). El prick test confirmó que los animales estaban sensibilizados con el

alergeno. Se midió la concentración de AH en el BAL por ELISA, observándose un aumento significativo en los ratones tratados respecto del control (49.0±5.1% vs 18.4±1.2%, p<0.05). Por citometría de flujo se determinó el porcentaje de células CD44+ en el BAL siendo en los ratones tratados significativamente mayor que en el grupo control (62±4.2% vs 31.35±5.16%, p<0.05). El análisis de la capacidad migratoria de las células del BAL hacia AH-BPM mostró que las células de animales tratados presentaron un aumento significativo del índice de migración respecto de los ratones control (1.4 vs 1.0, p<0.05), este efecto no se observó en la migración hacia AH-APM. Se concluye que la inflamación pulmonar inducida por Dp estaría relacionada con el aumento en los niveles de AH en el BAL, con la expresión de CD44 (su receptor) y con la capacidad quimiotáctica del AH-BPM sobre las células del BAL, hechos que sugieren la participación del AH en la inflamación pulmonar.

114. (481) LA CÉLULA BRONQUIOLAR DE CLARA ES CAPAZ DE ESTABLECER FRENTE A LPS UNA RESPUESTA INMUNE INNATA EN SIMULTÁNEO CON UNA RESPUESTA ANTINFLAMATORIA PROTECTIVA. García L.¹; Roth F.²; Uribe Echevarría E.³; Maldonado C.⁴

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3 4}. <bingarcia@hotmail.com>

Al ser el epitelio bronquiolar el primer sitio de encuentro con injurias de diverso índole cuenta con mecanismos que regulan la inflamación a fin de reponer la homeostasis. Clave en este proceso es la Célula de Clara (CC) ya que exhibe capacidad antiinflamatoria e inmunomoduladora, al secretar la proteína CC16 y mecanismos de la inmunidad innata (ii) como el antimicrobiano surfactante D (SP-D). En estímulos Th2 como el asma estos mecanismos son sensiblemente alterados. Por ello y en base a nuevos avances en la terapéutica que tienen como fin reponer el equilibrio Th1/Th2, nuestro objetivo fue evaluar la respuesta de la CC frente al estímulo Th1 inducido por el lipopolisacárido (LPS), ligando del receptor TLR4. Para ello ratones hembras BALB/c fueron instilados vía intranasal con 10 µg/50µl de LPS, y sacrificados a las 4, 6, 8 y 24 horas. Cambios morfológicos se evaluaron mediante microscopía fotónica y electrónica en muestras de pulmón y mediante inmunocitoquímica los cambios en la expresión de CC16, TLR4, SP-D y TNFα. En lavado bronquioalveolar (LBA) se realizó recuento poblacional y cuantificación de TNFα por ELISA. Se observó que en forma temprana LPS induce intensa inmunomarcación de CC16, SP-D, TNFα y TLR4 a las 4 y 6 horas, en correlación con el incremento de TNFα por ELISA (p<0,001) y de neutrófilos en LBA. A nivel ultraestructural se observó hipertrofia de las células, y signos de activación como aumento del RER que se marcó intensamente para CC16 por inmunoelectro microscopía. A las 8 horas la CC muestra dilatación de las cisternas del RER en acuerdo con disminución de TLR4, TNFα, CC16 y SP-D. A las 24 horas la mayor parte de los parámetros se normalizaron. Estos Resultados indican que la CC responde activamente al estímulo Th1 por LPS con aumento en la expresión de moléculas propias de la ii y antiinflamatorias, coincidiendo con los cambios morfológicos. Este tipo de respuesta podría ser utilizada en futuros estudios para modular la inflamación alérgica.

115. (443) ROL DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS BETA 1 EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR GLUCOCORTICOIDES. Mascanfroni I.¹; Alamino V.²; Montesinos M.³; Susperreguy S.⁴; Rabinovich G.⁵; Pellizas C.⁶

CIBICI-CONICET^{1 2 3 4}; IBYME-CONICET⁵; CIBICI-CONICET⁶ <imascan@fcq.unc.edu.ar>

Los glucocorticoides (GC) modulan las respuestas inmunes y son ampliamente usados en desórdenes inflamatorios y autoinmunes. Numerosos estudios han enfatizado el rol de las

células presentadoras de antígeno (APC) en la supresión de la inmunidad mediada por GC. Las células dendríticas (DC) son las principales CPA capaces de estimular células T naive regulando la inmunidad adaptativa. Recientemente demostramos que NFκB interactúa funcionalmente en la región promotora de TRβ1, regulando la expresión de la proteína y poniendo en evidencia a TRβ1 como nuevo gen target de NFκB. El objetivo del presente estudio fue investigar el rol de TRβ1 en la modulación de la respuesta inmune inducida por GC. DC se obtuvieron de células de médula ósea de ratón cultivadas en presencia de GM-CSF, las células fueron tratadas con Dexametasona 10-8 M (DX) durante 24 h o transfectadas con siRNA para TRb1 y posteriormente expuestas a la acción de LPS durante 18. Marcadores de maduración y la secreción de IL-10 fueron evaluados. La expresión de TRb1 fue determinada por WB y la de IL-27 cuantificada por PCR en tiempo real. Los Resultados indicaron que el efecto mediado por LPS en DC (incrementada expresión de CD40, CD80, CD86) fue prevenido tanto por el tratamiento con DX (P < 0.01) como por el silenciamiento de TRb1 (P < 0.01), más aun estas DC mostraron un fuerte incremento en la expresión de IL-27 (3 y 5 veces vs. Control respectivamente, P < 0.01) e indujeron una incrementada secreción de IL-10 en co-cultivo con linfocitos T alogénicos (400 y 800 pg/ml vs. 60 pg/ml control, P < 0.001). Sorprendentemente la expresión de TRb1 en DC tratadas con DX fue dramáticamente disminuida. Estos Resultados indican fuertemente un importante rol de TRb1 en la regulación de la respuesta inmune adaptativa mediada por DC, abriendo nuevas perspectivas para la manipulación de estas células lo cual podría tener profundas implicaciones en inmunoterapéuticas, incluyendo autoinmunidad y cáncer.

116. (756) TRIIODOTIRONINA (T³) PROMUEVE EL DESARROLLO DE UNA RESPUESTA CITOTÓXICA ANTÍGENO-ESPECÍFICA A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS. Alamino V.¹; Mascanfroni I.²; Montesinos M.³; Susperreguy S.⁴; Morón G.⁵; Masini-repiso A.⁶; Rabinovich G.⁷; Pellizas C.⁸

CIBICI-CONICET^{1 2 3 4 5 6}; IBIME-CONICET⁷; CIBICI-CONICET⁸ <valamino@fcq.unc.edu.ar>

Previamente demostramos que células dendríticas (DC) de ratón expresan el receptor de hormonas tiroideas beta 1 (TRβ1) y que niveles fisiológicos de la hormona tiroidea activa (triodotironina, T3) estimulan la maduración de DC y la producción de IL-12, aumentando la capacidad aloestimuladora de linfocitos T y direccionando la respuesta hacia un perfil Th1. El objetivo de este trabajo fue investigar la capacidad de DC estimuladas con T3 de modular 1) la citotoxicidad antígeno específica in vivo y 2) la presentación cruzada de antígeno in vitro. Para 1) DC fueron pulsadas con OVA+T3 (5nM) por 30 min e inyectadas endovenosamente (ev) a ratones C57BL/6. Siete días post-inmunización, los ratones fueron inyectados ev con una mezcla de esplenocitos (1:1; control:OVA257-264) marcados con CFSE a distintas concentraciones (0.5 µM control:3 µM OVA257-264). Veinticuatro h post-inyección los bazos de los ratones inmunizados fueron procesados para la determinación de la abundancia de células marcadas con CFSE por citometría de flujo. Para 2) DC pulsadas con OVA+T3 fueron co-cultivadas durante 24 hs con células de hibridoma B3Z (reconocen OVA exclusivamente en el contexto MHC I). Se midieron los niveles de β-Gal (expresión controlada por el promotor de IL-2) en sobrenadantes. Nuestros Resultados indicaron: 1) T3 aumentó la habilidad de DC de estimular una respuesta citotóxica antígeno-específica (reducción de células marcadas con CFSE 3µM), 2) T3 incrementó la presentación cruzada de OVA (aumento de la expresión de βGal). Estos Resultados evidencian el rol crítico de la hormona tiroidea en la inducción de una respuesta citotóxica antígeno específica, lo cual podría tener implicancias en los diversos desórdenes inmunológicos evidenciados en las patologías tiroideas. Más aún, serían relevantes en inmunoterapia, incluyendo cáncer.

117. (157) ZNT8A: IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO MARCADOR INVOLUCRADO EN LA DIABETES MELLITUS AUTOINMUNE. Trabucchi A.¹; Faccinetti N.²; Guerra L.³; Iacono R.⁴; Poskus E.⁵; Valdez S.⁶

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bio-química, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. R. A. Margni (IDEHU), CONICET-UBA^{1 2 3 4 5 6}. <atrabucchi@ffyb.uba.ar>

La Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 es una enfermedad autoinmune órgano-específica dependiente de células T. La presencia de autoanticuerpos específicos contra proteínas de los islotes pancreáticos circulantes (marcadores) es indicio de la autoinmunidad subyacente que precede a la enfermedad clínica. La medida combinada de anticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (GADA), anti-proteína tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A) y anti-insulina/proinsulina (IAA/PAA) identifica a más del 80% de los pacientes en debut o en riesgo de desarrollar diabetes. En 2007 se identificó un nuevo autoantígeno, el transportador de Zn, ZnT8, específico de células beta pancreáticas, sumándose a la tríada clásica un nuevo marcador de autoinmunidad. Objetivos: determinar la prevalencia de anticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A) en individuos diabéticos debutantes y grupos de riesgo, y en la población diabética adulta tipo LADA. Metodología: se estudiaron mediante el método de referencia RBA (Radioligand Binding Assay, o técnica de unión de radioligando), muestras de pacientes debutantes con DM tipo 1 y muestras de individuos diabéticos diagnosticados en edad adulta. Los Resultados se expresaron en Unidades de Desvío Estándar (sDS). Resultados: sobre el total de 71 pacientes con DM tipo1 evaluados, 55 (77%) resultaron positivos para GADA, 22 (31%) resultaron positivos para IA-2A, 35 (49%) para IAA y 48 (68%) fueron positivos para ZnT8A. En individuos con DM diagnosticada en la edad adulta (n=55), las prevalencias relativas de los distintos marcadores fueron 22% para GADA, 7% para IA2A, 9% para ZnT8A y 25% para IAA. Conclusiones: El descubrimiento de ZnT8 como el 4to autoantígeno en diabetes provee una medida adicional para la incidencia y progresión de la enfermedad. La determinación de ZnT8A junto con otros marcadores aumenta la sensibilidad de detección de autoinmunidad de un 84% a más del 94% en DM tipo1.

118. (59) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN NIÑOS CON HEPATITIS AUTOINMUNE TIPO I SOMETIDOS A TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR. Ferreyra Solari N.¹; Galoppo C.²; Cuarterolo M.³; Garrote J.⁴; Chernavsky A.⁵

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina.¹; Hospital de niños "Dr. Ricardo Gutiérrez", Buenos Aires, Argentina.²; Hospital de niños "J.P. Garrahan", Buenos Aires, Argentina.³; Unidad de Investigación. Hospital Clínico Universitario-IECSCYL. Valladolid, España.⁴; Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina.⁵ <nachieuge@yahoo.com.ar>

La inmunosupresión es el tratamiento convencional para la Hepatitis Autoinmune tipo I (HAI). Los riesgos de recaída indican que éste no debe interrumpirse a pesar de ser alcanzada la remisión bioquímica. Un desbalance en poblaciones inmunoregulatorias y mediadores inflamatorios serían responsables del inicio/perpetuación del ataque autoinmune. Nos propusimos evaluar la expresión de transcriptos asociados a presencia y/o control funcional de subpoblaciones efectoras e inmunoregulatorias en pacientes al diagnóstico (HAI) y durante la en remisión bioquímica por tratamiento inmunosupresor (HAIr). Estudiamos la expresión de FoxP3, Vα24, TGF-β, IL-6, IL-21, IL-27p28, IL-23p19, IL-12p35, IL-12p40, IL-17 e IFNγ en HAI (n=12), HAIr (n=22) y controles (Co; n=15) mediante real-time PCR. Los Resultados fueron analizados con test Krustall-Wallis. Demostramos mayor expresión de FoxP3, IL-21 e IFNγ en HAI con respecto a HAIr (p=0.001, p=0.02, p=0.03) y Co (p=0.0003, p=0.03, p=0.0006). La expresión de Vα24, IL-27p28 e IL-12p40 fue mayor en HAI (p=0.001, p=0.05, p=0.05) y HAIr (p=0.05, p=0.0003, p=0.05) con respecto a Co. No se encontraron diferencias para

los transcriptos de TGF-β, IL-23p19, IL-12p35 e IL-17. La actividad inmune en HAI se caracteriza por la expresión de IFNγ, IL-12p40 e IL-27p28, así como Vα24 (células NKT) y FoxP3 (LTreg) que reflejan la presencia simultánea de respuesta innata y adaptativa (Th1). Sin embargo, no encontramos indicios de intervención de la respuesta Th17 en esta patología. El intento de contrarrestar el ataque autoinmune evidenciado por un aumento local de LTreg, sería funcionalmente impedido por IL-21, que induciría resistencia a la acción supresora de los LTreg sobre LTCD4+. Algunos marcadores inflamatorios permanecen alterados aún en remisión bioquímica. Estos Resultados sugieren la necesidad de implementar nuevas estrategias terapéuticas que pudieran llevar la actividad inmune al mínimo.

NEUROCIENCIAS 1

119. 210) TRABAJO EN TURNOS, SUEÑO REDUCIDO Y CORTISOL SALIVAL EN CONDUCTORES DE COLECTIVOS DE CORTA DISTANCIA. Díez J.¹; Vigo D.²; Pérez Lloret S.³; Rigters S.⁴; Role N.⁵; Cardinali D.⁶; Pérez Chada D.⁷

Universidad Austral, Departamento de Fisiología¹; Univ. Buenos Aires; CONICET²; Univ. Buenos Aires^{3 4 5}; Univ. Buenos Aires, Univ. Católica Argentina⁶; Hospital Austral⁷. <diezjoaquinjose@gmail.com>

El trabajo en turnos no diurnos (fuera del horario 7:30-8:00 a 17:00-18:00) se asocia en distintas poblaciones a un aumento en el riesgo de accidentes y a la presencia de patologías crónicas como obesidad, resistencia a la insulina e hipertensión. Las alteraciones en el ritmo sueño vigilia y en el ritmo de secreción de cortisol pueden justificar dichos trastornos. El objetivo del presente trabajo fue explorar si existen diferencias en dichos parámetros entre distintos turnos de trabajo en una muestra de conductores profesionales de transporte de pasajeros urbano. Se evaluaron 48 conductores de colectivos varones durante 7 días mediante un actígrafo de muñeca, acompañado por una agenda diaria de sueño. Entre el tercer y cuarto día se evaluó la diferencia día (7am) - noche (10pm) de cortisol salival. La muestra fue dividida en dos grupos según si trabajaban a la mañana (n = 18) o a la tarde (n = 30). Se buscaron diferencias de tiempo total de sueño (TTS), eficiencia de sueño (EFS), cortisol matutino (CM), cortisol nocturno (CN) y diferencia día noche de cortisol (DC) entre los grupos resultantes mediante el test de t para muestras independientes. Los valores se expresan como media ± error estándar. El horario del turno mañana (M) fue de 7.98 ± 1.32 a 16.65 ± 1.27 y el del turno tarde (T) de 12.52 ± 1.13 a 20.54 ± 4.04. Se encontraron diferencias significativas en los valores de TTS (M: 325,96 min ± 68.28; T: 386,16 min ± 50.16; p = 0.002) y DC (M: 0.089 ± 0.229; T: 0.245 ± 0.247; p = 0.038), siendo CM, CN y EFS similar en ambos grupos. Conclusiones: El trabajo en el turno mañana se asoció a un menor tiempo de sueño y a una pérdida de la diferencia día noche de cortisol. Futuros estudios deberán evaluar si existe relación de estos parámetros con el riesgo de accidentes y la aparición de patologías crónicas.

120. (363) DIABETES MELLITUS DE TIPO I: IMPLICANCIAS SOBRE LA HIPERGLUCEMIA Y LOS RITMOS CIRCADIANOS. Ramos Lobo A.¹; Vignolo M.²; Gobetto M.³; Karadayian A.⁴; Scacchi Bernasconi P.⁵; Cutrera R.⁶

Laboratorio de Neurobiología y Ritmos, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA.^{1 2 3 4 5 6} <angieramoslobo@gmail.com>

En mamíferos, los núcleos supraquiasmáticos hipotalámicos (NSQ), reconocidos como el reloj endógeno central, coordinan los ritmos en todo el organismo, regulando los cambios diarios y estacionales y estableciendo además una jerarquía sobre los relojes periféricos. Por otra parte, la diabetes mellitus tipo I (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia, polifagia, polidipsia y glucosuria. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la DM sobre los osciladores periféricos del

ratón C57BL/6, analizando parámetros de la actividad de rueda: media (ME), amplitud (AM) y acrofase (AF) y el efecto de la actividad física sobre la glucemia (GLC). Ratonos machos C57BL/6 de 8 semanas se mantuvieron en un fotoperíodo 12:12 LD. Algunos de ellos recibieron estreptozotocina (STZ) para inducir DM (170mg/kg). Posteriormente, se dividieron en 4 grupos: 1) buffer citrato con rueda disponible (CT/R), 2) buffer citrato sin rueda disponible (CT/SR), 3) estreptozotocina con rueda disponible (STZ/R) y 4) estreptozotocina sin rueda disponible (STZ/SR). Se evaluó la actividad de rueda durante 30 días post-inyección. Se analizó la ME, la AM y la AF en animales CT/R y STZ/R. Se determinó la GLC a los días 0 (basal), 10, 30 y 60, post-inyección en los 4 grupos. Los STZ/R aumentaron su GLC respecto a los CT/R en los tres puntos considerados ($p < 0.001$). Lo mismo se observó para los animales sin rueda ($p < 0.001$). La GLC de los STZ/R no difirió significativamente de los STZ/SR, aunque se observó una tendencia al aumento en los STZ/R ($p = 0.08$). Respecto a la actividad de rueda, los STZ/R presentaron menor AM que los CT/R ($p = 0.029$) así como un corrimiento de la AF ($p = 0.026$). La ME de los STZ/R no mostró diferencias significativas con sus controles pero disminuyó considerablemente ($p = 0.058$). Se concluye que la actividad física provocada por la rueda no fue suficiente para modificar la hiperglucemia en los STZ. Sin embargo, los osciladores periféricos parecen alterarse.

121. (737) LA DISMINUCIÓN EN LA DISPONIBILIDAD DE HIERRO PREVIENE LA DESMIELINIZACIÓN INDUCIDA POR CUPRIZONA. Badaracco M.¹; Rosato Siri M.²; Ferrari A.³; Toscano M.⁴; Rabinovich G.⁵; Pasquini J.⁶

Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA^{1 2}; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. R A Margni". IDEHU³; IBYME-CONICET^{4 5}; Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA⁶ <mebadaracco@yahoo.com.ar>

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del SNC. Se ha demostrado que la deficiencia de Fe protege del desarrollo de una Encefalomiélitis Autoinmune Experimental (EAE). Trabajando con otro modelo de desmielinización en ratas inducido por ingesta de Bis-(ciclohexanona)-oxaldihidrazona (Cuprizona CPZ), observamos que el efecto de CPZ en roedores destetados evidencia una desmielinización tóxica en que la apoptosis de oligodendrocitos maduros precede a la desorganización de las vainas de mielina. Pasquini (2007) informaron que los efectos de la intoxicación por CPZ dependen de la activación previa de la microglia. Nuestro objetivo es estudiar si el Fe media el efecto desmielinizante en este modelo. Ratas Wistar preñadas se alimentaron con dieta control (40 mg Fe/kg) o deficiente en Fe (ID) (4-6 mg Fe/kg). A los 3 días post natal fueron inyectadas intracranalmente (ICI) con solución salina o apotferrina (aTf). Post destete, algunos animales de cada grupo se intoxicaron con 0.6% de CPZ por 2 semanas. El grado de desmielinización se analizó por tinción de mielina e inmunohistoquímica (IHQ) con Acs anti proteína básica de mielina (MBP). La activación de microglia se estudió por IHQ con CD11b y se evaluaron parámetros de respuesta inflamatoria -perfiles de citoquinas y activación de células Treg (Foxp3, Gata3, Tbet). La CPZ no indujo desmielinización tan severa en estos animales como en los controles. En los ID la inmunoreactividad contra CD11b fue marcadamente menor. La ICI de aTf incrementó la mielina en controles y en ID, siendo el efecto de CPZ mayor en animales previamente inyectados con aTf; dado que la aTf favorece la maduración de precursores oligodendrogiales (Paez 2000), puede afirmarse que CPZ afecta preferencialmente los oligodendrocitos maduros. El modelo ID también aporta evidencias de asociación entre intoxicación con CPZ y respuesta inflamatoria

122. (750) EFECTO NEUROMODULADOR POSITIVO DE PROGESTERONA SOBRE LAS TERMINALES DOPAMINÉRGICAS DEL CUERPO ESTRIADO DE RATAS SOMÉTIDAS A NEUROGENERACIÓN CON ⁶OH-DOPAMINA. Casas S.¹; Giuliani F.²; Nanfaro F.³; Cerioni S.⁴; Yunes R.⁵; Cabrera R.⁶

Area de Farmacología Facultad de Ciencias Médicas UNCuyo Centro de Investigación Superior Universidad de Mendoza LINCE IMBECU CONICET^{1 2 3 4 5 6}. <casas_sebastian@hotmail.com>

Los esteroides neuroactivos son sintetizados por las glándulas esteroideogénicas periféricas y actúan sobre sistema nervioso central modulando su funcionalidad. Clásicamente se ha asociado a los esteroides sexuales con los procesos reproductivos y del comportamiento asociado. En los últimos años se los ha propuesto como potentes inductores de neuroprotección y neuroregeneración frente a neuropatologías experimentales. Nuestro objetivo fue estudiar si progesterona (P) administrada s.c modifica el patrón de liberación de dopamina (DA) de las terminales dopaminérgicas nigroestriales, en ratas macho lesionados con 6OH dopamina. Se diseñaron 4 grupos experimentales: 1) Sham, 2) Lesionados, 3) Lesionados y tratados a los 7 días post-lesión (3 dosis de progesterona s.c 4mg/kg) 4) Lesionados y tratados a las 24 hs post-lesión (3 dosis de progesterona s.c 4mg/kg). A las 8 semanas post-lesión, los animales fueron sacrificados por decapitación y se evaluó la actividad dopaminérgica de los cuerpos estriados derecho e izquierdo en forma individual, utilizando el método de superfusión dinámica. Los Resultados se expresaron como la media \pm SEM del porcentaje de 3H-DA liberada, inducida por K⁺, respecto de la liberación basal. Se analizaron por "t" Test ($p < 0.05$ fue significativo) ($n = 10/\text{grupo}$). El grupo 1 no mostró diferencias significativas en las liberaciones entre ambos cuerpos estriados, (derecha (D)=46.0 \pm 4.76%; izquierda (I)=42.8 \pm 2.3%). Diferencias significativas fueron observadas en el grupo 2 (D=53.8 \pm 4.1; I= 25.5 \pm 1.67%; $p < 0.0001$). Contrariamente no se observaron diferencias significativas en el patrón de liberación de dopamina tanto en el grupo 3 (D=38.7 \pm 3.7%; I=30.0 \pm 1.7%) como en el grupo 4 (D= 40.0 \pm 3.2%; I= 32.7 \pm 3.2%) La administración subcutánea de progesterona ejerce un efecto neuromodulador positivo a largo plazo, sobre las terminales nigroestriales dopaminérgicas, proponiendo a este esteroide como un potencial neuroprotector frente a noxas neurotóxicas.

123. (198) RELACIÓN ENTRE FACTORES PRONÓSTICOS DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA Y HORMONAS ESTEROIDES ENDÓGENAS. Gargiulo Monachelli G.¹; Meyer M.²; Rodriguez G.³; Garay L.⁴; Sica R.⁵; De Nicola A.⁶; Gonzalez Denisse M.⁷

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; División Neurología del Hospital Ramos Mejía¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET²; División Neurología del Hospital Ramos Mejía³; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁴; Secretaría de Ciencia y Técnica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.⁵; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; Depto. de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{6 7}. <gargiulo@dna.uba.ar>

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad degenerativa de la motoneurona. Mayor edad, menor tiempo al diagnóstico, inicio bulbar y progresión rápida son indicadores de mal pronóstico. Previamente demostramos aumento de progesterona (PROG) y cortisol séricos en pacientes respecto a controles. El objetivo fue estudiar la relación entre PROG, cortisol y testosterona total con factores pronósticos, ritmo de progresión y sobrevida. Se seleccionaron 27 pacientes y 21 controles pareados por edad y género, y se evaluaron niveles séricos hormonales por radioinmunoensayo (RIA). En los pacientes se hallaron niveles 1.4 veces superiores para las 3 hormonas: PROG [ELA (media \pm SEM): 0.55 \pm 0.06 ng/ml vs control: 0.38 \pm 0.04 ($p < 0.05$)], cortisol [17.02 \pm 1.60 mg/dl vs 11.83 \pm 1.38 ($p < 0.05$)] y testosterona [306.15 \pm 55.94 pg/ml vs 213.06 \pm 45.52 ($p = \text{ns}$)]. Pacientes masculinos presentaron PROG y testosterona más elevadas que los femeninos [PROG: hombres 0.66 \pm 0.085 ng/ml vs mujeres 0.37 \pm 0.061 ($p = 0.02$) y testosterona: 501.58 \pm 64.36 pg/ml vs 35.57 \pm 4.97 ($p < 0.001$)], sin diferencias para cortisol. Entre pacientes vs controles del mismo género, solo fue significativo el aumen-

to de testosterona en mujeres con ELA [35.57±4.97 pg/ml vs 18.58±4.01 (p=0.01)]. Con respecto a factores pronósticos, hubo correlación negativa entre PROG y edad (RRho= -0.48, p=0.01) y positiva con tiempo al diagnóstico (RRho=0.36, p=0.06). Se observó menor PROG en ELA bulbar (p<0.05) y en pacientes de progresión rápida (p=0.008). Se demostró una correlación positiva entre niveles de progesterona y meses de supervivencia (RRho=0.43, p=0.04). No se halló correlación entre estos parámetros y cortisol o testosterona. En conclusión, los niveles endógenos hormonales elevados en ELA podrían ser secundarios a activación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal. Sin embargo, sólo PROG demostró asociación positiva con buen pronóstico y supervivencia, sugiriendo la influencia favorable de la PROG endógena sobre la evolución de la ELA.

124 (60) RECEPTORES DE ADENOSINA A₂A: MECANISMOS DE FACILITACIÓN PRESINÁPTICA EN TERMINALES NERVIOSAS MOTORAS. Palma A.¹; Muchnik S.²; Losavio A.³

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari^{1 2 3} <idimneurofisis@gmail.com>

Previamente encontramos que en sinapsis motoras el agonista de los receptores (R) de adenosina A₂A CGS21680C (CGS) facilita la liberación espontánea de ACh por un mecanismo independiente de los canales de calcio voltaje dependiente (CCVD) presinápticos. Para evaluar si el efecto de CGS está asociado a un incremento de la [Ca²⁺] estudiamos su acción en hemidiafragmas de ratones CF1 incubados con el quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA-AM. Este tratamiento bloqueó el efecto de CGS en soluciones isotónicas: frecuencia (f)MEPPs 0Ca²⁺-BAPTA-AM 25.4±2.4% del control, 0Ca²⁺-BAPTA-AM+CGS 26.9±1.7% (n=5) y en soluciones hipertónicas (SH): 0Ca²⁺-BAPTA-AM pico curva 22.9±3.8%, área curva 22.0±2.1%, 0Ca²⁺-BAPTA-AM+CGS pico 22.6±7.0%, área 25.8±2.3% (n=5). La elevación de [Ca²⁺] puede ser consecuencia del influjo de Ca²⁺ desde el espacio sináptico o su liberación desde los depósitos intracelulares. La incubación en 0Ca²⁺-EGTA no ocluyó el efecto de CGS en condiciones isotónicas ni hipertónicas, mientras que la depleción de los depósitos de Ca²⁺ intracelulares con tapsigargina (TG) previno la modulación de CGS: fMEPPs TG 94.2±6.2%, TG+CGS 104.9±6.1% (n=4); SH TG pico 95.7±5.0%, área 87.8±5.2%, TG+CGS pico 93.0±2.9%, área 92.2±10.3% (n=4). Experimentos realizados en 15 mM K⁺ mostraron que el efecto de CGS (↑fMEPPs ~60%) no fue observado en presencia de TG (fMEPPs K⁺15: Control 626.7±60.9% de RN, TG 577.8±14.6%, TG+CGS 515.7±18.5%, n=4) ni del bloqueante de los CCVD tipo-L nitrendipina (NIT): Control 510.1±18.1%, NIT 522.8±39.4%, NIT+CGS 483.6±37.0%, n=3. El inhibidor de los CCVD tipo-P/Q ù-Agatoxina IVA no modificó la acción de CGS. Los Resultados sugieren que la activación de los RA₂A facilita la liberación espontánea de ACh incrementando el Ca²⁺ liberado desde los depósitos intracelulares. La modulación de la liberación asincrónica de ACh inducida por K⁺ se debería a la movilización de Ca²⁺ desde los depósitos internos y desde el espacio sináptico a través de los CCVD tipo-L.

ONCOLOGIA 2

125 (3) EL FLAVONOIDE SINTÉTICO 2'-NITROFLAVONA INHIBE SELECTIVAMENTE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS: ESTUDIO DE SU MECANISMO DE ACCIÓN EN UNA LÍNEA DE CÉLULAS PROMIELOCÍTICAS (HL-60). Cárdenas M.¹; Marder N.²; Roguin L.³

IQUIFIB (UBA-CONICET) Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires^{1 2 3} <cardenasmariano@gmail.com>

En trabajos previos demostramos la eficacia antitumoral, tanto in vitro como in vivo, del derivado sintético 2'-nitroflavona (2'-NF) en diferentes líneas de células provenientes de adenocar-

cinomas humanos y murinos. Con el fin de evaluar el efecto de este compuesto en neoplasias de origen hematológico, determinamos su potencia antiproliferativa en ocho líneas celulares provenientes de leucemias y linfomas. Asimismo, como control de selectividad se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) extraídas de individuos sanos. Las células HL-60 (leucemia promielocítica aguda) fueron las más sensibles al tratamiento con 2'-NF con una IC₅₀ de 1±0,5 µM, seguidas por las células K-542 (leucemia mieloide crónica) con una IC₅₀ de 2±0,5 µM. El Linfoma de Burkitt Daudi fue el más resistente al tratamiento con este flavonoide (IC₅₀> 20 µM). El crecimiento de las PBMC no fue significativamente inhibido hasta una concentración 80 µM de 2'-NF. Con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de la 2'-NF, evaluamos la capacidad de este compuesto de inducir apoptosis en células HL-60. Por ensayos de citometría de flujo demostramos que la 2'-NF arresta el ciclo celular en G₂/M luego de 6 h y aumenta posteriormente la población de células hipodiploides en función del tiempo de incubación (3±1% control vs. 38±1% a las 14 h; 3±1% control vs. 54±5% a las 24 h). Asimismo, después de incubar las células HL-60 durante 24h con 2'-NF se observó un patrón de fragmentación "en escalera" del ADN cromosomal mediante electroforesis en geles de agarosa y la presencia de células con morfología apoptótica por microscopía de fluorescencia (tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio). Los Resultados obtenidos indican que la 2'-NF se comporta como un agente antitumoral potente y selectivo, que ejerce su acción antiproliferativa arrojando el ciclo celular e induciendo apoptosis. Este compuesto podría ser de potencial utilidad para el tratamiento de leucemias.

126 (45) GALECTINA-8 MODULA LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES VASCULARES. Cárdenas Delgado V.¹; Nugnes L.²; Troncoso M.³; Croci D.⁴; Rabinovich G.⁵; Wolfenstein-todel C.⁶; Elola M.⁷

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica-UBA-CONICET^{1 2 3}; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET^{4 5}; Instituto de Química y Fisicoquímica Biológica-UBA-CONICET^{6 7} <vimmanuel_cd@yahoo.com.ar>

Anteriormente, nuestro grupo demostró que la galectina-8 (Gal-8) actúa como factor proangiogénico in vivo y que, además, se expresa en endotelio vascular de tejidos normales y tumorales. Con el objetivo de validar los Resultados que señalan a la Gal-8 como agente proangiogénico examinamos: 1) la localización y expresión en células endoteliales por inmunofluorescencia; 2) la actividad sobre células endoteliales en dos ensayos de funcionalidad in vitro y 3) la presencia de proteínas que interactúan específicamente con la Gal-8 en un extracto de células endoteliales. Los Resultados demostraron la presencia de la lectina tanto en núcleo como en el citoplasma de las células BAEC. Estudios de Western Blot y citometría de flujo confirmaron la expresión de la Gal-8. Por otra parte, se analizó por medio del ensayo de la herida la migración de las células BAEC bajo distintas condiciones en respuesta a dosis bajas (1,25-40 nM) de Gal-8 inmovilizada. En esta técnica, se introduce una herida en una monocapa de células endoteliales confluentes y se determina el porcentaje de reducción comparando el ancho de la herida al inicio del experimento y a las 16 horas. Se encontró que la Gal-8 estimula la migración de las células BAEC (Control=21,4±1,6% vs Gal-8 (5 nM)=57,8±2,5 %, p<0,01). Se demostró, además, que las células BAEC cultivadas en Matrigel en presencia de dosis bajas (5-20 nM) de Gal-8 inmovilizada experimentan la formación de una extensa red de túbulos capilares (Control=100±12,8% vs Gal-8 (5 nM)=298,1±31,4%, p<0,01). Estos Resultados se confirmaron con la línea de células endoteliales HMEC-1 representativa del endotelio microvascular. Finalmente, se logró identificar a CD166 como posible ligando de superficie. Se concluye que la Gal-8 se expresa en células endoteliales vasculares y que actúa como factor proangiogénico, pudiendo constituir una señal difusible cuyo aumento en el microambiente tumoral desencadenaría la neovascularización.

127 (51) ESTUDIO DE LA REGULACIÓN GÉNICA DEL ONCOGEN RSPO3 A TRAVÉS DE LA INTERACCIÓN ENTRE FOXP3 Y RUNX1. Grasso E.¹; Recouvreur M.²; Castilla L.³; Kordon E.⁴; Rubinstein N.⁵

LEGMA-IFIBYNE-FCEyN-UBA, Buenos Aires, Argentina.¹ ; Program in Gene Function and Expression, UMASS, Worcester, USA.² ; LEGMA-IFIBYNE-FCEyN-UBA, Buenos Aires, Argentina.^{4 5} <estebangrasso@gmail.com>

Nuestro laboratorio estudia la actividad y regulación del oncogén RSPO3, el cual es capaz de inducir tumorigénesis mamaria. El análisis de su secuencia promotora 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 mamaria normal y LM3 como línea mamaria tumoral. Por técnicas de PCR y WB, hallamos que LM3 expresa niveles de RSPO3 significativamente más altos que SCP2 mientras que el nivel de expresión de FOXP3 es mayor en SCP2 y el de RUNX1 es similar en ambas líneas. Luego, a través de ensayos gel-shift utilizando como sonda un fragmento de la región promotora de RSPO3 conteniendo un sitio consenso para RUNX1, se reveló un significativo retardo de la sonda de mayor intensidad en LM3. Dicho retardo fue alterado por la co-incubación con anticuerpo anti-RUNX1, lo que sugiere la unión de esta proteína como responsable de las diferencias observadas. Por medio de ensayos de co-inmunoprecipitación se detectó la interacción entre FOXP3 y RUNX1 en células SCP2. Así mismo, ensayos de microscopía confocal sugieren que dicha interacción ocurre en el núcleo. Por último, se sobre-expresó RUNX1 en células SCP2 y por medio de WB se detectó un incremento significativo del nivel de expresión de RSPO3. 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.

128 (102) LA HEMO OXIGENASA 1 (HO-1) REGULA EL CRECIMIENTO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA IN VIVO A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE MMP9. Gueron G.¹; De Siervi A.²; Elguero B.³; Ferrando M.⁴; De Luca P.⁵; Salierno M.⁶; Navone N.⁷; Meiss R.⁸; Vazquez E.⁹

Dpto. Química Biológica- FCEN-UBA^{1 2 3 4 5} ; INQUIMAE-FCEN-UBA⁶ ; Department of Genitourinary Medical Oncology, The University of Texas, M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX⁷ ; Academia Nacional de Medicina, Bs As, Argentina⁸ ; Dpto. Química Biológica- FCEN-UBA⁹ <ggueron@gmail.com>

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por enfermedades neoplásicas en hombres y la inflamación es uno de los principales factores de riesgo. Es ampliamente aceptado el efecto citoprotector de la Hemo Oxigenasa 1 (HO-1), contrarrestando el estrés oxidativo e inflamatorio. Mediante estudios previos realizados in vitro demostramos que HO-1 inhibe la proliferación, migración e invasión de células de PCa e identificamos a MMP9 como un blanco downstream de HO-1. En este trabajo investigamos el rol de la sobreexpresión de HO-1 y sus consecuencias sobre el crecimiento de tumores in vivo. A partir de una línea de PCa humano, generamos la línea PC3HO-1 por transfección estable de HO-1 y su control transfectada con el vector vacío (PC3pcDNA3). Ratones atímicos desnudos machos de 6-8 semanas se separaron en dos grupos y se inyectaron sc con 3.6x10⁶ células PC3HO-1 (n=5) y PC3pcDNA3 (n=5). El crecimiento de los tumores se midió cada dos días comenzando a los 8 días post-inoculación. El crecimiento tumoral se redujo

significativamente (58.6%, P<0.05) en los ratones inoculados con PC3HO-1 a 23 días de generación de los xenógrafos, comparados con los tumores PC3pcDNA3 (volumen: 49 mm³ vs 118 mm³). Los tumores con sobreexpresión de HO-1 presentaron reducido índice mitótico. Mediante RT-qPCR comprobamos que los niveles del ARNm de MMP9 eran significativamente inferiores en los xenógrafos PC3HO-1 comparados con los controles. Por inmunohistoquímica determinamos que los tumores PC3pcDNA3 expresaban alta inmunoreactividad de MMP9 citoplasmática mientras que la expresión de HO-1 fue negativa en todos los tumores de ese grupo. Por el contrario, en ninguno de los tumores PC3HO-1 se detectó expresión de MMP9 mientras que en todos la expresión de HO-1 fue positiva, detectándose tanto en citoplasma como en núcleo. Estos Resultados indican que HO-1 juega un rol clave como intermediario en la vía de conexión de MMP9 y la progresión del cáncer de próstata.

129 (58) EL TRATAMIENTO IN VIVO CON INTERFERÓN (IFN-A2B) ATENÚA LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA WNT/BETA-CATENINA/TCF Y ESTIMULA APOPTOSIS EN LA PRENEOPLASIA HEPÁTICA DE RATA. Parody J.¹; Alvarez M.²; Quiroga A.³; Ceballos M.⁴; Francés D.⁵; Pisani G.⁶; Pellegrino J.⁷; Carnovale C.⁸; Carrillo M.⁹

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)^{1 2 3 4 5}; Area de Morfología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.⁶ ; Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)^{7 8 9} <parody@ifise-conicet.gov.ar>

La vía Wnt/ β -catenina/TCF está anormalmente activada en varios tipos de cáncer, siendo la característica más importante la acumulación citosólica de β -catenina. Al migrar al núcleo se asocia a TCF y activa la transcripción de diversos genes relacionados con la proliferación celular. En condiciones de estrés oxidativo, β -catenina se asocia a FOXO gatillando el arresto del ciclo celular y la apoptosis. Previamente demostramos que el tratamiento con IFN- α 2b reduce el número y volumen de focos de hepatocitos alterados mediante un proceso apoptótico mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS) y TGF- β 1. Por esto, estudiamos los efectos del IFN- α 2b sobre la vía Wnt/ β -catenina/TCF en una etapa temprana del desarrollo carcinogénico. Los grupos en estudio fueron: C, control; C+IFN, control que recibieron tratamiento con IFN- β 2b; IP, animales con preneoplasia hepática e IP+IFN, animales IP que recibieron tratamiento con IFN- α 2b. Por inmunohistoquímica de fluorescencia encontramos acumulación citosólica y disminución en membrana de β -catenina en IP e IP+IFN. La relación β -catenina/p- β -catenina se vio aumentada en IP e IP+IFN. Por RT-PCR semicuantitativa observamos aumento significativo de genes blanco de TCF en IP mientras que en IP+IFN estos niveles fueron comparables a los de C. Además, encontramos aumento significativo de genes blanco de FOXO sólo en IP+IFN. Por inmunoblotting encontramos sobreexpresión del receptor Frizzled-7 en el grupo IP y estos valores se restauraron luego del tratamiento con IFN- α 2b. Por coimmunoprecipitación demostramos asociación directa de β -catenina con TCF sólo en animales IP. Estos datos sugieren que el tratamiento in vivo con IFN- α 2b, que produce un aumento de ROS, estimula la actividad transcripcional de FOXO. Por lo tanto, la decisión de proliferación celular (unión de β -catenina a TCF) o muerte celular programada (unión de β -catenina a FOXO) es un proceso regulado por ROS.

130 (150) DETECCIÓN MOLECULAR DE LA GD² SINTASA EN EL RETINOBLASTOMA. Laurent V.¹; Otero L.²; Vazquez V.³; Camarero S.⁴; Gabri M.⁵; García De Dávila M.⁶; Chantada G.⁷; Alonso D.⁸

Laboratorio de Oncología Molecular - Universidad Nacional de Quilmes; Servicio de Patología - Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan¹ ; Laboratorio de Oncología Molecular - Universidad Nacional de Quilmes^{2 3}; Servicio de Patología - Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan⁴ ; Laboratorio de Oncología Molecular - Univer-

sidad Nacional de Quilmes⁵; Servicio de Patología - Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan⁶; Servicio de Hemato-Oncología - Hospital de Pediatría Prof. Dr. Juan P. Garrahan⁷; Laboratorio de Oncología Molecular - Universidad Nacional de Quilmes⁸ <velaurent@gmail.com>

La diseminación extraocular es la principal causa de muerte en pacientes con retinoblastoma (RB) en países en desarrollo. Hasta el momento no se ha estudiado un marcador molecular que permita identificar a aquellos pacientes enucleados de alto riesgo que presenten enfermedad mínimamente diseminada (EMD). La detección de EMD con técnicas moleculares podría ayudar a predecir la progresión metastásica e, incluso, a definir el requerimiento de conductas terapéuticas más agresivas. La expresión de la enzima sintasa del gangliósido GD2 ha sido utilizada previamente para valorar EMD en tumores pediátricos como el neuroblastoma. El objetivo de este trabajo fue desarrollar la aplicación de una secuencia de esta enzima para detectar células de RB mediante la RT-PCR anidada del mensajero. Se optimizaron las condiciones de amplificación in vitro utilizando cebadores de diseño interexónico y 5 ng de ARN total de las líneas celulares Y79 y WERI-Rb1 de RB humano. La sensibilidad alcanzada fue de 200 pg de ARN total con la primera ronda de amplificación para un producto de 347 pb y de 40 pg con la segunda para un amplicón interno de 180 pb. Se confirmó también la expresión de GD2 sintasa por RT-PCR e inmunohistoquímica en tumores de las líneas celulares xenotransplantadas y de pacientes. Adicionalmente, se encaró un estudio preliminar sobre muestras de sangre de 8 voluntarios sanos y 9 pacientes enucleados con RB. Las muestras de voluntarios resultaron negativas para GD2 sintasa, mientras que la detección fue positiva en muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo de pacientes con RB de alto riesgo (estadio 2 y 4a, respectivamente). Los Resultados sugieren la utilidad de la detección molecular de GD2 sintasa en RB y dan sostén a la conducción de estudios prospectivos, como el actualmente en curso, para investigar su valor como marcador de EMD.

- 131 (163) BLOQUEO DE LA PROLIFERACIÓN INDUCIDA POR EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF) A TRAVÉS DE INHIBIDORES TERAPÉUTICOS CONTRA ERBB-2 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO.** Rivas M.1; Tkach M.2; Beguelin W.3; Proietti C.4; Díaz Flaqué M.5; Charreau E.6; Elizalde P.7; Schillaci R.8

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET¹ 2 3 4 5 6 7 8 <rivas@dna.uba.ar>

Considerando que la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa ErbB-2 está asociada con alta agresividad de carcinomas mamarios, se han diseñado terapias dirigidas al ErbB-2 como el inhibidor de bajo peso molecular Lapatinib y el anticuerpo monoclonal Herceptin. Previamente demostramos que el TNF induce la proliferación de células de las líneas celulares de cáncer de mama humano que sobreexpresan ErbB-2, BT474 y SKBR3 mediante la transactivación de ErbB-2 y la subsiguiente activación de NF-κB. En el presente trabajo evaluamos la efectividad de drogas de uso clínico que bloquean a ErbB-2 para inhibir la activación de NF-κB y la proliferación inducida por TNF. Mediante ensayos de gen reportero observamos que los inhibidores farmacológicos del ErbB-2, AG825 y el análogo al Lapatinib, GW2974, inhibieron el aumento de la actividad transcripcional de NF-κB inducida por TNF en células BT474 y SKBR3. Sin embargo, cuando utilizamos Herceptin, no se modificó la capacidad del TNF de activar al NF-κB. Al explorar la activación del promotor de Ciclina D1, gen blanco de NF-κB, por ensayos de gen reportero y su expresión proteica, por western blot a las 24 y 48 h, observamos similares Resultados a los obtenidos en la activación transcripcional de NF-κB. La proliferación de las células BT474 en presencia de TNF se incrementó un 75 ± 12% vs células controles, determinada por incorporación de timidina tritiada y corroborada por recuento celular y por estudio de ciclo celular a través de citometría de flujo. La presencia de AG825 o GW2974 bloqueó por completo la proliferación inducida por TNF, mientras que Herceptin no afectó la actividad mitogénica del TNF que fue

de 70 ± 10% vs células tratadas con Herceptin. Teniendo en cuenta que se ha demostrado la presencia de TNF en tumores de mama invasivos, estos Resultados sugieren que el TNF podría ser una de las moléculas responsables de la resistencia a Herceptina observada en la clínica.

REPRODUCCION 2

- 132 (216) SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS GERMINALES EN EL TESTÍCULO HUMANO PREPUBER: PATRONES DE EXPRESIÓN DEL SISTEMA IGFs/INSULINA Y AROMATASA/RECEPTOR DE ESTRÓGENO BETA.** Berensztein E.1; Saraco N.2; Rivarola M.3; Belgorosky A.4

Hospital de Pediatría Garrahan: IDIR Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Hospital de Pediatría Garrahan^{2 3 4} <esperanzabb²⁰⁰⁴@yahoo.com.ar>

Se desconocen cuales serian los mecanismos que participan en la regulación del pool de células germinales (CG) antes de la pubertad en testículo humano (TH). Hemos demostrado expresión de aromatasa (ARO) y receptor de estrógeno beta (ERβ) en CG del TH prepuber (Berensztein, Ped Res 2006). El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión del sistema estrógenos y del sistema IGFs/insulina e identificar subpoblaciones dentro de CG. Los TH (n=36) se dividieron en tres grupos (Gr): Gr1 neonatal (NEO)(<1mes), Gr2 activación postnatal(1-7meses) y Gr3 prepuberAd temprana y tardía. Los gonocitos y las espermatogonias se identificaron histológicamente según lo descrito previamente (Berensztein, 2006). Se estudió la inmunoexpresión de OCT3/4 (marcador de CG fetal), c-kit (CG inmadura), MAGEA4 (espermatogonia), ERα, ERβ, ARO, IGF1, IGF2, receptor tipo 1 de IGF(IGFR1) y receptor de insulina (IR). Los datos se expresaron como porcentaje de CG positivas (+) (media±DS). El número de gonocitos disminuyó significativamente después del NEO (20.9±3.8) vs. Gr3 (3.5±2.3%) p<0.001. No se detectó OCT3/4 en ningún Gr. C-kit fue mayor en Gr1 (41.7±14.3) que en Gr2 y Gr3 (24.4±17.3 y 14.5±13.2; p<0.05). MAGEA4 fue mayor en Gr1 (65.9±18) que en Gr2 y Gr3 (27.2±18.4 y 31.7±8.5; p<0.05). En todos los Gr se observó ERβ (47.8±21.9; 44.4±21.8 y 47.2±20.9) pero no ERα. ARO fue mayor en Gr1 y Gr2 (45.2±25.5; 45.4±22.3) que en Gr3 (9.6±14.9; p<0.05). No hubo variación en la expresión del sistema IGFs. Los gonocitos fueron negativos (-) para MAGEA4, ERβ e IR aunque una subpoblación fue (+) para ARO y c-kit. Las espermatogonias fueron (+) para MAGEA4, ERβ e IR y una subpoblación (+) para ARO y c-kit. Estos datos sugieren que un diferente patrón de expresión caracteriza gonocitos y espermatogonias, dentro de las cuales se identifica una subpoblación blanco para estrógenos. Se propone que el sistema IGFs y la insulina tendrían un papel en el mantenimiento del pool de espermatogonias en testículo prepuber.

- 133 (218) SOX9 Y SF1 MEDIAN LA TRANS-ACTIVACIÓN DEL GEN DE LA HORMONA ANTI-MÜLLERIANA (AMH) EN RESPUESTA AL AMP CÍCLICO EN LA CÉLULA DE SERTOLI PREPUBERAL.** Lasala C.1; Schteingart H.2; Arouche N.3; Bedecarrás P.4; Di Clemente N.5; Rey R.6

Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez^{1 2}; Endocrinologie et Génétique de la Reproduction et du Développement, INSERM U.782, Clamart, Francia³; Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez⁴; Endocrinologie et Génétique de la Reproduction et du Développement, INSERM U.782, Clamart, Francia⁵; Centro de Investigaciones Endocrinológicas, Hospital de Niños R. Gutiérrez; Dept. Histología, Biología Celular, Embriología y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁶ <rodolfoey@cedie.org.ar>

La FSH, vía AMPc, aumenta la expresión de la AMH en células de Sertoli prepuberales. El promotor de la AMH no tiene ele-

mentos de respuesta al AMPc (CRE) clásicos; en cambio, presenta sitios para los factores SOX9, SF1, GATA4 y AP1. Como dichos factores son activados por AMPc en otras células, nuestra hipótesis fue que también podrían mediar el aumento de expresión de AMH dependiente de AMPc en células de Sertoli. Se usó una línea de células de Sertoli prepuberales de ratón inmortalizadas (SMAT1) previamente validada. Para realizar ensayos luciferasa, se transfectaron células SMAT1 con una construcción "5'AMH-luc" (Promotor de AMH + luciferasa) normal o con mutaciones en los sitios SOX9, SF1, GATA4 o AP1, y se las cultivó 24 hs con o sin dbAMPc 1 mM. La trans-activación de 5'AMH-luc en respuesta al dbAMPc fue inhibida por las mutaciones de los sitios SOX9 y SF1, pero no por las mutaciones de los sitios GATA4 y AP1. En experimentos de RT-PCR cuantitativa (Real-time), la expresión de SOX9 y SF1 aumentó en respuesta al dbAMPc; dicha respuesta fue bloqueada en presencia del inhibidor de PKA (H89), pero no de los inhibidores de PI3-K (LY294002), p38-K (SB203580) o MAPK (PD98059). En inmunocitoquímica, SOX9 se encontró siempre en el núcleo de las células SMAT1, en tanto que SF1 -de localización citoplásmica y nuclear- se concentró en el núcleo luego del estímulo con dbAMPc. En conclusión, la activación de la PKA por AMPc provoca un aumento de la disponibilidad de SOX9 y SF1 en el núcleo de las células de Sertoli prepuberales como resultado de un aumento de la expresión de ambos y de la translocación nuclear de SF1. La unión de SOX9 y SF1 a sus sitios específicos en el promotor de la AMH es indispensable para el aumento de la actividad de dicho promotor en respuesta a AMPc.

134 (606) ROL DE LA FSH EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE INHIBINA B EN DISTINTOS MOMENTOS DE LA MADURACIÓN DE LA CÉLULA DE SERTOLI. Andreone L.¹; Ambao V.²; Pellizzari E.³; Cigorruga S.⁴; Campo S.⁵

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)^{1 2 3 4 5} <landreone@cedie.org.ar>

La producción de inhibinas testiculares está regulada por FSH y por factores gonadales; los mecanismos involucrados no han sido aclarados aún. La proporción relativa de diferentes variantes de glicosilación (VG) de FSH varía durante el desarrollo sexual. El objetivo del trabajo fue evaluar el rol de FSH y de sus VG en la producción de inhibina B (InhB) en células de Sertoli (CS) en diferentes momentos de su maduración. Se utilizaron cultivos de CS provenientes de ratas de 8 (CS8) y 20 (CS20) días de edad. Se aislaron VG de FSHr con diferente grado de complejidad en sus oligosacáridos (complejos: NR y de tipo híbrido: FR) mediante cromatografía en ConA y con diferente grado de sialización (ácidas: AC, pH 3-4 y básicas: BA, pH 5-7) por isoelectroforesis preparativo. La InhB, subunidad alfa de inhibinas (Pro- α C) y activina A (ActA) se determinaron por ELISAs específicos. La expresión de las subunidades de inhibina/activina (inha, inhbb e inhba) se analizó por RT-PCR. Los Resultados se expresan como media \pm EEM. La producción de InhB y ActA fue mayor en CS8 que en CS20 (InhB: 60.7 \pm 3.5 vs 9.2 \pm 0.6; ActA: 21.3 \pm 0.7 vs 4.4 \pm 0.5 pg/ μ gADN/24hs, p<0.01). En CS8, FSH sólo estimuló la producción de Pro- α C (p<0.05). Folistatina inhibió la producción de InhB y la expresión de inhbb e inha, (p<0.05), sugiriendo un papel de ActA en la regulación de InhB a esta edad. En CS20, el estímulo de FSH sobre InhB y Pro- α C fue dosis dependiente. FSH aumentó la expresión de inha, p<0.05. Por otro lado, se observó que las VG BA y las FR fueron los estímulos más potentes para la producción de InhB y Pro- α C (BA vs AC; FR vs NR, p<0.05). ActA no modificó estos efectos. Los Resultados sugieren que la producción de inhB en la CS8 es modulada por ActA testicular. En CS20, el grado de sialización y complejidad de los oligosacáridos de FSH estaría involucrado en mantener una adecuada producción de subunidad alfa de inhibina, condicionando en forma indirecta, la producción de inhibina B.

135 (423) POSIBLE ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL SÍNDROME DE HIPERESTIMULACIÓN OVÁRICA (OHSS). Scotti L.¹; Irusta G.²; Abramovich D.³; Hernández F.⁴; Tesone M.⁵; Parborell F.⁶

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3 4}; Instituto de Biología y Medicina Experimental; Facultad de Cs. Exactas y Naturales, UBA⁵; Instituto de Biología y Medicina Experimental⁶ <leopoldinascotti@yahoo.com.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 proliferación celular, la expresión de factores angiogénicos (VEGF y ANGPT1) y sus receptores (Flk-1 y Tie-2), y la estabilidad vascular en los cuerpos lúteos. 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) durante 4 días y luego de 24 hs se le inyectó hCG (25 UI). El grupo OHSS+LA recibió además LA (100 μ g/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. Los ovarios se extrajeron para IHQ (PCNA y pericitos) y para western (VEGF, angiopoietina-1, Flk-1 y Tie-2). Se observó una disminución de la proliferación celular en los cuerpos lúteos en el grupo OHSS tratado con el agonista respecto al grupo OHSS solo (p<0,001). También, se observó que el LA disminuía los niveles proteicos de VEGF y ANGPT-1, y de sus receptores Flk-1 y Tie-2, en el grupo OHSS comparado al grupo sin tratar (p<0,05). Mediante IHQ, se observó una disminución en el área de pericitos en el grupo OHSS+LA comparado al grupo OHSS solo (p<0,01). Conclusión: El LA disminuye la proliferación celular, afecta los niveles de los principales factores angiogénicos y sus receptores, y por consiguiente, altera la estabilidad vascular de los cuerpos lúteos en un modelo de OHSS desarrollado en roedor.

136 (624) DESARROLLO FOLICULAR ALTERADO COMO CONSECUENCIA DEL ESTADO HIPERANDROGENICO. Belgorosky D.¹; Sander V.²; Di Yorio M.³; Faletti A.⁴; Motta A.⁵

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Universidad de Buenos Aires (UBA)-CONICET^{1 2 3 4 5} <d_belgo@hotmail.com>

Las mujeres con síndrome del ovario poliquístico (SOP) poseen un deficiente desarrollo folicular. La leptina (Lp) interviene en la maduración y atresia folicular. Previamente en un modelo de SOP-murino por hiperandrogenización (HA) de ratones prepúberes BALB/c con dehidroepiandrosterona (60 mg/kg peso, sc) durante 10 días vimos que el HA inducía un estado pro-inflamatorio y pro-apoptótico respecto de controles (C). El objetivo fue evaluar si el HA altera las defensas antioxidantes y la expresión proteica de los receptores de Lp (Ob-R) en el ovario prepupal. Utilizando el modelo SOP-murino vimos que el HA no modifica al antioxidante glutatión (determinado por reacción de óxido-reducción y espectrofotometría), pero disminuye la actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (neutraliza el radical superóxido), HA=5,5+2,2 vs C=33,9+4,1 unidades arbitrarias (por desaparición del sustrato epinefrina y espectrofotometría; n=5/grupo). Por Western Blotting demostramos que el ovario prepupal presenta expresión de Ob-R, isoforma larga de 150 kDa (Ob-Rb). Asimismo, la expresión de la misma disminuyó en HA respecto de C (0,93+0,25 vs 1,80+0,25 unidades arbitrarias (n=5/grupo), respectivamente). Concluimos que el deficiente desarrollo folicular en condiciones de HA involucra acumulación de especies oxidantes altamente agresivas. El ovario prepupal expresa la isoforma larga Ob-Rb tal como se describió en el ovario adulto. El HA disminuye la expresión de Ob-Rb. Sugerimos que mediante la regulación de la expresión de Ob-R se estaría modulando la maduración y atresia folicular en ovario prepupal.

137 (818) PRINCIPALES CAMINOS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADOS POR LEPTINA EN OVARIO DE RATA DURANTE EL PROCESO OVULATORIO. Di Yorio M.¹; Bilbao M.²; Barreiro K.³; Faletti A.⁴

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET^{1 2 3 4} <paula_diyorio@yahoo.com.ar>

La leptina, proteína codificada por el gen de la obesidad, es capaz de modular la función reproductiva. En trabajos previos demostramos que el tratamiento agudo con esta hormona inhibe el proceso ovulatorio y que la leptina es capaz de regular sus propios receptores en forma tejido y dosis dependiente. Por lo tanto, nuestro objetivo fue estudiar los principales caminos de señalización activados por leptina durante este tratamiento. Para ello, utilizamos ratas inmaduras estimuladas con gonadotrofinas (eCG/hCG) y tratadas con vehículo o 5 dosis de leptina (5 µg c/u) durante el proceso ovulatorio. Se determinaron los niveles ováricos de expresión proteica del traductor de señales y activador del camino de transcripción tipo 3 (STAT3) y la proteína quinasa de activación mitogénica (MAPK), particularmente ERK 1/2, ambos por Western blot análisis. Encontramos que el tratamiento agudo con leptina aumentó 70% (p<0.05) la expresión de STAT-3 y disminuyó los niveles proteicos de la formas fosforiladas de ERK 1/2 (20%, p<0.05), ambos en relación a los controles. Para estudiar si estos Resultados se debían a una acción directa de la leptina a nivel gonadal, realizamos cultivos de explantes de ovario de ratas tratadas con eCG/hCG en ausencia y presencia de leptina (0.3-500 ng/ml). Observamos que la expresión proteica de ERK 1/2 disminuye significativamente en presencia de distintos niveles de leptina (30 ng/ml: 37%; 300 ng/ml: 42%; p<0.05) con respecto al control. Estos Resultados nos indican que el efecto inhibitorio de la leptina sobre el proceso ovulatorio puede estar mediado por una regulación diferencial de los distintos caminos de señalización en forma dosis dependiente.

138 (458) EXPOSICIÓN AL ESTRÉS PRE Y POST NATAL. ¿EXISTE EFECTO ADITIVO? Scacchi Bernasconi P.¹; Vignolo M.²; Gobetto M.³; Ramos Lobo A.⁴; Cutrera R.⁵

Lab. Neurobiología y Ritmos. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5} <scacchiba@yahoo.com.ar>

Estudios previos muestran que la exposición a diversos estresores durante el desarrollo gestacional induce daños persistentes sobre parámetros fisiológicos y comportamentales. Sin embargo, se desconoce como estos cambios pueden influir postnatalmente en la respuesta adaptativa al estrés. El objetivo fue estudiar los efectos del estrés crónico variable (ECV) en animales estresados prenatalmente (EP). Ratonas Swiss hembras preñadas con 14 días de gestación fueron sometidas a estrés por restricción durante 5 días, 2 veces por día. Sus crías hembras, ya adultas, recibieron estrés crónico variable (ECV) durante 7 días, que incluyeron restricción, restricción+frío, shaker, nado a 31° y 18°, aislamiento social y hacinamiento. Antes (antes-ECV) y después (desp-ECV) del ECV, se extrajo sangre de la cola del ratón para medición de glucemia y se realizaron la prueba de la cuerda tirante y el laberinto elevado en cruz. Antes del ECV, los animales sin-EP tuvieron una glucemia (53.3±1.3) menor que los con-EP (61.09±2.9). Esta diferencia, si bien la glucemia aumento desp-ECV (108.22±3.9; 100.5±5.25), no hubo diferencia producidas por el EP. Los animales EP tuvieron un mejor desempeño en la cuerda tirante (11.6±1.8 vs. 6.82±2; p=0.027). El ECV agregado tendió a los niveles del grupo control (9.1±1.2; p=0.315). En el comportamiento simil-ansiedad, los EP pasaron más tiempo en los brazos abiertos (2.1±1.7 vs 12±3.5; p=0.029). El ECV aumentó la permanencia en los brazos abiertos de todos los grupos (sin-EP: 14.1±5.2; con-EP: 21±4; p=0.012). Estos Resultados indican que el estrés prenatal tiene consecuencias diferentes cuando es agregado al estrés crónico variable y, además, el estrés prenatal posee un efecto beneficioso en la coordinación neuromuscular y aditivo al estrés crónico variable en el comportamiento simil-ansiedad. Sugiriendo que el ECV actúa de manera diferencial dependiendo que sea administrado en animales estresados prenatalmente o no.

TRANSDUCCION DE SENALES 2

139 (429) IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS REGULADORES DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF) DE DROSOPHILA A PARTIR DE UN SCREEN GENÓMICO POR RNA DE INTERFERENCIA. Pérez Perri J.¹; Dekanty A.²; Romero N.³; Bertolin A.⁴; Wappner P.⁵

Fundación Instituto Leloir^{1 2 3 4 5} <jpperri@leloir.org.ar>

En todos los animales, desde el gusano *C. elegans* hasta los humanos, los bajos niveles de oxígeno (hipoxia) actúan como una señal que desencadena numerosas respuestas adaptativas a nivel sistémico, celular y tisular, mediadas principalmente por el factor inducible por hipoxia (HIF), un factor de transcripción heterodimérico alfa/beta. Con el fin de identificar nuevos reguladores de la vía de respuesta a hipoxia hemos llevado a cabo un screen genómico por RNAi en células de *Drosophila* S2 transfectadas establemente con un reportero transcripcional inducible por HIF. Luego de tres rondas de selección identificamos 35 genes cuyo silenciamiento disminuye significativamente la inducción del reportero en hipoxia. De entre estos genes seleccionamos 6, pertenecientes a 3 grupos funcionales, para validar su requerimiento in vivo para la respuesta a hipoxia y en la inducción de genes endógenos. Los 6 genes seleccionados fueron: *reptin*, *pontin*, *spt5*, *spt6*, *brahma* y *moira*. Para la validación in vivo de los Resultados del screen obtenidos en células S2, generamos diferentes líneas transgénicas de moscas que portan un reportero inducible por hipoxia y un alelo mutante de cada uno de los 6 genes seleccionados. Embriones mutantes para 4 de estos genes analizados hasta el momento mostraron fuertes reducciones en la activación del reportero en hipoxia en relación con embriones salvajes control. Por otro lado, hemos validado in vivo el requerimiento de los 6 genes seleccionados para la activación de genes endógenos inducibles por hipoxia. Para ello, medimos por PCR en tiempo real la inducción en hipoxia de los genes *ldh*, *thor*, *CG7224* y *RpL29*, este último utilizado como gen normalizador. Los embriones mutantes para los genes testeados hasta el momento mostraron una marcada reducción en la inducción de los genes endógenos analizados.

140 (494) PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRASCIPCIÓN AP-1 EN EL CRECIMIENTO DEL CÁNCER DE MAMA, INDUCIDO POR PROGESTÁGENOS. Díaz Flaqué M.¹; Beguelin W.²; Rosemblit C.³; Proietti C.⁴; Rivas M.⁵; Tkach M.⁶; Charreau E.⁷; Schillaci R.⁸; Elizalde P.⁹

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3 4 5 6 7 8 9} <diazflaque@dna.uba.ar>

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA), es capaz de inducir la expresión y activación del factor de transcripción AP-1. Consistente con otros trabajos, mostramos que el MPA induce la expresión de ciclina D1, un gen clave en la regulación del ciclo celular que carece de elementos respondedores a progesterona en su promotor, estimulando el reclutamiento de las proteínas que componen al AP-1 (c-jun y c-fos) y el receptor de progesterona en el sitio de unión a AP-1 presente en el promotor de ciclina D1 en células de cáncer de mama. En base a estos Resultados, proponemos al AP-1 como blanco molecular para inhibir la proliferación de células de cáncer de mama. Células C4HD, provenientes de un tumor mamario murino, y células humanas T47D transfectadas con una construcción del promotor de *cicD1*-luciferasa y tratadas con MPA mostraron un aumento de la actividad transcripcional de *cicD1* y éste fue prevenido por la cotransfección con los vectores de expresión de las formas dominantes negativas (DN) de las proteínas c-jun y c-fos. En el presente trabajo encontramos que en las células transfectadas con los DN, el MPA no induce la expresión de ciclina D1. Evaluamos también la proliferación de las células de cáncer de mama, y encontramos que la expresión de los DN inhiben significativamente la proliferación de las células C4HD y T47D inducida por MPA (p<0,001). En base a estos Resultados, realizamos ensayos in

vivo, donde células C4HD transfectadas con los DN, fueron inyectadas en ratones singénicos en presencia de MPA y se midió el volumen tumoral. En ambos grupos el crecimiento de los tumores fue significativamente menor respecto al grupo control (48% el DN de c-jun y 43% el DN de c-fos). Estos Resultados demuestran la participación del AP-1 en la proliferación celular y crecimiento de carcinomas mamarios inducido por progestágenos.

141 (501) ANÁLISIS DEL MECANISMO DE INDUCCIÓN DE HO-1 POR ACTH EN CÉLULAS ADRENALES. Astort F.¹; Mercau M.²; Martínez Calejman C.³; Repetto E.⁴; Pecci A.⁵; Cymeryng C.⁶

Laboratorio de Endocrinología Molecular (LEM), Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA, CEFYBO/CONICET^{1 2 3 4}; Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires-IFIBYNE-CONICET⁵; Laboratorio de Endocrinología Molecular (LEM), Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA, CEFYBO/CONICET⁶ <f_astort_lem@hotmail.com>

Si bien el ACTH es el principal estímulo esteroideogénico de la zona fasciculata adrenal, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado la participación de la actividad hemo oxigenasa-1 (HO-1) en la modulación de sus efectos a nivel adrenal y su inducción por el estímulo hormonal. El objetivo de este trabajo fue analizar el mecanismo molecular de inducción de HO-1 por ACTH en una línea celular derivada de corteza adrenal murina (Y1). En una primera serie de experimentos las células fueron transfectadas con los plásmidos p(-4)HO-1, p(-2.5)HO-1, p(-1.2)HO-1 y p(-0.4)HO-1 (fragmentos -4043,+74, -2500,+74, -1200,+74 y -400,+74 del promotor de HO-1 de ratón clonados río arriba del gen de luciferasa en el vector pGL2) y posteriormente tratadas con ACTH (12.5 mU/ml, 24 horas). El tratamiento hormonal produjo un aumento del 50 % en la actividad de todos los plásmidos ensayados (p<0.01) y un incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno (medidas con el reactivo diacetado de fluoersceína p<0.01). La co-incubación con el antioxidante bilirrubina (1 mM) previno la inducción de HO-1 por ACTH. Se evaluó la participación de NFκB en este mecanismo, utilizando el vector reportero Kb/LUC sin encontrarse diferencias luego del tratamiento con ACTH. La inducción de HO-1 por ACTH no fue modificada por la presencia de un inhibidor de NADPH oxidasa mientras que todos los inhibidores de MAPKs utilizados (p38, JNK y ERK1/2) la bloquearon parcialmente. En las células Y1, ACTH activaría factores de transcripción que se unen a sitios del promotor de HO-1 ubicados en una región acotada entre -400 y +74. El mecanismo utilizado podría involucrar factores de transcripción activables por AMPc, por estrés oxidativo y por MAPKs (como CREB o AP-1 por ej.) con sitios de unión ubicados en la región del promotor indicada. Los Resultados presentados permiten descartar la participación de la vía de NFκB y la actividad de NADPH oxidasa en el mecanismo descripto.

142 (532) CISD1, UNA PROTEÍNA NUCLEAR DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL, MODULA LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL. Taminelli G.¹; Valdivieso A.²; Pagano E.³; Santa Coloma T.⁴

PIB-UCA-CONICET^{1 2 3 4} <gtaminelli@gmail.com>

CISD1 (CDGSH iron sulfur domain-1) es el primer miembro de una nueva familia de proteínas denominada CDGSH. En nuestro laboratorio fue identificada y clonada mediante "differential display", debido a que su expresión depende del canal de cloruro CFTR (Taminelli y col, BBRC 2008, 365:856). Simultáneamente, otros investigadores la identificaron por comportarse como ligando de pioglitazona en mitocondrias (Willey y col. PNAS 104: 5318, 2007). Mediante microscopía confocal y utilizando la expresión de la proteína de fusión CISD1:EGFP, CISD1 fue localizada en mitocondrias. Las células que expresan la quimera presentan importantes alteraciones en la estructura de las mitocondrias y sobreviven unos pocos días en cultivo. Si bien la función precisa de

CISD1 aún es desconocida, Willey ha demostrado que en mitocondrias aisladas de células cardíacas de ratones knock-out de CISD1 se observa una falla en la capacidad máxima para llevar a cabo el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa y que CISD1 posee un dominio con 3 Cys y 1 His que unen un cluster 2Fe-2S. Con el fin de estudiar la posible función de CISD1, hemos medido la actividad del Complejo I mitocondrial en mitocondrias aisladas de células CFDE, provenientes de un paciente con fibrosis quística y transfectadas con un plásmido de expresión de CISD1 (pcCISD1). Paralelamente hemos diseñado una mutante de CISD1 en la cual las cisteínas 72 y 74, que intervienen en la unión al cluster 2Fe-2S, han sido reemplazadas por serinas. Esta construcción fue recientemente transfectada en células CaCo2 con el fin de estudiar, mediante citometría de flujo, los posibles efectos sobre diversas funciones mitocondriales. Resultados preliminares sugieren que CISD1 podría modular la actividad del Complejo I. Agradecimientos: subsidios ANPCyT (PICT 2007-00628), CONICET (PIP 11220080102551) y beca de la UCA (GLT).

143 (691) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL DE CL-, CFTR, POR ALTAS DOSIS DE IL-1BETA, EN CÉLULAS CACO2. Pagano E.¹; Valdivieso á.²; Taminelli G.³; Santa Coloma T.⁴

Laboratorio de Biología Celular y Molecular-Programa de Investigaciones Biomédicas-Universidad Católica Argentina (LBCM-PIB-UCA-CONICET)^{1 2 3 4} <eleonora_pagano@yahoo.com.ar>

La fibrosis quística (FQ) es producida por mutaciones en el gen que codifica el canal de cloruro CFTR. El efecto de las citoquinas sobre la regulación de la expresión del CFTR es un tema de interés en nuestro laboratorio por su rol en los procesos inflamatorios e inmunológicos, alterados en FQ. La interleuquina-1 beta (IL-1β) resulta elevada en el esputo de pacientes FQ. Las células de carcinoma de colon humano constituyen un buen modelo para el estudio de la regulación del CFTR por IL-1β debido a que expresan tanto CFTR como receptores para IL-1β. En un trabajo previo, demostramos que el tratamiento de las células T84 con IL-1β (0.25-0.50 ng/ml) resultó en un incremento en la expresión del CFTR mientras que dosis más altas (=2.5 ng/ml) la inhibieron. El aumento de CFTR por IL-1β está mediado por la activación del factor de transcripción NF-κB. El objetivo de este trabajo es estudiar el mecanismo en la fase inhibitoria. Resultados preliminares sugieren una correlación entre la expresión del CFTR y la de Fos/Jun en respuesta a altas dosis de IL-1β. En este trabajo, se estimularon células CaCo2 con distintas concentraciones de IL-1β (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2.5 y 5 ng/ml) por 4 hs y luego se determinó la expresión relativa del mRNA de CFTR. La misma se incrementó en respuesta a 0,75 ng/ml de IL-1β (1,7 ±0,38 veces con respecto al control, p<0,5) y disminuyó a niveles similares al control con 1 y 2,5 ng/ml de IL-1β. La expresión a nivel de proteína, determinada por WB utilizando un anticuerpo monoclonal específico, sigue el mismo patrón que el mRNA. Para determinar si esta fase de la curva es vía JUN, se trató las células por 1 hora con el inhibidor específico (SP600125) a distintas concentraciones (0, 5, 10 y 20 μM) y, luego de estimular con IL-1β, a baja y alta dosis, se determinó la expresión de CFTR por PCR. Los Resultados obtenidos apoyan la participación de la vía de JNK en la fase inhibitoria de la acción de IL-1β sobre la expresión del CFTR

144 (734) MAP QUINASA FOSFATASA-1 (MKP-1): FOSFORILACIÓN Y ESTABILIZACIÓN POR ACCIÓN DE HCG Y SU PAPEL EN LA INDUCCIÓN MEDIADA POR HCG/ERKS DE NUR⁷⁷, UN FACTOR NECESARIO PARA LA TRANSCRIPCIÓN DE STAR. Brion L.¹; Gómez N.²; Duarte A.³; Poderoso C.⁴; Gorostizaga A.⁵; Podestá E.⁶; Paz C.⁷

Departamento de Bioquímica, IIMHNO, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5 6 7} <laurbrion@hotmail.com>

En células de Leydig MA-10 el AMPc incrementa los niveles del ARNm de MKP-1 e induce modificaciones post-traduccionales

que estabilizan la proteína. Además, en estas células MKP-1 impide la inducción de StAR por AMPc. Teniendo en cuenta que en células de Leydig LH/hCG promueven la activación de ERK1/2 vía PKA, nos propusimos determinar si la estabilización de MKP-1 por hCG involucra la fosforilación de esta fosfatasa por PKA/ERKs y si la inducción de MKP-1 regula la expresión de NUR77, factor de transcripción que interviene en la inducción de StAR y otros genes relacionados con la esteroidogénesis. Células MA-10 que sobre-expresan transitoriamente la proteína recombinante Flag-MKP-1 fueron incubadas con 32Pi y luego estimuladas con hCG o AMPc. Demostramos que hCG/AMPc promueven la fosforilación de MKP-1, analizada por inmunoprecipitación, SDS-PAGE y autorradiografía. PD98059 (inhibidor de MEK1/2) inhibe totalmente este efecto pero sólo reduce parcialmente la acumulación de la proteína mediada por AMPc, como se determina por Western blot. Esto sugiere que la estabilización de la proteína depende, al menos en parte, de su fosforilación. Con el fin de conocer el mecanismo por el cual MKP-1 reduce la expresión de StAR, analizamos si esta fosfatasa afecta la expresión del factor inducible por hCG/AMPc, NUR77. Mediante experimentos de co-transfección, analizamos el efecto de la sobre-expresión transitoria de MKP-1 sobre la actividad del promotor de NUR77, determinada evaluando la actividad de un gen reportero (luciferasa). Comprobamos que el AMPc incrementa la actividad del promotor (expresada en unidades relativas de luciferasa) y que MKP-1 inhibe este efecto (AMPc=2,12±0,26 vs. AMPc+MKP-1=0,85±0,08; P<0,001), al igual que PD. Se concluye que la estabilización de MKP-1 por hCG/AMPc es parcialmente dependiente de la fosforilación por ERK1/2 y que MKP-1 inhibe la inducción de NUR77 por AMPc, efecto que estaría involucrado en la inhibición de la expresión de StAR por MKP-1.

ENDOCRINOLOGIA 2

- 145 (20) CARACTERIZACIÓN DE CANALES DE POTASIO EN EL TESTÍCULO: SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA.** Matzkin M.¹; Mayerhofer A.²; Kunz L.³; Calandra R.⁴; Frungieri M.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET); Facultad de Medicina, UBA¹; Institute of Cell Biology, Ludwig Maximilians University, Munich, Alemania²
³; *Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)⁴; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET); Facultad de Medicina, UBA⁵*
 <maeugmatzkin@hotmail.com>

Los canales iónicos ligando- y voltaje-dependientes son conocidos por sus acciones en células excitables tales como células nerviosas y musculares. No obstante, se expresan también en células no-excitables donde participarían en la regulación de la proliferación, diferenciación y muerte celular. Recientemente se describió la presencia de canales iónicos en células de la granulosa del ovario involucrados en la modulación de la esteroidogénesis. En base a estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar la presencia de canales de potasio voltaje dependientes (KV4.2) y calcio dependientes (BKCa) en el testículo. Se utilizaron testículos enteros y células de Leydig purificadas en un gradiente discontinuo de Percoll, obtenidos a partir de hámsteres Dorados (*Mesocricetus auratus*) machos de 10, 18, 36, 46, 60 y 90 días de edad. La expresión de los canales se evaluó por inmunohistoquímica y RT-PCR. Los canales KV4.2 fueron localizados en el compartimento tubular a lo largo del desarrollo puberal, aunque se hallan ausentes en células de Leydig. Por lo contrario, los canales BKCa se expresan en células de Leydig a todas las edades estudiadas, pero no son detectados en células de la línea germinal. La incubación in vitro de células de Leydig en presencia de un bloqueante de canales KV4.2 (frixotoxina, 50 nM) no alteró la producción de testosterona. Iberiotoxina (I, 50nM), bloqueante de canales BKCa, no afectó la síntesis de testosterona (pmol/millón de células de Leydig) en condiciones basales, (control: 16.03 + 0.86, I: 15.78 + 0.65), pero

la estimuló significativamente en presencia de 100 uM/ml de hCG (hCG: 95.53 + 8.50, hCG + I: 118.62 + 6.12, P < 0.05). En conclusión, este trabajo describe la existencia de canales de potasio en el testículo, que podrían intervenir en la modulación de la función testicular. Al respecto, se han localizado canales BKCa en células de Leydig del hámster que participan en la regulación de la producción de andrógenos.

- 146 (159) MECANISMOS DE ACCIÓN INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS INDUCIDA POR ESTRÓGENOS.** Zárate S.¹; Jaita G.²; Eijo G.³; Ferraris J.⁴; Radl D.⁵; Zaldivar V.⁶; Pisera D.⁷; Seilicovich A.⁸

Instituto de Investigaciones en Reproducción, UBA^{1 2 3 4 5 6}
^{7 8} <szarate@fmed.uba.ar>

Las acciones rápidas de los estrógenos son mediadas por la activación de receptores de estrógenos (ERs) asociados a la membrana plasmática, gatillando diferentes vías de transducción de señales involucradas en la regulación de diferentes funciones celulares. Previamente hemos demostrado que tanto el estradiol (E2) como el E2-BSA inducen una rápida respuesta apoptótica en células adenohipofisarias (CA), lactotrofos y somatotrofos. El antagonista de ERs clásicos, ICI 162,780, revierte completamente este efecto, indicando que la activación de estos receptores asociados a la membrana plasmática estaría involucrada en el efecto proapoptótico del E2. En el presente trabajo evaluamos la acción de un conjugado entre E2 y polímeros inertes, los poli(amido)-poliamino dendrímeros (EDC), cuyo tamaño y carga restringe la acción estrogénica a sitios cercanos a la membrana plasmática. El EDC (concentración efectiva de E2 10-9M, 120 min) indujo apoptosis de CA provenientes de ratas ovariectomizadas (Anexina-V FITC/IP y citometría de flujo) (VEH: 15.7±0.3%, dendrímero vacío, DC: 17.7±1.4%, E2: 21.0±1.0%, EDC: 23.3±1.4%; p<0.05, ANOVA). También evaluamos la participación de la MAP Kinasa p38 en la apoptosis de CA inducida por EDC mediante el uso de un inhibidor de dicha kinasa, el SB203580 (SB, 10µM). Determinamos la acción del EDC sobre la apoptosis de CA en presencia SB (Anexina-V FITC/IP y citometría de flujo). Luego de 120 min de incubación el SB bloqueó la apoptosis inducida por el EDC sobre dichas células (C: 8.5±0.2%, EDC: 16.2±1.1%, SB: 12.9±1.9%, EDC+SB: 9.8±0.5%; p<0.01 vs respectivo control sin EDC, p<0.01 vs respectivo control sin SB, ANOVA). Estos Resultados indican que el EDC en tiempos cortos de incubación induce apoptosis de CA y sugieren que el efecto proapoptótico del E2 en dichas células podría deberse, al menos en parte, a la activación de receptores asociados a membrana plasmática por un mecanismo dependiente de la activación de p38.

- 147 (196) SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN DOS MODELOS TRANSGÉNICOS DE RATONES DEFICIENTES EN EL RECEPTOR DE DOPAMINA D2.** Rizzo G.¹; Ramirez M.²; Noain D.³; Rubinstein M.⁴; Becú-villalobos D.⁵; García-tornadú I.⁶

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2}; Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular^{3 4}; Instituto de Biología y Medicina Experimental^{5 6}
 <gabriela_rizzo@hotmail.com>

En trabajos previos demostramos que ratones deficientes del receptor dopaminérgico D2 (KO) tienen un menor peso corporal, bajos niveles de GH e IGF-1 séricos e hiperprolactinemia. Demostramos que los animales que carecen del receptor D2 (RD2) únicamente en sistema nervioso central (KOC) presentan un fenotipo con retardo en el crecimiento, GH e IGF-1 disminuidos, sin aumento de los niveles de prolactina. Por otra parte describimos que la ausencia del RD2 en el islote produce un deterioro del mismo, con alteraciones en la secreción de insulina. En contraposición, la ausencia de RD2 central no presentaba este fenotipo alterado. El objetivo del trabajo fue estudiar la sensibilidad periférica a la insulina en estos dos modelos de animales transgénicos. El test de tolerancia a la insulina (ITT) no mostró diferencias entre los animales KO y los salvajes. Para estudiar en mayor profundidad

la sensibilidad en los tejidos blanco (hígado, músculo esquelético y tejido adiposo) estudiamos la cascada de activación de insulina. Los animales fueron anestesiados, administrándose insulina por vena porta-hepática. Se tomaron muestras de tejido a los tiempos 0, 1 y 5 min. Los tejidos se procesaron según protocolos de western blot. Se evaluaron los niveles de pAKT/AKT total y de IRS-1 a los diferentes tiempos. Encontramos un aumento en la fosforilación de AKT en función del tiempo sin diferencias significativas, y niveles semejantes de IRS-1 entre genotipos. Por el contrario, al realizar el ITT en los animales KOc, observamos una mayor sensibilidad a la misma en estos ratones, con niveles de glucosa post insulina inferiores en los KOc, en comparación con los salvajes ($P=0.018$). Postulamos que los bajos niveles de GH de los animales KOc serían los responsables de una mayor sensibilidad a la insulina. Si bien en los KO totales este fenotipo también está presente, la ausencia de RD2 en todo el organismo (páncreas, hipófisis), enmascararía el efecto.

148 (340) TROMBOSPONDINA-1 (TSP1) EN UN MODELO DE PROLACTINOMA: RATONES DEFICIENTES DE RECEPTOR DOPAMINERGICO TIPO 2 (D2DR -/-). Recouvreur M.¹; Guida M.²; Becú-villalobos D.³; Díaz-torga G.⁴

IByME^{1 2 3 4} <recouvreur@dna.uba.ar>

Los ratones hembra D2dr -/-, a pesar de ser hipoestrogénicos, generan espontáneamente prolactinomas por la ausencia de control inhibitorio dopaminérgico sobre el lactotrofo. TGFβ1 ha sido descrito como mediador del efecto de dopamina a través de su receptor D2 en hipófisis. Previamente describimos una marcada disminución de TGFβ1 activo y total en hipófisis de ratones D2dr -/-. Por otro lado, la TSP1, glicoproteína presente en la matriz extracelular (MEC), ha sido descrita como activador de TGFβ1 al liberarlo de su complejo latente menor. TSP1 cumple funciones anti-angiogénicas y antitumorales en diversos tejidos, en parte mediadas por TGFβ1, y en parte por la regulación sobre la actividad de metaloproteasas de matriz (MMPs), como la inhibición de MMP-9. El objetivo del siguiente trabajo es el estudio de TSP1 en el modelo de prolactinomas en ratones D2dr -/-. Por western blot se observó un aumento de TSP1 en hipófisis de hembras D2dr -/- ($p<0.01$). Por IHQ observamos la localización de TSP1 en células endoteliales y no endoteliales, así como también su colocalización con TGFβ1, en hipófisis D2dr -/- y wt. Por otro lado, la actividad de MMP-9 se vió disminuida en hipófisis D2dr -/- tanto en machos como en hembras, medido por zimografía ($p=0.039$). Postulamos que la disminución de TGFβ1 activo en hipófisis de los ratones D2dr -/- no es debida a la falta de su activador TSP1, sino en parte mediada por la ausencia de control dopaminérgico. Por otro lado el aumento de TSP1 (factor antiangiogénico) podría ser el causante de los menores niveles de MMP9 en las hipófisis D2dr -/-. Ambos hallazgos podrían contribuir a la ausencia de malignidad de estos prolactinomas. Con apoyo de CONICET y ANPCyT.

149 (393) LA EXPOSICIÓN AGUDA A ALTAS Y BAJAS DOSIS DE BISFENOL A MODIFICA LA ACTIVIDAD DEL EJE REPRODUCTOR EN RATAS MACHO PREPÚBERES SIN AFECTAR LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN A NIVEL CENTRAL. Cardoso N.¹; Pandolfi M.²; Ponzio O.³; Carbone S.⁴; Gamez J.⁵; Lavalle J.⁶; Scacchi P.⁷; Reynoso R.⁸

Laboratorio de Endocrinología. Dt. Fisiología. Facultad de Medicina.UBA¹; Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental. FCEyN. UBA²; Laboratorio de Endocrinología. Dt. Fisiología. Facultad de Medicina.UBA^{3 4 5 6 7 8} <cnp79@hotmail.com>

En trabajos previos hemos demostrado que la administración crónica de Bisfenol A (BPA), modifica los mecanismos de regulación del eje reproductor a nivel central. En el presente trabajo se estudió el efecto de la administración aguda de altas y bajas dosis de BPA sobre el eje reproductor de ratas macho prepúberes. Se administró a animales macho etanol 0.1%, grupo control y

BPA en agua de bebida, dosis aproximada de exposición (DAE), grupo 1: 2,5 mg/kg/día y grupo 2: DAE:3 µg/kg/día, n=10/grupo, desde el día 21 de vida y hasta los 35 días. Se determinó LH y FSH, (RIA,ng/ml) en suero y liberación de GnRH, (RIA, pg/HMB) y ácido glutámico (GLU), (HPLC: nmol/HMB) en fragmentos de hipotálamo medio basal. Se realizó estudio histológico de cortes de testículo. En ninguno de los dos grupos estudiados se observaron modificaciones de la liberación de GLU y Gn-RH: GLU: (control: 1548 ± 657 vs grupo 1: 1450 ± 77); (control 522 ± 50 vs grupo 2: 504 ± 49). Gn-RH (control: 4.5 ± 0.8 vs grupo 1: 3.4 ± 0.5); (control: 1.0 ± 0.1 vs grupo 2: 1.8 ± 0.3). En los animales tratados con altas dosis los niveles de FSH no sufrieron modificaciones, mientras que en los tratados con bajas dosis los mismos disminuyeron significativamente, (control: 121 ± 12 vs grupo 2: 70 ± 5.0, $p<0.001$). Los niveles de LH no sufrieron cambios en ninguno de los dos grupos. El estudio histológico mostró que la meiosis progresó normalmente tanto en los animales controles como en los tratados. Animales tratados de ambos grupos presentaron aproximadamente un 10% de secciones de túbulos seminíferos conteniendo solamente Células de Sertoli y sin células de la serie espermatogénica. Los animales tratados de los dos grupos presentaron un número mayor de espermatogonias que los controles. Los Resultados obtenidos sugieren que el tratamiento agudo con altas y bajas dosis de BPA modifican la actividad del eje reproductor actuando a nivel hipofisario y gonadal, sin afectar los mecanismos de regulación a nivel central.

150 (428) EFECTO XENOESTROGÉNICO DEL CADMIO SOBRE LAS CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS. Miler E.¹; Quinteros F.²; Cabilla J.³; Ronchetti S.⁴; Nudler S.⁵; Duvilanski B.⁶

IQUIFIB-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA^{1 2 3 4 5 6} <emiler@ffyba.uba.ar>

El cadmio (Cd2+) es uno de los metales de transición más tóxicos que está asociado con la contaminación del aire y del agua, como así también con el humo del cigarrillo. Trabajos recientes han destacado que el Cd2+ es capaz de mimetizar los efectos de los estrógenos en varios tejidos, actuando como un disruptor endocrino. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar el papel del Cd2+ como xenoestrógeno a nivel adenohipofisario. Para ello se estudió el efecto del Cd2+ sobre la proliferación celular mediante inmunocitoquímica (incorporación de BrdU) y la expresión de las ciclinas (cyc) D1 y D3 (PCR semicuantitativa, GAPDH como control interno). Se utilizaron cultivos celulares de adenohipofisis de ratas hembras adultas jóvenes y células GH3 lactosomatropas derivadas de un tumor hipofisario de rata, en medio de cultivo sin rojo fenol y con suero fetal bovino adsorbido. El 17β-estradiol (E2, 1 nM) fue usado como control positivo. El tratamiento con Cd2+ (10 nM, 96 hs.) aumentó la proliferación celular basal (control: 23,8 ± 2,2%; Cd2+: 45,5 ± 2,7%, $p<0,05$). El tratamiento con Cd2+ (72 hs.) aumentó la expresión del RNAm de la cyc D1 (% respecto al control): control: 100,0 ± 1,2; Cd2+: 125,7 ± 4,1, $p<0,01$; cyc D3: control: 100,0 ± 6,1; Cd2+: 146,4 ± 4,9, $p<0,01$. El tratamiento con un antagonista del receptor de E2 (ICI 182,780, 10-7 M) impidió el aumento en la expresión de los mensajeros de las cyc D1 y D3 (cyc D1: control: 1,33 ± 0,07; Cd2+: 1,68 ± 0,05, $p<0,01$ vs. control; Cd2+ + ICI: 1,17 ± 0,03, $p<0,001$ vs. Cd2+; cyc D3: control: 1,21 ± 0,05; Cd2+: 1,86 ± 0,03, $p<0,001$ vs. control; Cd2+ + ICI: 1,30 ± 0,03, $p<0,001$ vs. Cd2+). Resultados similares fueron obtenidos en la línea GH3. Conclusiones: El Cd2+ a bajas concentraciones aumenta la proliferación de las células adenohipofisarias por un mecanismo que involucra los receptores de E2.

151 (463) EFECTO ANSIOGENICO DE LA EXPOSICIÓN POST-NATAL AL DISRUPTOR ENDOCRINO DI-2(ETHYLHEXYL PHTHALATE) EN RATAS MACHO. Gobetto M.¹; Cutrera R.²; Scacchi P.³; Ponzio O.⁴; Reynoso R.⁵; Cardoso N.⁶; Moguilevsky J.⁷; Carbone S.⁸

Laboratorio de Neurobiología y Ritmos, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA.^{1 2}; Laboratorio de Neuroendocrinología. Depto. de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA – CONICET^{3 4 5 6 7 8} <natygobetto@gmail.com>

Di-2(ethyl hexyl phthalate) (DEHP) se utiliza en artículos de PVC blando de uso cotidiano e insumos médicos. La exposición perinatal al DEHP altera el eje reproductor por acción fundamentalmente antiandrogénica. Por otra parte, se sabe que los andrógenos poseen un rol ansiolítico. El objetivo del trabajo fue estudiar el efecto de la exposición postnatal del DEHP sobre el comportamiento símil-ansiedad en ratas macho de 30, 45 y 60 días de edad. Para evaluarlo, se usó el laberinto elevado en cruz (Elevated-plus maze test), midiendo la permanencia del animal en los brazos abiertos (%TSO) y la frecuencia de entrada a los mismos (%FEO). El DEHP se administró en agua de bebida (30mg/kg/día) durante la lactancia hasta el sacrificio. En un segundo experimento dos grupos de 60 días de edad controles (C) y DEHP se inyectaron, 15 días previos a la prueba y cada 72hs, con salina (C+S; DEHP+S) o testosterona (T) 1mg/kg (C+T; DEHP+T). En los mismos se estudió el comportamiento y se determinaron FSH y LH en plasma, por RIA (ng/ml). Se usaron 8-10 machos/grupo. A los 45 y 60 días se obtuvo mayor %TSO en los DEHP respecto a sus controles ($p < 0.05$): a los 45 días: 1.6 ± 0.6 vs 8.2 ± 2.3 ; 60 días: 1.9 ± 0.8 vs 11.8 ± 4.1 . El %FEO disminuyó a los 60 días en los DEHP vs C: 10.01 ± 5.4 vs 36.8 ± 8.4 . La T revirtió el efecto ansiogénico del DEHP sobre el %TSO (DEHP+T: 11.8 ± 2.1 vs DEHP+S: 1.8 ± 0.6) y el %FEO (DEHP+T: 50.3 ± 8.0 vs DEHP+S: 15.0 ± 5.6) llegando a valores similares al control. En animales de 60 días, inyectados con T, se indujo un feed-back negativo sobre LH (C+T: 4.46 ± 0.78 vs C+S: 17.98 ± 6.14 , $p < 0.001$), corroborándose el efecto androgénico. La LH no mostró cambios en el grupo DEHP+S vs C+S. Ninguno de los grupos mostró cambios en FSH. Esto sugiere que el DEHP incrementa el comportamiento símil-ansiedad en machos de 45 y 60 días, posiblemente por su acción antiandrogénica. El efecto de DEHP en machos de 60 días fue antagonizado por testosterona. Se postula un efecto ansiogénico para el DEHP.

- 152 (467) EL OLIGONUCLEÓTIDO IMT504 PROMUEVE LA RECUPERACIÓN DE LA DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA: AUMENTO TEMPRANO EN LA EXPRESIÓN DE NESTINA Y NEUROGENINA 3.** Bianchi M.¹; Hernando-insúa A.²; Chasseing N.³; Zorzopulos J.⁴; Calvo V.⁵; Libertun C.⁶; Montaner A.⁷; Lux-lantos V.⁸

Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET¹; Immunotech S.A., Bs As; Fundación Pablo Cassará, Bs As²; Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET³; Immunotech S.A., Bs As⁴; Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET⁵; Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁶; Immunotech S.A., Bs As; Fundación Pablo Cassará, Bs As⁷; Instituto de Biología y Medicina Experimental - CONICET⁸ <mbianchi@dna.uba.ar>

El oligonucleótido IMT504 (ODN), estimula la expansión de células madres mesenquimales y promueve la reparación tisular en modelos de injuria ósea y de dolor neuropático. Previamente reportamos que en ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ), el tratamiento con ODN mejoró notablemente esta condición, aumentando el número de islotes y células beta. Aquí evaluamos el mecanismo de reparación tisular inducido por el IMT504 en este modelo. Se inyectaron ratas macho Sprague-Dawley de 200 g de peso con STZ (60 mg/kg, ip en buffer citrato) o diluyente, control (C). La glucemia (Gluc) en C es 120 ± 10 mg/dl. Animales con Gluc entre 200-370 mg/dl 3 días post-STZ, considerados diabéticos, recibieron diariamente ODN (40mg/dosis/día, sc: STZ-ODN) o salina (STZ). Luego de una caída en la Gluc de 2 días consecutivos en los STZ-ODN, se sacrificaron ratas de los 3 grupos y se recolectaron los páncreas y sangre troncal. Se midieron las glucemias (glucometer) e insulinemias (RIA). Por inmunohistoquímica se evaluaron marcadores de proliferación celular

(PCNA), de células endoteliales (CD31), de células progenitoras en páncreas (nestina) y de células progenitoras con compromiso a islote (neurogenina 3: Ngn3). El % de islotes PCNA positivos (+) aumentó en STZ-ODN respecto a C y STZ (C: $34 \pm 3\%$, STZ: $41 \pm 6\%$ vs STZ-ODN: $75 \pm 15\%$, $p < 0.05$), siendo el número de núcleos PCNA+/ islote el doble que en C. En STZ-ODN, CD31 aumentó en los islotes y en vasos sanguíneos del parénquima pancreático con respecto a C ($p < 0.01$). El % de páncreas nestina+ fue mayor en STZ-ODN que en STZ (C: 25%, STZ-ODN: 67% vs STZ: 0%, ± 2 : $p < 0.05$). El % de islotes Ngn3+ aumentó en STZ-ODN (STZ-ODN: $30 \pm 11\%$ vs C: 0% y STZ: $5 \pm 2\%$, $p < 0.02$), aumentando 9 veces el número de núcleos+/ islote ($p < 0.02$). La marcada mejoría en la diabetes en STZ-ODN correlaciona con un aumento en páncreas de la proliferación celular, vascularización y la expresión temprana de marcadores de células progenitoras como nestina y Ngn3. (CONICET, UBA, ANCYPT).

- 153 (485) EXPRESIÓN DE AROMATASA (CP⁴⁵⁰AROM) EN PLACENTAS (PL) DE NACIMIENTOS DE NIÑOS VARONES Y MUJERES ADECUADOS PARA LA EDAD GESTACIONAL (AEG) Y PEQUEÑOS PARA LA EDAD GESTACIONAL (PEG).** Sainz R.¹; Saraco N.²; Pepe C.³; Baquedano M.⁴; Gonzalez C.⁵; Iñiguez G.⁶; Rivarola M.⁷; Mericq V.⁸; Belgorosky A.⁹

Endocrinología, Hospital Garrahan, Bs As, Argentina^{1 2 3 4}; Hospital San Borja Arriaran, Santiago, Chile^{5 6}; Endocrinología, Hospital Garrahan, Bs As, Argentina⁷; Hospital San Borja Arriaran, Santiago, Chile⁸; Endocrinología, Hospital Garrahan, Bs As, Argentina⁹ <rominasainz@hotmail.com>

Se ha descrito una regulación géneroespecífica en la expresión del ARNm de cP450arom en tejidos como el sistema nervioso central y preadipocitos humanos, pero no en placenta humana (PI). Se ha propuesto que los estrógenos estarían implicados en la regulación de la homeostasis de la glucosa y en la composición corporal, así como un dimorfismo sexual en la sensibilidad a la insulina. Recientemente se describió que a diferencia de lo observado en recién nacidos (RN) AEG donde existe una diferencia sexual en la composición corporal y el tamaño, esta no se evidencia en PEG. Nuestra hipótesis plantea la expresión género específica del ARNm de cP450arom en la PI durante el desarrollo fetal. Se analizó la expresión de cP450arom en placentas de embarazos saludables a término de RN masculinos (masc) y femeninos (fem) AEG (n=15) y PEG (n=10). La abundancia del ARNm cP450arom fue analizada por RT-PCR en tiempo real y las proteínas por Westernblot. Se evidenció en el grupo AEG una mayor expresión del ARNm de cP450arom en PI de RN masc que en RN fem (media±ES: $12,8 \pm 4,1$ Unidades Arbitrarias (UA), n=9 y $3,4 \pm 1,2$ UA, n=6, respectivamente). Por otra parte, en el grupo PEG no se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm de cP450arom en PI entre RN masc y fem (media±ES: $2,8 \pm 0,5$ UA, n=4 y $1,8 \pm 0,3$ UA, n=6). Las PIs de los PEG muestran una significativa disminución de la expresión de cP450arom (media±ES: $2,2 \pm 0,3$ UA, n=10) comparando con la de los AEG masc (media±ES: $12,8 \pm 4,1$ UA, n=9). Resultados similares fueron observados en la expresión de la proteína cP450arom. Se observó una correlación positiva entre la expresión del ARNm de cP450arom y el SDS del peso y SDS de la longitud corporal al nacer. Finalmente, se evidenció una diferencia géneroespecífica en la expresión de la cP450arom de PI de RN AEG, siendo mayor en varones, la cual se perdería en los PEG. Proponemos que estas diferencias podrían estar relacionadas a la composición corporal de los RN.

- 154 (495) TRATAMIENTO CON ANTI-TNF- α EVIDENCIA EL ROL APOPTÓTICO DE LA CITOQUINA PRO-INFLAMATORIA TNF- α EN HÍGADO DE RATAS DIABÉTICAS INDUCIDAS POR ESTREPTOZOTOCINA.** Ingaramo P.¹; Ronco M.²; Monti J.³; Francés D.⁴; Ceballos M.⁵; Pisani G.⁶; Carrillo M.⁷; Carnovale C.⁸

Instituto de Fisiología Experimental-Conicet^{1 2 3 4 5 6 7 8}
<paolaingar@gmail.com>

La Diabetes Mellitus es considerada un proceso inflamatorio, pudiendo observarse aumento de citoquinas en el organismo. Entre ellas, el TNF- α puede iniciar varias rutas de señalización intracelulares que conducen a apoptosis. Nos planteamos estudiar el rol de TNF- α en la inducción de apoptosis en hígado de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (EZ). Ratas Wistar macho adultas fueron separadas en 2 grupos (n=10 c/u): (C) control (Buffer citrato, pH=4,5) y (D) diabético (EZ, 60 mg/kg de peso corporal (p.c) ip). Ratas de los 2 grupos se trataron con anti-TNF- α (Enbrel) 8 mg/Kg p.c. durante 15 días (2 inyecciones por semana, ip) (grupos: CaTNF y DaTNF). Luego de 30 días desde el inicio del experimento, ratas de todos los grupos se sometieron a eutanasia. Se les determinó la glicemia, el peso, se midieron las actividades de las caspasas 3 y 8 (fluorimetría) y se determinó el índice de apoptosis por conteo de células apoptóticas. En el grupo diabético además se evaluó por western blot la expresión de TNF- α en lisado hepático. Glicemia (método enzimático, g/l): C:1,17 \pm 0,01; D:4,67 \pm 0,42*; CaTNF:1,28 \pm 0,04†; DaTNF:4,30 \pm 0,19*. Peso corporal(g): C:439 \pm 8; D:297 \pm 9*; CaTNF:435 \pm 6†; DaTNF:301 \pm 5*. Los siguientes Resultados se expresan como % respecto de C, (C=100%): Expresión de TNF- α : D:250 \pm 112*. Actividad de Caspasa-8: D:938 \pm 731*; CaTNF:117 \pm 23†; DaTNF:92 \pm 13†; Actividad de Caspasa-3: D:122 \pm 5*; CaTNF: 92 \pm 7†; DaTNF: 92 \pm 7†; Índice de apoptosis (Expresado como %x10-2): C:1,1 \pm 0,2; D:2,7 \pm 0,5*; CaTNF:1,0 \pm 0,0†; DaTNF: 1,1 \pm 0,1†. (*p<0.05 vs C. †p<0.05 vs D). En conclusión los Resultados muestran que el TNF- α hepático aumenta en el estado hiperglicémico lo cual provoca un aumento en la activación de las caspasas 8 y 3 que conducen a apoptosis. El tratamiento con anti-TNF- α redujo los niveles de activación de las mismas con la consecuente reducción en el índice de apoptosis poniendo en evidencia el rol del TNF- α como mediador en las complicaciones hepáticas durante la diabetes.

155 (548) POSIBLE EFECTO DE LOS CANABINOIDES ENDÓGENOS Y EL RIMONABANT SOBRE LA INSULINORRESISTENCIA Y LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS β . Flores L.¹; Alzugaray M.²; Suburo A.³; Raschia M.⁴; Del Zotto H.⁵; García M.⁶; Borelli M.⁷; Maiztegui B.⁸; Madrid V.⁹; Massa M.¹⁰; Francini F.¹¹; Gagliardino J.¹²

CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada- (UNLP-CCT La Plata-CONICET) Facultad de Ciencias Médicas. UNLP, La Plata, Argentina^{1 2}; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, Buenos Aires, Argentina³; CENEXA-Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada- (UNLP-CCT La Plata-CONICET) Facultad de Ciencias Médicas. UNLP, La Plata, Argentina^{4 5 6 7 8 9 10 11 12} <luislab3301@yahoo.com>

Introducción: La obesidad se acompaña de insulinoresistencia (IR) y un aumento de la función celular β . La anandamida (AEA), endocanabinoide que regula el apetito, participaría en el mecanismo de producción de estas alteraciones. En consecuencia, drogas que interactúan con sus receptores específicos (CB1 y 2) se han utilizado para tratar la obesidad. Objetivo: Estudiar el posible papel regulador del sistema canabinoide sobre la secreción y los cambios endocrino-metabólicos inducidos en ratas normales por una dieta rica en fructosa (DRF). Métodos: Utilizamos ratas Wistar divididas en 4 grupos según la dieta recibida por 21 días: Control (C): dieta estándar, Fructosa (F) C más F al 10% en agua de bebida y ambas dietas con 2 mg/rata/día de un antagonista CB1 (Rimonabant; R). Se midió: glucosa, insulina y triglicéridos (TG) séricos y se calculó el HOMA-IR en los 4 grupos. Se extirpó el páncreas de ratas C y se estudió la expresión de CB1 y 2 (inmunohistoquímica y RT-PCR) y se midió la secreción de insulina in vitro en islotes incubados con diferentes concentraciones de glucosa (G 3.3, 8.3 y 16.7 mM) y AEA (0-200 μ M), ACEA (agonista CB1, 0-20 μ M) o JWH (agonista CB2, 0-20 μ M).

Resultados: Identificamos receptores CB1 en células α y CB2 en células β y δ . AEA aumentó significativamente (p<0.05) la secreción de insulina en presencia de G 8.3 mM (10 μ M AEA) y G 16.7 mM (100 μ M AEA). A 16.7 mM G, tanto ACEA como JWH 1 μ M aumentaron la secreción de insulina mientras que la disminuyeron a 20 μ M (p<0.05). La DRF aumentó (p<0.05) el consumo diario de calorías, el peso corporal y los niveles séricos de glucosa, TG e insulina, así como el índice HOMA-IR. La presencia de R en la dieta corrigió todos los parámetros (p<0.05). Conclusión: Los islotes expresan CB1 y 2 con un patrón celular definido y modulan la secreción de insulina según la concentración de glucosa; el bloqueo del sistema canabinoide in vivo corrige la mayoría de las anomalías inducidas por la DRF

156 (557) EVIDENCIAS DEL EFECTO DIRECTO DE LIPOPOLISACÁRIDO SOBRE CÉLULAS LACTOTROPAS EN CULTIVO PRIMARIO: PRESENCIA DEL RECEPTOR TLR-4. Sabatino M.¹; Gutiérrez S.²; Mascanfoni I.³; Petiti J.⁴; Sosa L.⁵; Pellizas C.⁶; Torres A.⁷; De Paul A.⁸

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Cs. Médicas. UNC.^{1 2}; Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Cs. Químicas. UNC³; Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Cs. Médicas. UNC.^{4 5}; Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Cs. Químicas. UNC⁶; Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Cs. Médicas. UNC.^{7 8} <jetama@hotmail.com>

Previamente demostramos que lipopolisacárido (LPS) indujo proliferación de lactotropas de hipófisis hiperplásicas. En esta investigación, se analizó la presencia de su receptor, TLR-4 y la contribución de vía CD14/Akt/ERK1-2/NF- κ B en la proliferación de lactotropas inducida por LPS. Adenohipófisis de ratas macho adultas tratadas con benzoato de estradiol por 60d fueron extraídas, cultivadas y las células tratadas con: LPS (2 μ g/ml), E2 (100nM), LPS+E2, por 30min. La expresión de TLR-4, CD14, p-Akt, p-ERK1/2 fue determinada por western blot (WB) en extractos citosólicos (EC); y NF- κ B en extractos nucleares (EN) y EC, además de su localización ultraestructural. La presencia TLR-4 y CD14 en lactotropas se evaluó por citometría de flujo (CF) y por inmunofluorescencia (IF; Microscopía Confocal). Análisis estadístico: ANOVA-Fisher. LPS solo o combinado con E2 aumentó significativamente la expresión de TLR-4 y CD14 en EC y activó Akt y ERK1/2. Además LPS incrementó los niveles de NF- κ B en EN respecto a EC indicando su translocación al núcleo (p<0.05). El estímulo con E2 solo, no provocó cambios en la expresión de NF- κ B. Por CF se detectó marca positiva para TLR-4 y CD14 en lactotropas controles no permeabilizadas (21% y 73% respectivamente), indicando su localización en membrana plasmática. No se detectaron cambios significativos en la expresión de TLR-4 en la superficie celular luego del tratamiento con LPS; sin embargo hubo un aumento en el número de lactotropas positivas para CD14 (17% vs control, p<0.05). La IF confirmó la presencia de células lactotropas positivas para TLR-4 localizado tanto en membrana plasmática como citoplasma. Nuestros Resultados demuestran la presencia del receptor de LPS: TLR-4 en membrana plasmática de lactotropas. Además, LPS activa la vía CD14/Akt/ERK1-2 promoviendo la translocación nuclear de NF- κ B para finalmente inducir proliferación de lactotropas. La interacción LPS-TLR-4 revela la funcionalidad del receptor en células endócrinas.

157 (647) HIPERPLASIA ADRENAL CONGÉNITA LIPOIDEA EN UN PACIENTE 46XY Y AMBIGÜEDAD GENITAL PORTADOR DE UNA MUTACIÓN DE NOVO HETEROGICOTA DEL GEN STAR (PROTEÍNA REGULATORIA AGUDA DE LA ESTEROIDOGENÉNESIS). Guercio G.¹; Baquedano M.²; Berensztejn E.³; Costanzo M.⁴; Vaiani E.⁵; Saraco N.⁶; Marino R.⁷; Rivarola M.⁸; Belgorosky A.⁹

Hospital de Pediatría Garrahan^{1 2 3 4 5 6 7 8 9}
<gabyguercio@yahoo.com>

Las mutaciones bialélicas del gen StAR, se manifiestan con insuficiencia adrenal primaria (IAP) y fenotipo genital femenino independientemente del sexo genético. Se ha descrito (Katsumata Or11-3 Endo09) un paciente 46 XY con IAP, fenotipo masculino y pubertad detenida portador de la mutación IVS1-2G>A heterocigota en el gen StAR, causante de un splicing aberrante con pérdida del exón 2 (ARNm -E2). Se presenta un paciente 46 XY con ambigüedad genital e IAP. En el período neonatal el laboratorio reveló niveles séricos indetectables de SDHEA, A4, 17OHP, T, Cortisol y Aldosterona, niveles elevados de ACTH (143 pg/ml) y renina (28 ng/ml/h) y falta de respuesta a la hGC. La respuesta al LHRH fue compatible con minipubertad (LH pico 12,9 mUI /ml, FSH pico 15,2 mUI/ml), sin movilización de la T sérica (T <0.05 ng/ml). La secuenciación del gen StAR reveló la mutación de novo IVS1 -2G>A, heterocigota. Los genes SF-1 y DAX1 no mostraron anomalías. Se asignó sexo femenino. A los 3 años se realiza gonadectomía bilateral con histología compatible con testículos inmaduros. El cultivo primario de células testiculares mostró producción de T basal y post hCG. La expresión del ARNm StAR en tejido gonadal reveló una banda de 397pb (ARNm-E2) y una banda débil de 511pb (ARNm normal), mientras que ambas se observaron con igual intensidad en las células en cultivo. Describimos por primera vez un paciente 46 XY con ambigüedad genital portador de una mutación heterocigota del gen StAR, sugiriendo que la heterocigosis podría afectar la esteroidogénesis testicular en la vida intrauterina. La producción de T in vitro podría ser secundaria a condiciones del cultivo que permitirían la expresión del splicing normal. Postulamos que factores locales testiculares regularían de manera diferencial la expresión del ARNm-E2 vs el normal, condicionando la diferencia fenotípica de los dos pacientes con esta mutación. La IAP neonatal presente en ambos pacientes avalaría esta hipótesis.

158 (668) EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA CINÉTICA CELULAR EN HIPOFISIS EN LARVAS DE RHINELLA ARENARUM (AMPHIBIA, ANURA). Distler M.¹; Jungblut L.²; Heer T.³; Paz D.⁴; Pozzi A.⁵

Laboratorio de Biología del Desarrollo, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, IFIBYNE-CONICET, FCEN-UBA^{1 2 3 4 5} <mija⁸⁷@hotmail.com>

El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal de vertebrados juega un rol importante en el desarrollo y la adaptación fisiológica a los cambios ambientales. El desarrollo larval en anfibios involucra una serie coordinada de cambios regulados por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides y modulados por glucocorticoides (GC) ante estímulos estresantes del entorno. Los cambios a nivel del crecimiento y desarrollo se asemejan a los observados en mamíferos expuestos a situaciones de estrés durante la vida fetal, sugiriendo que algunos mecanismos de acción de los GC durante el desarrollo estarían evolutivamente conservados. Objetivo: Estudiar si el estrés crónico por hacinamiento o por el tratamiento sostenido con corticosterona (B) provoca un desbalance entre la proliferación y apoptosis en la hipófisis de larvas de sapo. Tratamiento 1 Larvas mantenidas a dos densidades: 5 larvas/l (control) y 40 larvas/l (hacinamiento); Tratamiento 2 Larvas mantenidas a 5 larvas/l sin y con B exógena (100, 200 nM). Se midieron los niveles endógenos de B por RIA; se trataron los animales con BrdU para estudiar la proliferación celular y se analizó el número de células apoptóticas por TUNEL y caspasa 3-activada por inmunohistoquímica. Los animales hacinados además de cambios morfológicos mostraron aumento significativo (p<0,005) en los valores de B con una disminución en la proliferación hipofisaria de un 70% (p<0,001) comparado con el control, sin alterar el número de células apoptóticas. Sin embargo, en hipotálamo el estrés aumentó el número de figuras apoptóticas. El tratamiento con B exógena aumentó los niveles endógenos de B en 2,94 y 7,27 veces para 100 y 200 nM respectivamente, niveles comparables con los alcanzados por estrés por hacinamiento e induciendo además una disminución en el número de células BrdU positivas. Conclusiones: El aumento de B por hacinamiento durante el desarrollo larval provoca un desbalance en el crecimiento y desarrollo hipofisario por caída en la proliferación celular.

159 (688) ¿ACTÚAN LOS ROS COMO REGULADORES FISIOLÓGICOS DE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR DIFERENTES ESTÍMULOS? Borelli M.1; Raschia M.2; García M.3; Rebolledo O.4; Gagliardino J.5

CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada) 1 2 3 4 5 <miborelli@yahoo.com.ar>

La actividad de la NADPH oxidasa ha sido estudiada en islotes pancreáticos de animales normales, aunque hasta el momento restaba esclarecer su efecto sobre la secreción de insulina en respuesta a diferentes secretagogos. En este trabajo estudiamos la actividad de NADPH oxidasa en islotes aislados de ratas normales y su efecto modulador sobre la secreción de insulina estimulada por diferentes secretagogos. Nuestros Resultados muestran que islotes de rata incubados en presencia de glucosa (16.7 mM), ácido palmítico, ácido oleico y KCl incrementan significativamente la actividad de NADPH oxidasa con respecto a aquella medida frente a glucosa 3.3 mM. La incubación de islotes en presencia de estos secretagogos más el agregado al medio de un inhibidor de la NADPH oxidasa, el ioduro de difenilo (DPI) revierte el efecto estimulador. Actividad de NADPH oxidasa medida como reducción de NBT (unid.arbit/75 isl/h)

	G 3.3 mM	G 16.7 mM	Arginina 10 mM	Ác. palmítico 0.15 mM	Ác.oleico 0.15 mM	KCl 20 mM
Sin DPI	11.4±1.3	17.4±1.5	9.2±1.6	48.1±4.1	18.3±1.5	14.1±2.3
Con DPI	10.2±1.4	9.5±1.0*	6.21±1.1	12.9±0.7*	10.8±1.2*	5.9±1.1*

Todos los secretagogos testeados incrementan la secreción de insulina sobre el nivel basal. El DPI disminuye significativamente la respuesta secretora de los islotes incubados frente a 16.7 mM de glucosa e incrementa la respuesta frente al ácido oleico y al KCl, sin afectar aquella inducida por el ácido palmítico y la arginina. Secreción de insulina (ng isl/h)

	G 3.3 mM	G 16.7 mM	Arginina 10 mM	Ác. palmítico 0.15 mM	Ác.oleico 0.15 mM	KCl 20 mM
Sin DPI	0.06±0.01	0.95±0.06	0.25±0.04	0.18±0.03	0.18±0.02	0.25±0.02
Con DPI	0.04±0.01	0.67±0.07*	0.32±0.04	0.29±0.07	0.45±0.07*	0.36±0.05*

*p<0.05

Estos Resultados sugieren que la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) inducidos por NADPH oxidasa sería estímulo dependiente y jugaría un rol sobre el mecanismo de regulación de la secreción de insulina.

FARMACOLOGÍA 1

160 (69) CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN ANTIVIRAL DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA (DHEA) FRENTE A ADENOVIRUS EN CULTIVOS CELULARES. Wachsman M.¹; Torres N.²; Castilla V.³

Laboratorio de Virología Departamento de Química Biológica FCEN UBA^{1 2 3} <wachsman@qb.fcen.uba.ar>

Los adenovirus (AdV) producen conjuntivitis e infecciones respiratorias en niños y no existe una terapia antiviral aprobada contra estos virus. La DHEA es una hormona esterooidal presente en el torrente sanguíneo y tiene una gran variedad de actividades biológicas entre ellas actividad antiviral. El objetivo de este trabajo fue profundizar en el conocimiento del mecanismo de acción antiviral de DHEA frente a AdV5. Se determinó la concentración citotóxica 50, utilizando el método del MTT en células A549, tratadas con DHEA. La concentración efectiva 50 se calculó por el método de reducción del rendimiento viral y se calculó el índice de selectividad que fue de 62,5; semejante al del cidofovir (66,5) utilizado como referencia, determinándose además que DHEA no presenta actividad virucida. El agregado de DHEA a distintos tiem-

pos p.i., produjo una inhibición de 2 log cuando se agregó entre las 0 y 2 h y de 1 log cuando se agregó a partir de las 4 h. Esto indica que DHEA puede afectar la formación y liberación de partículas infecciosas al medio extracelular. El análisis mediante Western blot, mostró una disminución significativa de la síntesis de proteínas virales en las células infectadas y tratadas con DHEA. Dado que se sabe que AdV requiere la activación de la cascada de MAPKs y que DHEA modula este sistema de señalización, se decidió analizar si existe una relación entre la actividad antiviral de DHEA y su capacidad de inhibir la vía de señalización mediada por ERK. Para ello, se estudio el efecto de un inhibidor de la activación de ERK, el UO126, sobre la multiplicación de AdV. UO126 produjo una inhibición significativa de AdV5 semejante a DHEA y el tratamiento combinado de UO126 y DHEA mostró también un efecto inhibitorio de la replicación viral. Estos Resultados sugieren que la reducción en la síntesis de proteínas de AdV podría deberse a una posible acción inhibitoria de DHEA sobre la activación de las MAPKs.

161 (134) FORMULACIÓN DE COMPLEJOS DENDRÍMERO-RISPERIDONA PARA EL TRATAMIENTO DE TGD. Prieto M.¹; Del Rio Zabala N.²; Temprana F.³; Alonso S.⁴

Universidad Nacional de Quilmes - Laboratorio de Biomembranas^{1 2 3 4} <jprieto@unq.edu.ar>

Introducción. El autismo es un grave trastorno psicológico de la infancia. Las drogas antipsicóticas incluyen tanto los agentes convencionales como los atípicos; la risperidona (RSP) es una de los atípicos más utilizados. Sin embargo, debido a sus propiedades fisicoquímicas, la droga presenta severos efectos colaterales. Los dendrímeros, son polímeros tridimensionales, de superficie ramificada. Sus propiedades incluyen: mínima polidispersidad, estructura definida y tamaño controlado en los nanómetros, alta solubilidad en medios acuosos. Los dendrímeros PAMAM G4 (D) podrían incorporar RSP en el interior de bolsillos hidrofóbicos o anclarlos a grupos superficiales. **Objetivo.** El presente trabajo plantea complejar RSP con D como sistema de liberación controlada, apuntando al aumento de su solubilidad en medios acuosos. De esta manera, se modifica la RSP biodisponible proporcionando concentraciones terapéuticas con una menor dosis. **Diseño del estudio.** Usando diferentes protocolos se puso a punto la técnica final: se combinaron diferentes relaciones D:RSP en cloroformo/metanol, se incubaron por 48 h y posteriormente se evaporó el solvente. Los residuos sólidos se disolvieron en 50 µl de buffer y se centrifugaron para separar los complejos solubles. Se cuantifico D-RSP por absorbancia UV-visible (NanoDrop 1000). **Resultados.** Se obtuvieron complejos D-RSP con una relación molar de 1:3, de esta manera se logró una formulación de RSP completamente soluble en medios acuosos. **Conclusión.** En el presente trabajo se planteó una formulación novedosa de un sistema de liberación controlada con la droga antipsicótica risperidona. Los Resultados obtenidos indican que hay un incremento en la solubilidad de la droga complejada al D en medios acuosos, lo que produciría una disminución de la unión a proteínas plasmáticas y sus consecuentes efectos colaterales.

162 (248) MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LA P-GLICOPROTEÍNA (P-GP) INTESTINAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO (SM). Novak A.¹; Godoy Y.²; Filia M.³; Rubio M.⁴; Ghanem C.⁵; Celuch S.⁶

Instituto de Investigaciones Farmacológicas. FFYB. CONICET; Cátedra de Fisiopatología. FFYB. UBA¹; Instituto de Investigaciones Farmacológicas. FFYB. CONICET^{2 3 4}; Instituto de Investigaciones Farmacológicas. FFYB. CONICET; Cátedra de Fisiopatología. FFYB. UBA⁵; Instituto de Investigaciones Farmacológicas. FFYB. CONICET⁶ <karitoo@hotmail.com>

Varios estudios sugieren alteraciones en la expresión o actividad de la P-gp en la diabetes tipo 1. Sin embargo, hay escasa

información acerca del estado de la P-gp en relación al SM, un conjunto de factores de riesgo que a su vez aumentan la probabilidad de padecer diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión y actividad de la P-gp intestinal en un modelo experimental de SM. **Materiales y Métodos:** Ratas Sprague-Dawley machos fueron alimentadas con dieta sólida estándar y recibieron, durante 2 meses, fructosa 15% (FRU) en el agua de bebida. Como controles (C) se utilizaron animales de la misma camada a las cuales se suministró agua corriente. Luego de 12 hs de ayuno se evaluó la actividad de P-gp en sacos intestinales evertidos usando rhodamina 123 (Rho, 15 µM) como sustrato, en presencia o ausencia del inhibidor selectivo verapamilo (100 µM). La expresión de P-gp se estimó por western-blot. **Resultados:** Para confirmar la efectividad del modelo se valoraron los niveles de glucosa y triglicéridos en sangre, cuyos niveles estuvieron incrementados en el grupo FRU con respecto a C. La actividad intestinal de P-gp disminuyó en el grupo FRU vs C (nmol Rho/40min/g intestino: FRU=0.86±0.39; C=1.72±0.51; p<0.05, n=5). La cinética de excreción fue lineal (20-40 min) y su pendiente expresada en nmol Rho/min/g intestino disminuyó en el grupo FRU (0.0284±0.0040) con respecto de C (0.0552±0.0089) (p<0.05; n=5). Verapamilo abolió estas diferencias, confirmando el rol de P-gp. También la expresión de P-gp intestinal disminuyó en el grupo FRU con respecto al control (FRU=44±15%; C=100±13%; p<0.05; n=3). **Conclusiones:** El consumo crónico de fructosa produce una disminución de la expresión de P-gp en el intestino de rata. Dicha disminución podría favorecer la absorción de drogas que son sustratos de este transportador. Estudio subsidiado por CONICET (PIP 112-200801-00330), UBA B609 y ANPCyT (2007-1039).

163 (257) FARMACOMODULACIÓN DE COMPUESTOS CUMARÍNICOS EN BÚSQUEDA DE MAYOR SELECTIVIDAD Y POTENCIA EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS LEUCÉMICAS. Vázquez R.¹; Gómez N.²; Mogliani A.³; Vermeulen M.⁴; Shayo C.⁵; Davio C.⁶; Riveiro M.⁷

Cátedra de Química Medicinal, FFYB, UBA.^{1 2 3}; Laboratorio de Inmunología Oncológica, Academia Nacional de Medicina⁴; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular⁵; Cátedra de Química Medicinal, FFYB, UBA.⁶; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular⁷ <rmirobioq@hotmail.com>

La identificación y optimización de una nueva molécula líder constituyen las fases iniciales en el desarrollo de un nuevo fármaco. En búsqueda de nuevas drogas inductoras de apoptosis en células leucémicas hemos descrito al compuesto 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (1) como prototipo farmacológico. Dado que el núcleo cumarínico puede plantearse como la fusión de un anillo bencénico y un anillo de 2-pirona, nuestro objetivo consistió en aplicar distintas estrategias de farmacomodulación sobre (1) como parte de los estudios de relación estructura-actividad. Se analizó la actividad apoptótica de una serie de 2-pironas, derivados del ácido cinámico (análogos de cadena abierta) y cumarinas ortodihidroxiladas, en células promonocíticas U-937. En las 3 series se evaluó la inhibición de la proliferación (por incorporación de 3H-timidina y ensayo clonogénico) y la citotoxicidad (por tinción con Azul Tripán) luego de 48 h en células U-937. Como marcadores de apoptosis se evaluaron la actividad de caspasa 3 (ensayo colorimétrico) y clivaje de PARP y pro-caspasa 3 (por Western Blot). Para evaluar la selectividad se determinó la citotoxicidad y activación de caspasa-3 en monocitos y linfocitos normales. Los Resultados obtenidos indican que las 5 pironas evaluadas no inhiben la proliferación en células U-937. En cambio, tanto las cumarinas (1; 2; 3; 4) como sus análogos de cadena abierta (5 y 6) inhiben la proliferación e inducen apoptosis luego de 48 h, presentando las cumarinas mayor potencia. Referido a la selectividad, las cumarinas inducen mayor toxicidad sobre células leucémicas que sobre células normales. Estos Resultados indican el valor del grupo catecol en la actividad apoptótica, señalando la importancia del núcleo cumarínico en la potencia y selectividad de estos nuevos prototipos farmacológicos. 2: 6,7-

dihidroxicumarina; 3: 6,7-dihidroxi-4-metilcumarina; 4: 6-metoxi-7,8-dihidroxicumarina; 5: ácido 3,4-dihidroxicinámico; 6: ácido 3,4-dihidroxi-4-metilcumarina.

164 (275) MECANISMO DE TOXICIDAD Y CICLO REDOX DE NAFTOQUINOIDAL TRIAZOLES. Elingold I.¹; Da Silva Jr E.²; Casanova M.³; Mansini A.⁴; Paulino M.⁵; Ferreira V.⁶; Dubin M.⁷

CEFYBO, Facultad de Medicina, UBA-CONICET¹; Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química, UFF, Niterói, RJ, Brasil²; CEFYBO, Facultad de Medicina, UBA-CONICET³; Laboratorio de Bioinformática, y Modelo Biomolecular-DETEMA-Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo; Uruguay.⁵; Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química, UFF, Niterói, RJ, Brasil⁶; CEFYBO, Facultad de Medicina, UBA-CONICET⁷ <mis10jerbos@hotmail.com>

Las naftoquinonas son compuestos que se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Poseen muy diversas actividades biológicas entre las que se destacan sus efectos antitumorales, antiinflamatorios, antimicrobianos, entre otros. En este trabajo estudiamos mecanismos de acción de tres naftoquinoidal triazoles (NFT's) sintetizados a partir de nor-lapachol, con actividad tripanocida: ENSJ5, ENSJ13 y ENSJ14, en microsomas de hígado de rata, y sus posibles efectos tóxicos. Los tres compuestos inhibieron la lipoperoxidación (LPO) NADPH-dependiente y la iniciada por hidropéroxido de ter-butilo, en forma dependiente de la concentración, cuando la incubación se realizó en presencia de NADPH. La LPO iniciada por ascorbato fue inhibida por los NFT's a 10 y 100 µM, llegando a una inhibición máxima del 97%. Los tres compuestos, en partículas sub-mitocondriales, estimularon la oxidación de NADPH y la actividad NADH-oxidasa, con inhibición máxima del 57% para esta última, a 50µM. La actividad succinato-oxidasa no fue afectada por ninguno de los compuestos en estudio. Estos Resultados sugieren que estas drogas inhibirían la lipoperoxidación microsomal hepática por desvío de equivalentes de reducción provenientes del NADPH (ciclo redox) y/o por un efecto antioxidante atribuible a los metabolitos de los NFT's al ser reducidos por ascorbato, a 10 y 100 µM, para las tres drogas estudiadas. Por otra parte, ninguno de los compuestos o sus productos reducidos, afectarían la actividad de los complejos respiratorios investigados.

165 (301) NUEVAS NAFTOFURANQUINONAS TRIPANOCIDAS: ESTUDIOS SOBRE EL METABOLISMO MITOCONDRIAL HEPÁTICO. Elingold I.¹; Casanova M.²; Silva R.³; Mansini A.⁴; Ventura Pinto A.⁵; Dubin M.⁶

CEFYBO, Facultad de Medicina, UBA-CONICET¹; Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil²; CEFYBO, Facultad de Medicina, UBA-CONICET⁴; Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil⁵; CEFYBO, Facultad de Medicina, UBA-CONICET⁶ <mis10jerbos@hotmail.com>

Las naftoquinonas, postuladas como citostáticos, antivirales y tripanocidas potenciales pueden inhibir varias enzimas y generar especies reactivas del oxígeno en diferentes sistemas biológicos. Las naftofuranquinonas (NFQ's) NPPN 3222, 3223 y 3226, son compuestos sintéticos derivados del lawsone con actividad tripanocida, demostrada sobre la forma tripomastigote del T.cruzi. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de las NFQ's en mitocondrias de hígado de rata. La adición de 3222 y 3226 (10µM) a una suspensión mitocondrial, con malato-glutamato (MG) como sustrato, estimuló el consumo de oxígeno, medido por polarografía, en estado 3 (E3). El estado 4 (E4) fue estimulado por las NFQ's a 10µM. A 1 y 10 µM estas drogas disminuyeron el índice de control respiratorio (ICR). En presencia de succinato como sustrato, 3222 y 3226, estimularon E4 a 10 µM sin afectar el estado E3. El ICR fue inhibido por 3222 y 3223 a 10 µM y por 3226 a 1 y 10 µM. Las NFQ's no tuvieron efecto sobre la activi-

dad succinato-oxidasa, mientras que la NADH-oxidasa fue estimulada por 3222 a 50 µM en partículas sub-mitocondriales. Al utilizar CNK como inhibidor de la respiración, la actividad NADH-oxidasa, fue estimulada por las NFQ's. El potencial de membrana mitocondrial (PMM) con MG como sustrato fue inhibido a 50µM por 3223 y 3226, y a 10 µM por 3222. Con succinato como sustrato, el PMM fue inhibido a 10 y 50µM por las drogas estudiadas. Estos Resultados indicarían una acción desacoplante de la fosforilación oxidativa por las NFQ's, produciendo daño mitocondrial sin afectar la actividad succinato-oxidasa.

166 (307) TIOSEMICARBAZONAS Y DERIVADOS COMO POSIBLES AGENTES ANTILEUCEMICOS. Gómez N.¹; Santos D.²; Vazquez R.³; Riveiro M.⁴; Caputto E.⁵; Finkielstein L.⁶; Gambino D.⁷; Moglioni A.⁸; Davio C.⁹

Cátedra de Química Medicinal- FFyB¹; Cátedra de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Montevideo, Uruguay²; Cátedra de Química Medicinal- FFyB; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME, CONICET³; Cátedra de Química Orgánica III- FFyB, UBA.⁵; Cátedra de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Montevideo, Uruguay⁷; Cátedra de Química Medicinal- FFyB, UBA, CONICET⁹ <natomangosta@hotmail.com>

El tratamiento de los distintos tipos de cáncer continúa siendo hoy uno de los mayores desafíos de la medicina. Las terapias actualmente utilizadas resultan altamente tóxicas y poco selectivas. Las tiosemicarbazonas (TSCs) han sido compuestos de interés para el desarrollo de agentes quimioterápicos en los últimos tiempos. Hemos sintetizado una serie de 10 tiosemicarbazonas de 1-indanonas y se evaluó la inhibición de la proliferación (por incorporación de 3H-timidina) y la citotoxicidad (por tinción con Azul Tripán) sobre la línea celular promonocítica humana U937 luego de 48 h de tratamiento. Los compuestos de esta serie no resultaron activos, siendo sus CI50 > 100 µM. Por otra parte, ha sido demostrado que la preparación de complejos de metales a partir de una variedad de TSCs es útil como estrategia para incrementar la actividad de las mismas. Sintetizamos estructuralmente complejos de 1-indanona con los iones divalentes de Cu, Zn, Pt y Pd. Se determinaron la CI50 y CC50 de estos compuestos resultando altamente activos. A continuación se realizó un screening de actividad pro-apoptótica, evaluándose la actividad enzimática de caspasa-3 con un kit colorimétrico, la fragmentación de ADN en geles de agarosa y la activación de caspasa-3 y el clivado de PARP mediante western-blot. Los complejos de Cu, Pt y Pd inhibieron la proliferación celular con una CI50 de: 8.18 ± 0.70, 3.84 ± 0.35, 28.42 ± 2.66, 7.58 ± 0.34, < 1.56 y < 1.56 mM para [Cu(TSC-H)], [Cu(TSC-H)2], [Pt(TSC)]Cl2, [Pt(TSC)(HTSC)]Cl, [Pd(TSC)]Cl2 y [Pd(TSC)(TSC-H)]Cl respectivamente. Estos últimos, excepto [Pd(TSC)]Cl2 y [Pd(TSC)(TSC-H)]Cl, resultaron positivos en el screening de apoptosis. Por otro lado, los complejos [Zn(TSC)] y [Zn(TSC)2] no mostraron actividad antiproliferativa ni pro-apoptótica. Estos Resultados demuestran que la complejación de TSC con Cu y Pt es una buena estrategia en el diseño de fármacos con actividad antileucémica. Autores 1 y 2 igual contribución.

167 (651) NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO: POTENCIACIÓN DE LOS EFECTOS ANTIDEPRESIVOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 CON FLUOXETINA EN TRATAMIENTOS COMBINADOS EN RATAS. Laino C.¹; Podestá M.²; Reinés A.³

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud Humana (IICSHUM) Universidad Nacional de La Rioja; Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, CONICET-UBA), Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹; Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, CONICET-UBA), Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA² <carloslaino2001@yahoo.ca>

La depresión es una enfermedad crónica y recurrente que afecta al 20% de la población a lo largo de su vida. Los antidepresivos poseen secundarios o colaterales, los cuales predisponen a la suspensión del tratamiento. Los ácidos grasos omega-3 (ω -3) son esenciales para la formación y el adecuado funcionamiento del cerebro humano. Recientes investigaciones han indicado que la ingesta deficiente en ω -3 produce disfunciones en la neurotransmisión, pudiendo ser la causa de diversos trastornos psiquiátricos como la depresión. Se ha demostrado que pacientes que reciben ω -3 como suplemento presentan mejorías significativas de sus síntomas. Previamente nosotros demostramos en ratas que la dieta ω -3 (0.72 g/kg/día) produce efectos antidepresivos en un modelo experimental de depresión (nado forzado) y que su efecto es sinérgico al del antidepresivo fluoxetina (10 mg/kg/día). El objetivo del presente trabajo fue profundizar el estudio del sinergismo farmacológico del tratamiento combinado y evaluar la participación de las moléculas de adhesión neuronal. Dosis de 0,1 y 0,5 mg/kg de FLX carentes de efecto antidepresivo en combinación con dosis antidepresivas de ω -3 (0.30 g/kg) no mostraron beneficios en la magnitud global del efecto. Por el contrario, dosis inefectivas de FLX de 1 mg/kg/día potenciaron el efecto antidepresivo observado con la dieta ω -3 (0.72 g/kg/día). En condiciones de sinergismo aditivo, tanto el tratamiento con ω -3 (0.72 g/kg/día) como con FLX (10 mg/kg/día) disminuyeron la presencia de NCAM-140 en las fracciones hipocámpales de membrana de baja densidad insolubles en Tritón X-100, mientras que el tratamiento combinado indujo un descenso menor al aditivo. Nuestros Resultados sugieren que la potenciación de los ω -3 con FLX podría representar una estrategia de tratamiento para reducir la aparición de efectos adversos, y que la modulación de la compartimentalización de las moléculas de adhesión podría contribuir al sinergismo observado.

168 (85) VALIDACIÓN DE UNA FICHA DE REGISTROS DE ANESTESIA EN RATONES, PÚBERES, ADULTOS Y GERONTES

Consiglio F.¹; Harvey G.²; Colucci D.³; Puig N.⁴; Elena G.⁵
 Instituto de Inmunología. Facultad de Cs. Médicas. UNR.¹;
 Carrera de Anestesiología. Facultad Cs. Médicas. UNR.²;
 Instituto de Inmunología. Facultad de Cs. Médicas. UNR.³;
 Instituto de Inmunología, Carrera de Anestesiología y Carrera del Investigador, Facultad de Cs. Médicas UNR.⁴ ;
 Carrera de Anestesiología. Facultad de Cs. Médicas. UNR.⁵
 <franciscojconsiglio@gmail.com>

Los cambios clínicos permiten evaluar procedimientos anestésicos en animales. El registro de datos en una ficha anestésica no es práctica habitual en ratones. Una ficha permite registrar el procedimiento aplicado, la respuesta obtenida, y además información de la anestesia. Constituye un recuento de los fenómenos fisiológicos, farmacológicos y de las decisiones tomadas y constancia del respeto a las normas bioéticas. Objetivo: Comprobar la utilidad de una ficha de registro anestésico para ratones en diferentes edades con un mismo método anestésico. En ratones machos CBI púberes (P) n: 36; 51±5 días, 35±4g; adultos (A) n: 20; 103±9d, 45±3g y gerontes (G) n: 36; 196±14d; 46±4g, se administró halotano 1,5% en oxígeno 100% por 40 min. Los grupos P y G requirieron al 2%. Los datos estáticos involucran las características del animal, intervención, operador y método anestésico. Los datos dinámicos, cambios de las variables fisiológicas vitales: respiración, tiempo llenado capilar, color de mucosas y actividad, respuesta al estímulo doloroso pinzamiento de la cola, al manejo y etapas quirúrgicas. Sedoanalgesia óptima: estado que incluye simultáneamente no respuesta al dolor (analgésia clínica), actividad dormido y no respuesta al manejo (sedación). Evaluación estadística: pruebas no paramétricas. Resultados: 80/92 respiración normal y signos de buena perfusión.

Grupo experimental	Sedoanalgesia óptima (Frecuencia)	Latencia hasta Sedoanalgesia ^a	Sedoanalgesia ^a	Duración acto anestésico ^a
P 1,5%	12/18	7,1±3,7	37,4±5,1 ^c	46,7±1,5
P 2%	14/18	3±0,1 ^b	40,1±1,8	44,1±1,6
A 1,5%	19/20	3±0,8 ^b	42,3±2,8	47,7±2,7 ^d
G 1,5%	4/18	3,2±0,5	39,7±0,5	44±0,1
G 2%	18/18	2,3±0,5 ^b	42,8±2,3	47,6±3,5 ^d
P	0,000	0,000	0,001	0,000

^aMin. (Prom. ± d.e.); ^bp<0,05 vs P 1,5%; ^cp<0,05 vs G 2%; ^dp<0,05 vs P 2%.

La ficha para registro anestésico en ratones, utilizando halotano resultó útil y contribuyó a administrar la dosis adecuada. Ofreció registros clínicos que evitarían sesgos en las investigaciones que utilizaran dicho procedimiento anestésico.

GENÉTICA Y MEDICINA REGENERATIVA

169 (26) POLIMORFISMO ALA54THR DEL GEN FABP2 ASOCIADO A RIESGO CARDIOVASCULAR EN FAMILIARES DE PRIMER GRADO DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2. Araujo Furlan C.¹; Gonzalez I.²; Siewert S.³; Filipuzzi S.⁴; Ojeda M.⁵

Universidad Nacional de San Luis^{1 2 3} ; Hospital Provincial de Santa Rosa (San Luis)⁴ ; Universidad Nacional de San Luis⁵ <cintia_a²⁹@yahoo.com.ar>

La proteína de unión a los ácidos grasos (FABP2) participa en la transferencia y metabolismo intracelular de los ácidos grasos (AG) de cadena larga. El polimorfismo más frecuente es la sustitución de Alanina (Ala) por Treonina (Thr) en el exon 2. Los portadores del alelo Thr54 tienen el doble de afinidad por los AG, predisponiendo a una hipertrigliceridemia, factor de riesgo cardiovascular. Nuestro objetivo fue evaluar la asociación de dicho polimorfismo con factores de riesgo cardiovascular en familiares de primer grado de pacientes Diabéticos Tipo 2 (DMT2). Se analizaron 72 individuos de San Luis, Argentina, de ambos sexos y con edad promedio: 33,3±7,4 años. Se determinó: peso, talla, índice de masa corporal (IMC), circunferencia de cintura (cc), índice cintura-cadera, presión arterial (PA). Las determinaciones bioquímicas realizadas fueron: Glucemia (G), Insulinemia (I), Triglicéridos (TG), Colesterol Total (CT), HDL-c, LDL-c. Se evaluó HOMA- β Cell y HOMA-IR. La extracción de ADN, se realizó utilizando del kit QIAmp DNA Blood Mini Spin. La determinación del polimorfismo A54Thr fue realizada mediante la técnica de PCR-RFLPs. Las frecuencias genotípicas fueron: 50% A/A, 45,2% A/T y 4,8% T/T; las frecuencias alélicas fueron: 72,6% A y 27,4% T. Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos A/A y A/T-T en: IMC 35,1±5,6 vs 28,1±4,3 (p<0,0001), cc 107,3±13,2 vs 95,2±15,8 cm (p<0,003), CT 192,7±34,9 vs 238,4±47,4 mg/dl (p<0,005), TG 166,8±60,2 vs 231,4±72,2 mg/dl (p<0,03), HDL-c 47,1±7,9 vs 38,7±2,2 mg/dl (p<0,01) y G 88±8,2 vs 100,2±11 mg/dl (p<0,03). No se observaron diferencias significativas en: LDL-c, I, HOMA-IR y HOMA- β Cell. Presentaron hipertensión arterial el 57% de los portadores A/A y los A/T-T el 41%. Nuestros Resultados indicarían que el polimorfismo Ala54Thr del gen FABP2 podría ser un factor genético que contribuiría a la aparición de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, que incrementaría el riesgo cardiovascular.

170 (47) VALIDACIÓN ANALÍTICA DE LA MUTACIÓN JAK2 (V617F) POR PCR-RFLP Y SECUENCIACIÓN, EN PACIENTES CON SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS. Denninghoff V.¹; Waterhouse M.²; Riveros D.³; Finke J.⁴

CEMIC¹; CEMIC; Unidad de Trasplante de medula ósea, Hospital Universitario de Freiburg, Alemania²; CEMIC³; Unidad de Trasplante de medula ósea, Hospital Universitario de Freiburg, Alemania⁴ <vcdennin@yahoo.com.ar>

Introducción. La mutación en el gen de la tirosinquinasa JAK2(V617F) ha sido descrita en diversos síndromes mieloproliferativos crónicos (SMC). Numerosos métodos han sido propuestos para su identificación en pacientes con neoplasmas hematológicos, aunque no todos han sido validados. El objetivo del presente estudio es la validación clínica y analítica de la detección de la mutación JAK2(V617F). **Materiales y Métodos.** Para la validación analítica se realizaron diluciones seriadas de células HEL, homocigota para la mutación JAK2(V617F), con células RPMI8226 en diferentes proporciones (0-100%). Mediante citometría de flujo se aislaron células HEL con el objetivo de secuenciar el fragmento del exón 14 del gen que flanquea la mutación JAK2(V617F) en una única célula (single cell sequencing). Se aisló ADN (medula ósea, sangre periférica, granulocitos y células mononucleares) de pacientes con diversos SMC (QIAamp DNA Micro Kit) y se realizó PCR-RFLP y secuenciación. **Resultados.** La PCR-RFLP realizada sobre las diferentes diluciones de células HEL mostró en una sensibilidad analítica del 1% mientras que la sensibilidad de la secuenciación sobre las mismas muestras de ADN fue del 2%. El coeficiente de correlación (r2) entre PCR-RFLP y secuenciación fue superior a 0.90. En más del 90% de los casos fue posible secuenciar correctamente la mutación JAK2(V617F) en una única célula HEL. Utilizando el ADN de pacientes, con diferentes síndromes mieloproliferativos crónicos, que presentaban la mutación para JAK2(V617F) se realizaron curvas similares a las anteriormente mencionadas y la sensibilidad de la PCR-RFLP y la secuenciación fue del 3 y 5% respectivamente. La sensibilidad analítica con ambas metodologías fue similar independientemente del tipo de SMC. **Conclusión.** La PCR-RFLP y la secuenciación validadas en este estudio presentan una adecuada sensibilidad y especificidad analítica para su utilización en el algoritmo diagnóstico de pacientes con SMC.

171 (50) SIALOADENOSIS EN MODELOS MURINOS DE DIABETES. Cumba G.¹; Montenegro S.²; Gayol M.³; Martínez S.⁴; Tarrés M.⁵; Picena J.⁶

Facultad de Ciencias Médicas^{1 2 3 4 5 6} <mctarres@ciudad.com.ar>

Las lesiones orales se expresan en distintas topografías de la mucosa oral y en glándulas salivales mayores, siendo la sialoadenosis la patología más vinculada con la diabetes. En diferentes animales de experimentación se registran estas manifestaciones de manera diversa, no habiendo sido estudiadas en ratas de líneas espontáneamente diabéticas: eSS (magra con diabetes tardía) y eSMT (corpulenta con metabolopatía precoz). El material se obtuvo de 109 ratas de ambos sexos: 38 eSS, 54 eSMT y 17 controles Wistar, desde la adultez hasta la senectud. Los animales se sacrificaron respetando las normas éticas; la cabeza se seccionó al nivel más bajo posible para preservar parénquima parotídeo. Se disecaron las glándulas salivales, obteniéndose cortes semiseriados, procesados y coloreados con HE y tricrómica. Se detectó mayor presencia de dilatación ductal en eSMT (eSS: 18%, eSMT: 37%, W: 6%; X²= 8.19, p = 0.02); la fibrosis intersticial fue más frecuente en los genotipos dismetabólicos (eSS: 26%, eSMT: 39%, W: 6%; X²= 7.05, p = 0.03), en tanto que la inflamación fue similar en las tres líneas (eSS: 3%, eSMT: 9%, W: 6%; X² = 1.64, p = 0.44). Los infiltrados inflamatorios crónicos parotídeos fueron exclusivos de los animales diabéticos de 12 meses y más; en una hembra eSMT de 2 años este proceso fue multifocal y activo, con leucocitos polimorfonucleares neutrófilos. Se observó notoria atrofia de glándulas serosas linguales en dos animales eSMT de 24 meses. **Conclusión:** En las ratas dismetabólicas se comprobó la presencia de sialoadenosis como complicación, más intensa en eSMT, en correspondencia con la mayor severidad de la diabetes en esta línea. Dado que las glándulas salivales mayores repercuten en el estado general de la salud, la constatación de su agrandamiento - que suele ser inaparente y asintomático- resulta de la mayor importancia para la detección de diabetes en poblaciones de riesgo.

172 (124) ACTIVACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA MUC1 MEDIADA POR UN MECANISMO DE AMPLIFICACIÓN GÉNICA EN CARCINOMAS INVASORES DE MAMA. Lacunza E.¹; Segal-eiras A.²; Croce M.³; Abba M.⁴

CINIBA Facultad de Ciencias Médicas UNLP^{1 2 3 4} <ezequielacunza@hotmail.com>

El gen MUC1 localizado en la región 1q21.3 se halla sobreexpresado en adenocarcinomas de mama, confiriendo a las células tumorales potencial invasor y metastásico. Diversos estudios han demostrado que la sobreexpresión de esta glicoproteína se debe en parte a regulación transcripcional y/o a cambios epigenéticos. Sin embargo, el rol de la amplificación génica como mecanismo responsable de la sobreexpresión de MUC1 ha sido poco estudiado. **Objetivo:** determinar si el nivel de expresión de la oncoproteína MUC1 se encuentra asociado a un fenómeno de amplificación génica en el cáncer de mama. Se analizaron 89 muestras de mama (mama normal, lesiones benignas, carcinomas invasores y líneas celulares) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Q-PCR), inmunohistoquímica (IHQ) y western-blot (WB). Se detectó amplificación génica de MUC1 en 12% (1/8) de las lesiones benignas, 38% (23/60) de los carcinomas invasores y en la línea celular T47D. No se detectó amplificación génica de MUC1 en las muestras normales de mama. Estos Resultados revelan una asociación altamente significativa entre la amplificación génica de MUC1 y el grupo de carcinomas invasores de mama (p=0.004). El análisis por IHQ y WB permitió identificar una correlación altamente significativa entre la amplificación y la sobreexpresión de la oncoproteína MUC1 (p=0.0001). En conclusión, los Resultados presentados en este estudio demuestran que el incremento en la expresión de la proteína MUC1 en tumores de mama se correlaciona con un mecanismo de amplificación génica.

173 (665) ESTUDIOS BIOQUÍMICOS Y GENÉTICOS EN FAMILIAS PORTADORAS DE LA MUTACIÓN MÁS FRECUENTE EN PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE. Cerbino G.¹; Gerez E.²; Melito V.³; Batlle A.⁴; Parera V.⁵; Rossetti M.⁶

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA^{1 2}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA³; Departamento de Química Biológica-FCEyN-UBA⁴; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA⁵; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA; Departamento de Química Biológica,-FCEyN-UBA⁶ <gabriela.cerbino@gmail.com>

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es un desorden hepático agudo, autosómico dominante, producido por deficiencia en la Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D). Su expresión clínica es variable, determinada por factores ambientales, metabólicos y hormonales. La herencia de una copia del alelo mutado disminuye en un 50% la actividad enzimática. El diagnóstico bioquímico basado en este dato no es concluyente dado su solapamiento con valores normales. La detección de la mutación es así una herramienta indispensable. En Argentina la PAI tiene una prevalencia de 1:100000 y, si bien es genéticamente heterogénea, la mutación p.G111R presenta una frecuencia elevada. El objetivo de este trabajo ha sido analizar bioquímica y genéticamente las familias p.G111R para establecer un diagnóstico certero y contribuir al diagnóstico presintomático. Se realizaron los estudios bioquímicos de rutina y estudios genéticos por PCR y secuenciación automática. En el CIPYP están registradas 156 familias PAI estudiadas bioquímicamente y 74 están analizadas a nivel molecular. Cuarenta familias portan la mutación p.G111R (54%), una de las mayores prevalencias en PAI. Se presentan Resultados del estudio de las últimas 20 familias p.G111R: 66% de los individuos portan la mutación, de ellos, 78% son mujeres y 22% hombres, 66% sintomáticos y 34% latentes. El 90% de los pacientes sintomáticos son mujeres. El valor de PBGD en latentes (X= 72.0±4.3 U/ml GR)

es independiente del sexo y edad, y cercano al valor control ($X=71.3\pm 11.2$ U/ml GR). La penetrancia de la PAI es incompleta y varía entre un 10 y 50% según la mutación responsable. El valor de 66 % supera al descripto para otras mutaciones y poblaciones. El elevado número de mujeres sintomáticas nos indica que constituyen un grupo de riesgo para el desencadenamiento de PAI. El número de latentes con PBG-D normal enfatiza la necesidad de realizar el estudio genético familiar para su detección temprana y correcto asesoramiento médico y genético

174 (193) RASTREO DE MUTACIONES DEL GEN RB1 EN PACIENTES CON RETINOBLASTOMA. Piazza G.¹; Paiva-palomino J.²; Giliberto F.³; Fandiño A.⁴; Chantada G.⁵; Dávila M.⁶; Szijian I.⁷

Cátedra de Genética y Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{1 2 3}; Hospital de Pediatría Profesor Garrahan, Servicios de Oftalmología, Oncología y Anatomía Patológica^{4 5 6}; Cátedra de Genética y Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA⁷ <guillermopiazza79@hotmail.com>

El retinoblastoma (RB), tumor maligno de niñez, causado por pérdida de función del gen supresor tumoral RB1 (13q14) tiene dos formas: hereditaria (40%) y no hereditaria (60%). Las mutaciones descriptas incluyen grandes rearrreglos (20%) y mutaciones pequeñas (80%) su estudio es importante para determinar el riesgo en familiares de pacientes. El objetivo es estudiar 15 familias con RB, 3 con historia familiar, para identificar las mutaciones y predecir el riesgo. Se analizaron 9 pacientes con RB bilateral (hereditario) y 7 unilaterales (75% no hereditario) por medio de: i) Segregación de polimorfismos, para determinar haplotipo de riesgo y detectar grandes deleciones y ii) Identificación de mutaciones pequeñas. Se estudiaron 4 polimorfismos intragénicos: 3 RFLPs y un VNTR: CTTT(T) y se amplificaron por PCR región promotora, 27 exones y región poliadenilada de RB1 para analizar los productos por heteroduplex/secuenciación. La segregación de polimorfismos en dos familias con varios afectados permitió determinar haplotipos de riesgo y excluir a hermanos de pacientes. En la tercer familia dos primas segundas con RB mostraron diferentes haplotipos sugiriendo diferentes mutaciones causantes de RB, además se detectó una recombinación en el gen RB1, entre intrones 4 y 17, durante transmisión de madre a hija. En un caso esporádico el hermano del paciente heredó diferentes haplotipos paterno materno y pudo ser excluido del riesgo. El ensayo de heteroduplex detectó alteraciones en patrones de migración de exones 21 y 18 en dos familias, la secuenciación del exón 21 identificó la mutación g160833delA que produce desfasaje y codón stop, pE737fsX743. La identificación de haplotipos de riesgo y de mutaciones es útil para un diagnóstico temprano y para excluir a niños, familiares de pacientes, del riesgo de susceptibilidad a RB. El estudio de una familia con pacientes emparentados no cercanos brindó información sobre eventos de mutagénesis y recombinación en el gen RB1.

175 (239) LOS PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA CON UNA DELECCIÓN DE LOS GENES GSTT1 Y/O GSTM1 TENDRÍAN UN RIESGO ELEVADO DE SUFRIR UNA RECIDIVA. Acuña A.¹; Scorticati C.²; De Siervi A.³; Mazza O.⁴; Vazquez E.⁵; Cotignola J.⁶

Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Depto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA¹; Servicio de Urología, Hospital de Clínicas Jose de San Martín²; Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Depto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA³; Servicio de Urología, Hospital de Clínicas Jose de San Martín⁴; Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Depto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{5 6} <ale_acu@hotmail.com>

Uno de los desafíos más importantes en oncología es poder predecir la progresión de la enfermedad y la respuesta del paciente a la terapia. Las diferencias interindividuales en el fenotipo

del tumor, respuesta a xenobióticos, etc; se deben en parte a los polimorfismos genéticos. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto es identificar marcadores genéticos que permitan distinguir pacientes diagnosticados con Cáncer de Próstata (PCa) en los que la enfermedad progresará, o presentarán resistencia o toxicidad frente al tratamiento. Hasta agosto de 2009 reclutamos 84 pacientes con PCa provenientes del Hospital de Clínicas. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado. Se extrajo ADN de linfocitos de sangre periférica y se analizaron polimorfismos en genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos: Glutatión-S-Transferasas (GSTM1, GSTT1 y GSTP1), Gen de Resistencia Múltiple a Drogas 1 (MDR1), y Metilentetrahidro Folato Reductasa (MTHFR). Dos (GSTM1 y GSTT1) se estudiaron por PCR multiplex, y los otros tres por PCR-RFLP. El análisis estadístico preliminar de 40 pacientes mostró una tendencia a presentar recidivas para los pacientes con mayor grado de Gleason ($p=0,08$) y con el genotipo nulo para GSTM1 y GSTT1 ($p=0,09$). Se encontró también una tendencia a presentar mayor grado de Gleason en los pacientes fumadores. Los hallazgos preliminares presentados estarían corroborando que aquellos pacientes con PCa de mayor grado de Gleason tienen un mayor riesgo a sufrir recaídas, e indicarían que las enzimas GSTT1 y GSTM1 estarían involucradas en la evolución del PCa. Para confirmar estos Resultados se garantiza el estudio de más muestras ($n=200$). Los Resultados de este estudio podrían, en un futuro, ayudar a elegir el mejor esquema de tratamiento y seguimiento para cada paciente diagnosticado con cáncer de próstata; impactando sobre la sobrevida y calidad de vida de los pacientes.

176 (308) ESTUDIO DE MUTACIONES NOVELES COMO CAUSA DE DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA. Taboas M.¹; Fernández C.²; Buzzalino N.³; Minutolo C.⁴; Belli S.⁵; Oneto A.⁶; Pasqualini T.⁷; Charreau E.⁸; Alba L.⁹; Dain L.¹⁰

Centro Nacional de Genética Médica¹; Instituto de Biología y Medicina experimental²; Centro Nacional de Genética Médica^{3 4}; División de Endocrinología Hospital Durand⁵; Servicio de Pediatría Hospital Italiano⁷; Instituto de Biología y Medicina Experimental⁸; Centro Nacional de Genética Médica⁹; Centro Nacional de Genética Médica; Instituto de Biología y Medicina Experimental¹⁰ <melmac84@hotmail.com>

En un estudio previo se han estimado las frecuencias de las 10 mutaciones más frecuentes de la deficiencia de la 21-hidroxilasa en 356 afectados, detectando 85-95% de los alelos clásicos (C) y alrededor del 70% de los no clásicos (NC). El objetivo de este trabajo fue estudiar la presencia de mutaciones noveles o menos frecuentes como causantes de la patología. Para ello, se secuenciaron las regiones codificantes y promotoras cercanas del gen CYP21A2 en una muestra de 19 pacientes (1 C y 18 NC) que no habían sido completamente genotipificados previamente. A partir de ADN de linfocitos de sangre periférica, el gen fue amplificado por PCR, en forma diferencial del pseudogen, en 4 fragmentos y los productos analizados por secuenciación automática. Los Resultados obtenidos fueron comparados mediante programas de bioinformática con bases de datos para el genoma humano. En 5/19 pacientes se hallaron 6 mutaciones, 4 previamente descriptas: p.R443X, p.R478L, p.R483W y c.delG_2672; una mutación novel hallada anteriormente en otro paciente de nuestra cohorte -M por V en el exón 7- y una mutación novel que predice un cambio R por C en el exón 3. Para 2/5 pacientes, se comprobó la segregación alélica mediante el estudio de los ADNs parentales. Asimismo, se detectaron 5 variantes noveles en el promotor en 4 pacientes NC: g.T>C -195, g.C>G -211, g.A>G -223, g.C>G -261 y g.A>G -296, cuya posible implicancia biológica resta aún determinar. Las variantes p.K101R, p.S269T y p.N493S descriptas como polimorfismos, se hallaron en 14, 2 y 11 pacientes, respectivamente. El genotipo se ha completado en 4 pacientes: 1C y 3 NC. En 8 pacientes, sólo un alelo presenta mutación, 3 de los cuales poseen además una de las variantes noveles en el promotor. Para aquellos pacientes en que no se hallaron las 2 mutaciones es necesario investigar otras causas genéticas que pudieran explicar su fenotipo.

HEMATOLOGIA 1

- 177 (100) EFECTO IN VITRO DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE ÁCIDO HIALURÓNICO SOBRE LA DEFORMABILIDAD ERITROCITARIA.** Pistone G.¹; Urli L.²; Svetaz M.³; Luquita A.⁴; Rasia M.⁵

Cátedra de Biofísica, Facultad Cs. Médicas UNR¹ ; Sección Inmunología.Fac Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.³; Cátedra de Biofísica, Facultad Cs. Médicas. CIURN.UNR⁴ <giselapistone@hotmail.com>

Anteriormente hemos demostrado que la deformabilidad eritrocitaria (DE) es un indicador de actividad de la artritis reumatoidea (AR). Está demostrado que el ácido hialurónico (AH) sérico en pacientes artríticos se asocia a la actividad de la enfermedad. Objetivo: estudiar el efecto del AH sobre la reología eritrocitaria y analizar si es concentración-dependiente. Métodos: Se purificó el AH por cromatografía en frío. Muestras de sangre de dadores normales (consentimiento escrito) se fraccionaron en 5 alícuotas (1ml c/u), a la primera (control) se adicionó 1ml de solución de elución neutralizada, y a las restantes 1ml AH purificado en concentraciones crecientes (mg/ml): AH1:100; AH2:174; AH3:218; AH4:380. Las muestras (n=6 para todos los grupos) se incubaron 30 minutos a 37° C determinándose la concentración sérica de [AH]s por ELISA y el índice de rigidez (IR, inversa de la DE) por filtración a través de membrana nucleopore. La reversibilidad de la interacción AH-Eritrocito se determinó mediante 2 lavados con PBS y medición de IR. Análisis estadístico: test de Kruskal-Wallis y posteriormente test de Wilcoxon para datos apareados.

	Control	[AH]s 1	[AH]s 2	[AH]s 3	[AH]s 4
[AH]s mg/ml	-	50 ^a	87 ^a	108 ^a	190 ^a
IR (%)	-	(45-55)	(82-92)	(103-112)	(185-195)
	6,04	13,12 ^b	19,31 ^b	28,83 ^b	34 ^b
	(4,77-8,40)	(10,84-17,21)	(17,38-24,73)	(28,27-29,25)	(32,74-35,78)
IR(%)posterior 2 lavados PBS	6,01	5,18 ^c	5,38 ^c	5,78 ^c	8,46 ^c
	(4,75-8,46)	(4,73-6,52)	(5,59-6,06)	(4,75-5,56)	(7,47-8,72)

La tabla muestra: mediana e intervalo de confianza (IC 95%); n=6 para todos los grupos. Test Kruskal Wallis: H =27,87 p = 0,0001. Test de Wilcoxon a, b p<0,05.; c n.s. Conclusiones: los valores obtenidos indican que el AH incubado en suero de dadores normales disminuye la DE (mayor IR), siendo esta interacción concentración-dependiente y reversible por lavados. Esto avala la hipótesis de que el AH puede ser uno de los posibles causantes del deterioro reológico de los eritrocitos de pacientes con AR.

- 178 (107) APLICACIÓN DE UN ALGORITMO BASADO EN LAS ANOMALÍAS PLAQUETARIAS Y GENÉTICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS TROMBOCITOPENIAS HEREDITARIAS (TH).** Glembotsky A.¹; Marta R.²; Danielian S.³; Molinas F.⁴; Heller P.⁵

IDIM A. Lanari¹ ; Hematología Investigación, CONICET, IDIM A. Lanari, UBA²; Inmunología, Hospital JP Garrahan³; Hematología Investigación, CONICET, IDIM A. Lanari, UBA⁴ <anaglem@gmail.com>

Las TH son causadas por mutaciones en genes con roles clave en la megacariocito o trombopoyesis. Su patogenia se conoce en forma parcial y el pronóstico y tratamiento permanecen poco definidos, dada su baja prevalencia y escasez de casuísticas. El objetivo fue evaluar la utilidad de un algoritmo basado en 3 niveles: 1°) clínica; 2°) estudios de screening: volumen plaquetario medio (VPM), frotis, agregación, glicoproteínas; 3°) estudios confirmatorios: inmunofluorescencia para miosina, cariotipo, secuenciación (WASP, RUNX1,C-MPL,MYH9). Estudiamos 34 pacientes (13 familias), edad 36 (2-73)años, plaquetas 90(5-170)x10⁹/μL. Dos tercios de los pacientes presentaron trombocitopenia aislada, el resto se asoció a otras manifestaciones clínicas. La herencia más frecuente fue autonómica dominan-

te, 9/13 (70%) filias y la presentación más frecuente, la macrotrombocitopenia, 8/13 (62%) filias, seguido por trombocitopenia con VPM normal (4 filias) o microtrombocitopenia (1 filia). En base a los Resultados de los estudios de screening, se realizaron distintos estudios de mayor complejidad. En 7/13 (58%) filias se estableció un diagnóstico etiológico, cifra similar a la bibliografía, incluyendo desorden relacionado al gen MYH9 (3 filias), desorden plaquetario con predisposición a leucemia (1), Bernard-Soulier (1), trombocitopenia ligada al X por mutación del Wiskott-Aldrich (1) y PTI familiar (1). El diagnóstico fue sugerido por estudios nivel 1+2 y confirmado por nivel 3. En ningún caso se realizó diagnóstico molecular con test nivel 3, sin sospecha previa con nivel 1+2, indicando que el estudio genético sin base clínica o de laboratorio no estaría justificado. En 6/13 filias no se pudo establecer un diagnóstico etiológico, reflejando la necesidad de identificar nuevas alteraciones genéticas causales de TH. La utilización escalonada de recursos resultó útil para el diagnóstico, evitando el uso indiscriminado de estudios de alta complejidad.

- 179 (147) BÚSQUEDA DE MUTACIONES ASOCIADAS A ALTERACIONES CONFORMACIONALES DE ANTITROMBINA (AT).** Bastos L.¹; Meschengieser S.²; Woods A.³; Calderazzo J.⁴; Kempfer A.⁵; Blanco A.⁶; Lazzari M.⁷

Hemostasia y Trombosis-IIHEMA-Academia Nacional de Medicina¹ 2 3 4 5 6 7 <luisbastos@argentina.com>

Las enfermedades conformacionales son un grupo de desórdenes que resultan de la inestabilidad de proteínas, convirtiendo moléculas activas en latentes o inactivas. Los cambios en la conformación de AT, inhibidor fisiológico fundamental de la coagulación, se asocian a trombosis. Condiciones como el aumento de la temperatura corporal asociado a infecciones, podrían causar el cambio conformacional. Objetivo: Las alteraciones conformacionales no suelen alterar significativamente la actividad funcional de AT, pasando así inadvertidas en el estudio de trombofilia. Nos propusimos investigar su presencia, mediante análisis genético, en sujetos jóvenes con trombosis venosa espontánea, asociada a infecciones y sin defectos trombofílicos congénitos o adquiridos detectados. Materiales y Métodos: En 18 pacientes seleccionados, se amplificaron 3 exones (3B, 4 y 6) relacionados con alteraciones conformacionales. La búsqueda de las mutaciones se realizó mediante la técnica de heteroduplex, excepto para el exón 4, el cual fue secuenciado directamente. Resultados: Heteroduplex. Se utilizó esta técnica en el análisis de los exones 3B y 6. En uno de los 18 pacientes, se observó un patrón electroforético diferente al normal para ambos exones. Secuenciación. A pesar del heteroduplex alterado la secuencia de los exones 3B y 6 fue normal. El análisis del exón 4 mostró dos cambios de bases silenciosos, G7596A (12GG; 4GA; 2AA) y G7626A (8GG; 6GA; 4AA), ambos polimorfismos reportados como 295V y 305Q respectivamente y no-asociados a trombosis. Conclusiones: Hasta el presente ningún paciente mostró algún defecto molecular relacionado con la presencia de AT inestables. A pesar de la aparente baja prevalencia, se justificaría la búsqueda de alteraciones de AT asociadas a moléculas inestables, en pacientes con trombosis venosa, sin defectos trombofílicos detectados.

- 180 (264) ESTUDIO DE LA FORMA Y DE LA FRAGILIDAD OSMÓTICA ERITROCITARIA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIFERENTES DIETAS HIPERLIPÉMICAS.** Crosetti D.¹; Dominighini A.²; Gonzalez J.³; Monti J.⁴; Ronco M.⁵; Carnovale C.⁶; Luquita A.⁷

Facultad de Ciencias Médicas¹; Cát. Biofísica. Facultad de Ciencias Médicas. UNR.² 3; Cát. Fisiología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.⁴ 5; 2Cát. Fisiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR; CONICET⁶; Cát. Biofísica, Fac. Cs. Médicas-CIURN. UNR⁷ <crosettidiego@hotmail.com>

Numerosos autores observaron un aumento de fragilidad eritrocitaria y de formas estomatocíticas al incubar hemáties en un medio rico en colesterol y también en cobayos alimentados

con dietas hipercolesterolémicas. Analizamos los efectos de diferentes dietas hiperlipémicas sobre la forma y la resistencia osmótica eritrocitaria. Ratas Wistar macho endocriadas ($n=24$), de 70 días de edad, se separaron en 3 grupos y fueron alimentadas con: 1-dieta estándar (C); 2-"dieta estándar" adicionada con 15% de "jugo bovino" (cada 100g: 1,2g de colesterol (Co), 1,06g de grasa total y 6,8g de proteínas)(D1); 3- "dieta estándar" adicionada con Co (97% de pureza) 8g/kg de dieta y aceite de maíz 28% (peso/peso dieta) (D2). Se anestesiaron, obteniéndose sangre por punción cardíaca. Forma eritrocitaria (distinción de formas por microscopía y cálculo del Índice Morfológico (IM). Fragilidad osmótica: incubándose 30 minutos a 25 °C, en soluciones de NaCl (entre 0 y 290 mOsm/kg). Se determinaron fotocolorimétricamente los porcentajes de hemólisis y se calcularon: X50 ([NaCl] que produce 50 % de hemólisis) y b (homogeneidad de la población). Resultados: (media \pm ES): Co plasmático (mg%): C: 85,99 \pm 3,29, D1: 77,17 \pm 2,61ns; D2: 104,87 \pm 2,39**; IM: C: -0,492 \pm 0,041; D1: -1,397 \pm 0,111**; D2: -2,458 \pm 0,122** Estomatocitos III (%) C: 2,73 \pm 1,07; D1: 10,75 \pm 3,01*; D2: 42,17 \pm 5,63*. X50: C: 0,45 \pm 0,01; D1: 0,52 \pm 0,03*; D2: 0,49 \pm 0,06*; b: C: 11,88 \pm 0,26; D1: 9,89 \pm 0,42*; D2:10,09 \pm 0,45*; (** $p<0,001$ vs. C);(* $p<0,05$ vs. C);ns (no significativo). Ambas dietas provocan un aumento de fragilidad osmótica eritrocitaria y un cambio de forma de discocito a estomatocito. Con D2 se observó mayor incremento de estomatocitos III que con D1. Esto evidenciaría que el aumento de Co plasmático obtenido con D2, cambia la curvatura eritrocitaria.

181 (346) ESTUDIO DE LA LIBERACIÓN DE FACTOR VON WILLEBRAND (VWF) PRODUCIDA POR DESMOPRESINA (DDAVP) EN MODELOS MURINOS, "IN VIVO" E "IN VITRO". Powazniak Y.¹; Zapata V.²; Kempfer A.³; Calderazzo J.⁴; Alonso D.⁵; Lazzari M.⁶; Sánchez-luceros A.⁷

Academia Nacional de Medicina (Buenos Aires)^{1 2 3 4} ; Universidad Nacional de Quilmes⁵ ; Academia Nacional de Medicina (Buenos Aires)^{6 7} <yainapowazniak@gmail.com>

En humanos, la hormona vasopresina y su análogo DDAVP aumentan los niveles plasmáticos de VWF. DDAVP es utilizada como un agente hemostático en el tratamiento de VWD. Se han propuesto diferentes modelos experimentales para el estudio de la VWD, entre ellos modelos murinos que presentan una condición clínica de VWD tipo 3, con una respuesta positiva a DDAVP. Nuestro objetivo fue evaluar la respuesta a DDAVP en una cepa de ratones normales, para definir un futuro modelo de estudio. Objetivos: Evaluar si la infusión de DDAVP induce la liberación de VWF en un modelo murino, in vivo e in vitro. Metodología: Se utilizaron ratones C57 de 8 semanas. Los animales fueron divididos en dos grupos: 1) control con solución fisiológica (SF) ip (C); 2) tratados con 100ng DDAVP ip (D). Se tomaron las muestras de sangre a los 30, 60 y 120 m de la inoculación. Para el estudio in vitro, se utilizaron células endoteliales de pulmón de la cepa C57 obtenidas por la técnica de magnetic cell sorting utilizando el anticuerpo anti-LSEC. Las CE fueron incubadas con 0.1 μ M de DDAVP (D) o SF (C). Luego de 30, 60 y 120 m se recolectó el sobrenadante. Se determinó VWF:Ag por la técnica de ELISA. Resultados: Estudio in vivo. VWF:Ag C30: 10%, D30: 11%, C60: 12%, D60: 12%, C120: 11%, D120: 12%. Estudio in vitro. VWF:Ag C30: 22%, D30: 17%, C60: 21%, D60: 20%, C120: 19%, D120: 21%. No se encontraron diferencias significativas entre los controles y los tratamientos tanto en el modelo in vivo, como in vitro. Discusión: Lewis B y col. (1992) y Bernat A y col. (1997) han descrito la falta de respuesta hemostática a la terapia con DDAVP en ratas y cerdos normales. Nuestros Resultados, teniendo en cuenta la relación cercana de especies entre ratas y ratones, coinciden con las observaciones citadas, ya que la cepa de ratón C57 no responde al DDAVP. En la investigación de VWD y la respuesta a DDAVP, es necesario valorar otras especies animales como modelo de estudio.

182 (577) CALPAÍNA COMO FACTOR INTERMEDIARIO ENTRE LA ERITROPOYETINA Y LA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASA 1B. Callero M.¹; Vota D.²; Chamorro M.³; Vittori D.⁴; Nesse A.⁵

Departamento de Qca Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{1 2 3 4 5} <mcallero@qb.fcen.uba.ar>

La Proteína Tirosina Fosfatasa 1B (PTP1B) es una proteína involucrada en la atenuación de la vía de señalización de la eritropoyetina (Epo). Previamente, hemos demostrado que PTP1B es regulada positivamente por Epo en la línea celular eritroide UT-7, cuyo crecimiento depende totalmente de este factor de crecimiento. En este trabajo se estudió la modulación de esta fosfatasa en células UT-7 inducidas a hemoglobinización y en células TF-1, que responden a IL-3, GM-CSF y Epo. En ambas, se encontró, una regulación de PTP1B similar a la observada en las células UT-7 indiferenciadas a nivel de ARNm (PCR en tiempo real) pero a nivel proteico (Western blotting y citometría de flujo) no se observó disminución en el nivel de PTP1B en las células privadas de Epo o aumento de ella en las células estimuladas con este factor de crecimiento, sugiriendo que esta fosfatasa sería más resistente a degradación que en las células UT-7 indifereenciadas. Sin embargo, tanto en las células UT-7 hemoglo-binizadas como en las TF-1 cultivadas en presencia de Epo de forma continua se detectó una forma adicional de la fosfatasa de peso molecular (46 kDa), distinta de la isoforma de membrana (50 kDa) y de la isoforma citosólica (42 kDa). Mediante fraccionamiento subcelular se determinó que la isoforma de 46 kDa permanece unida a la membrana del retículo endoplasmático, sugiriendo que proviene del clivaje de la isoforma de mayor peso molecular. Teniendo en cuenta que, en otros tipos celulares, se ha descrito a la PTP1B como sustrato fisiológico de la calpaína, se investigó su papel en esta regulación de PTP1B por Epo, mediante un protocolo de inhibición (calpeptina) y activación (ionóforo A23187) de esta proteasa calcio dependiente. De esta forma se concluyó que calpaína es el intermediario entre la Epo y la PTP1B en las células UT-7 diferenciadas y TF-1.

183 (619) ERITROPOYETINA CARBAMILADA. EVIDENCIAS DE SU ACCIÓN NEUROPROTECTORA PERO NO ERITROPOYÉTICA. Chamorro M.¹; Vittori D.²; Vota D.³; Wenker S.⁴; Nesse A.⁵

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{1 2 3 4 5} <mauge_chamorro@hotmail.com>

La eritropoyetina recombinante humana tiene reconocida eficacia para el tratamiento de anemia. Sin embargo, 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 carbamilado (cEpo), el cual no actuaría como factor eritropoyético pero tendría actividad antiapoptótica sobre otros tipos celulares. Anteriormente, hemos demostrado que cEpo no permite sostener el crecimiento y la viabilidad de las células con capacidad de diferenciación eritroide UT-7, dependientes de Epo para su supervivencia; mientras que cEpo mantuvo su acción antiapoptótica frente a staurosporina en la línea neuronal SH-SY5Y. Para ampliar el conocimiento de la función de cEpo, se estudió su efecto en otros modelos celulares. Se observó que la presencia de Epo y no así la de cEpo, estimula el desarrollo de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E), cultivadas a partir de células de médula ósea de ratones BALB (Sin/Epo 50 \pm 2,9; Epo 74 \pm 3,8; cEpo 46 \pm 2,1, expresados por 104 células; Epo vs. S/Epo $P<0,05$; cEpo vs. S/Epo, NS, $n=3$). Siguiendo con el linaje eritroide, se estudió el efecto de cEpo en las células K562 sometidas a diferenciación eritroide con hemina (H), frente a la acción apoptótica del TNF- α (HT). A diferencia de Epo, cEpo no inhibió el efecto negativo del TNF- α , detectándose un aumento de apoptosis (Hoechst) reflejado en una disminución significativa de la viabilidad celular (MTT) (HT 71 \pm 4%; EpoHT 104 \pm 10%; cEpoHT 66 \pm 4%, expresado como porcentaje del

control (H); cEpoHT vs. HT, NS, n=4). Sin embargo, en la línea de origen neuronal SH-SY5Y la exposición frente a TNF- α mostró un comportamiento neuroprotector de cEpo, manteniendo la viabilidad celular (T 53 \pm 5%; EpoT 97 \pm 5%; cEpoT 116 \pm 7%, cEpoT vs. EpoT, NS, n=3). Los Resultados aportan nueva información acerca de la capacidad diferencial de la eritropoyetina modificada cEpo como factor neuroprotector no eritropoyético.

184 (620) ERIPTOSIS INDUCIDA POR MEDIADORES INFLAMATORIOS. Vota D.¹; Callero M.²; Crisp R.³; Chamorro M.⁴; Nesse A.⁵; Vittori D.⁶

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA^{1 2 3 4 5 6} <daiana_vota@qb.fcen.uba.ar>

Eriptosis es un proceso por el cual los glóbulos rojos (GR), bajo ciertas circunstancias, presentan características fenotípicas asociadas a la muerte celular programada de células nucleadas, a pesar de no poseer núcleo ni organelas. En este trabajo estudiamos el desarrollo de eriptosis por exposición de GR humanos a mediadores proinflamatorios como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , peróxido de hidrógeno y nitritos. Previamente observamos apoptosis por acción de citoquinas proinflamatorias en células K562. Estas citoquinas, sin embargo, no indujeron exposición de fosfatidil serina en la membrana plasmática del GR (incubación por 24 h), detectada por la unión de Anexina V (citometría de flujo). Los nitritos, en combinación con peróxido de hidrógeno (NO+PH), provocaron la traslocación del fosfolípido de membrana (C:1, 8 \pm 0,6%; T: 4,9 \pm 1,8%; IL-1: 5,0 \pm 4%; IFN: 3,5 \pm 2,5%; NO+PH: 71,6 \pm 27,3%; NO+PH vs. C, P<0,05, n=4), la formación de metaHb y el incremento de hemólisis. El ingreso masivo de calcio a las células por acción del ionóforo A23187 provocó efectos similares sobre la membrana (96,2 \pm 3,1%, ICa vs. C, P<0,05, n=4) y hemólisis. La determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por citometría de flujo (oxidación de diacetato de 2',7'-dichlorofluoresceína) mostró un aumento de 2,5 veces (n=3) con respecto al control cuando se incubaron los GR en presencia de NO+PH, mientras que no se detectaron ROS por modificación del flujo de calcio. Los Resultados permiten sugerir un mecanismo de eriptosis que involucra un proceso de estrés oxidativo en presencia de mediadores inflamatorios. Debido a que en cuadros inflamatorios que acompañan a la anemia de enfermedades crónicas los niveles de nitritos se encuentran elevados, los datos obtenidos sugieren que los mediadores inflamatorios pueden no sólo contribuir a la producción de anemia actuando sobre los progenitores eritroides sino también produciendo un efecto directo sobre los GR.

185 (679) MODULACIÓN DE LOS EFECTOS CITOTÓXICOS DEL ARSENITO DE SODIO POR INHIBIDORES DEL NF-KB EN LA LÍNEA PROMONOCÍTICA HUMANA U937. Lombardo T.¹; Cavaliere V.²; Papademetrio D.³; Costantino S.⁴; Scarlato E.⁵; Hajos S.⁶; Álvarez E.⁷; Blanco G.⁸

IDEHU-CONICET-Cátedra de Inmunología-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA^{1 2 3 4}; Servicio de Toxicología-Hospital de Clínicas -UBA⁵; IDEHU-CONICET-Cátedra de Inmunología-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA^{6 7 8} <tlombardo@ffy.uba.ar>

El Arsénico en su forma 3+(ej. AsNa) mostró eficacia en el tratamiento de Leucemia Promielocítica pero la aparición de resistencia farmacológica y efectos adversos limitan una aplicación más difundida y eficaz. Los inhibidores de NF-kB como el Ácido Cafein-fenil-etil-éster (CAPE) y el péptido, inhibidor del proteasoma, MG132 han sido propuestos como drogas sensibilizantes. Nuestro objetivo fue determinar, mediante el uso de Isobologramas y Coeficientes de Interacción (CI), la presencia de sinergismo, antagonismo o aditividad en combinaciones AsNa-MG132 y AsNa-CAPE. Para esto las células de línea promonocítica U937 se expusieron separadamente a un rango de 7 dosis por triplicado de AsNa, MG132 y CAPE durante 72h a 37°C. Se determinó el porcentaje de muerte con Fluoresceína Diacetato

(FDA) y Ioduro de Propidio (IP) con un posterior análisis por citometría de flujo. La Dosis Letal 50 (DL50) se calculó por regresión lineal logarítmica para las 3 drogas. Con estos datos se construyeron isobologramas para determinar la DL50 teórica de las combinaciones y se definió la proporción relativa de cada droga a utilizar en los ensayos combinados. Luego se expusieron las células a un rango de 7 dosis por encima y debajo de la DL50 teórica por triplicado para cada combinación, evaluándose la muerte celular con FDA-IP por citometría de flujo. Las DL50 de AsNa, MG132 y CAPE fueron 7,37 μ M, 2,13 μ M y 254 μ M respectivamente. Las pendientes de regresión fueron m=0.68 m=1.51 y m=7.17 sugiriendo distintos mecanismos citotóxicos entre las 3 drogas y especialmente entre CAPE y MG132. El CI entre AsNa y MG132 varió de 0,83 (DL10) a 0,46 (DL90) indicando un marcado sinergismo entre las dos drogas, mientras que el CI entre AsNa y CAPE estuvo entre 2,17 y 1,19 indicando antagonismo. Concluimos que sólo MG132 resultó sinérgico con AsNa mientras que CAPE mostró antagonismo sugiriendo que la combinación AsNa-MG132 sería la más promisoría para mejorar el tratamiento de Leucemia Promielocítica.

186 (788) LA HOMOCISTEÍNA-TIOLACTONA (HTL) MODIFICA LA ESTRUCTURA Y CINÉTICA DE FORMACIÓN DE LA RED DE FIBRINA. Genoud V.¹; Rovetta A.²; Ugarriza M.³; Quintana I.⁴

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{1 2 3 4} <valgen@qb.fcen.uba.ar>

La HTL forma aductos entre su grupo carbonilo y el e-NH2 de los aminoácidos básicos de las proteínas. El objetivo fue evaluar el efecto de la HTL sobre fibrinógeno y la red de fibrina. Se estudió la cinética de formación de fibrina a partir de un pool de plasmas humanos incubados (37°C, 24hs) con soluciones de HTL (100, 500 y 1000 μ M). Se monitoreó la absorbancia a 405 nm en función del tiempo, a partir del agregado de CaCl2 20 mM y trombina 0,05UI. La estructura de las redes se observó por microscopía de campo oscuro. Se incubó fibrinógeno purificado con HTL (relación molar 1:100). Se utilizaron como controles las correspondientes incubaciones con buffer fosfato salino. El fibrinógeno se evaluó por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE nativa y desnaturizante), e inmunoelectroforesis cruzada (IEC). Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Los parámetros de fibrinoformación (tiempo de inicio de coagulación, velocidad de formación de fibrina y densidad óptica máxima) mostraron diferencias dosis dependiente respecto del control. Para la concentración de HTL 1000 y 0 μ M, los Resultados (media y desvío estándar) son respectivamente: tiempo de inicio=19,30 \pm 0,88 y 11,58 \pm 0,22 min; velocidad de formación =0,044 \pm 0,005 y 0,087 \pm 0,004 min⁻¹; densidad óptica máxima=0,884 \pm 0,009 y 0,939 \pm 0,011 (diferencias significativas, p=0,014). La microscopía de campo oscuro mostró que la fibrina obtenida a partir de plasma incubado con HTL 1000 μ M presentó fibras más finas y redes más compactas y ramificadas que el control. La evaluación del fibrinógeno por PAGE nativa, mostró DRf (Rf muestra- Rf control) =1,5 mm. En PAGE desnaturizante no se observaron diferencias. En IEC se observó corrimiento anódico, DRf=3 mm. La HTL afecta la estructura y cinética de formación de fibrina. Los cambios observados podrían deberse a modificaciones en el fibrinógeno. Estas alteraciones estarían implicadas en los efectos aterotrombóticos de la hiperhomocisteinemia.

187 (793) EXPRESION DE LOS GENES BCR-ABL Y HOXA⁹ EN EL SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (LMC). Tedeschi F.¹; Cardozo M.²; Zalazar F.³

Laboratorio Cátedra Profesional; Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas; UNL¹; Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral^{2 3} <tedeschi@fcb.unl.edu.ar>

En general, se observa que los pacientes con LMC, luego de varios años en una fase crónica, evolucionan a una crisis blástica. El aumento de la expresión de bcr-abl en esta crisis promovería otras alteraciones genéticas. Otros genes implicados, aparentemente, en la transformación mieloide, son los genes HOX. Una de sus proteínas resultantes, HoxA9, es un regulador clave en la hematopoyesis, induce expansión de células madre y bloquea la diferenciación mieloide. Nos propusimos evaluar los niveles de los transcritos bcr-abl y HoxA9 durante el seguimiento de pacientes con LMC. Se purificó ARN de leucocitos de pacientes con LMC. Los transcritos bcr-abl, HoxA9 y abl fueron amplificados in vitro por RT-PCR. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis. La intensidad de las bandas fue evaluada por densitometría. Los niveles de expresión de los genes HoxA9 y bcr-abl fueron graficados como expresión relativa a la del gen constitutivo abl. Observamos dos diferentes situaciones: a) Pacientes en Fase Crónica estable (con Índice de Sokal bajo), sin diferencias significativas en los niveles de expresión de bcr-abl y HoxA9 y b) Pacientes que no respondieron al tratamiento instaurado (con Índice de Sokal Alto), con incrementos en los niveles tanto de bcr-abl como de HoxA9 ($p < 0.05$). Estos Resultados pondrían de manifiesto un fenómeno biológico real, aportando datos para evaluar el impacto de la sobreexpresión simultánea de ambos genes en la evolución de la LMC.

INMUNOLOGÍA 4

- 188 (115) EFECTOS DE LA ANESTESIA GENERAL EN EL NIVEL DE CORTISOL, ESTALLIDO RESPIRATORIO DE LOS NEUTRÓFILOS Y POBLACIONES LINFÓIDES EN PACIENTES DE COLECISTECTOMÍA LAPAROSCÓPICA.** Graziola E.¹; Elena G.²; Harvey G.³; Colucci D.⁴; Puig N.⁵

Hospital Italiano Garibaldi¹; Carrera de Anestesiología. Facultad de Cs. Médicas. UNR.^{2,3}; Instituto de Inmunología. Facultad de Cs. Médicas. UNR.⁴; Instituto de Inmunología, Carrera de Anestesiología y Carrera del Investigador. Facultad de Cs. Médicas. UNR.⁵ <inmunestesia@yahoo.com.ar>

La colecistectomía laparoscópica (CL) ofrece ventajas clínicas sobre la colecistectomía tradicional. A pesar de una herida menor, la respuesta sistémica se activa. Este estudio en pacientes de CL, aprobado por el Comité de Bioética, Facultad Ciencias Médicas UNR, evalúa la influencia de dos regímenes anestésicos sobre elementos de la respuesta de fase aguda. Se evaluaron doce pacientes (ASA I, 21-65 años) para CL electiva con técnica de cuatro trócares a las 7.30 a.m. La anestesia fue inducida con propofol y mantenida con fentanilo-isoflurano (grupo inhalatorio, INH) o con propofol-remifentanilo (grupo Anestesia endovenosa AE). Se evaluó nivel de cortisol, metabolismo oxidativo de los neutrófilos antes y después del estímulo con PMA y subpoblaciones linfoides (citometría de flujo). Las muestras de sangre fueron tomadas antes de la anestesia (AA), en el intraoperatorio, una hora después del comienzo de la anestesia (IO) y dos horas del postoperatorio (PO). La evaluación estadística se realizó por pruebas no paramétricas. En INH, se verificó un pico de cortisol en el intraoperatorio, (media±de, ng/ml): AA 215±66; IO 330±72 ($p < 0,05$); PO 199±97; AE: AA: 191±102; IO: 171±104, PO: 236±87. En el intraoperatorio, INH vs AE, $p < 0,05$. En ambos grupos los recuentos de leucocitos, de neutrófilos ($p < 0,05$) y de células estimuladas por PMA ($p = 0,043$), aumentaron en el PO, mientras los CD3+ cayeron en el PO sin diferencias entre métodos anestésicos. En INH se observó un pico de NK (CD3-CD16+CD56+) en el IO y de LT activados (CD3 + CD4 + CD25 +) en el PO, significativamente superiores a AE ($p < 0,05$ en ambos casos). Así, se conserva la funcionalidad de los neutrófilos para ambas técnicas anestésicas, mientras que en INH se verifican cambios moderados de los niveles de cortisol, de células NK y de linfocitos activados. Los Resultados presentes indicarían que en ambos procedimientos anestésicos la CL no causa cambios severos de fase aguda, atribuibles a una respuesta autonómica adecuada.

- 189 (683) EFECTO DEL ESTRÉS QUIRÚRGICO SOBRE EL SISTEMA INMUNE Y ENDÓCRINO EN HIPOCAMPO DE RATAS WISTAR.** Bassi S.¹; Cassano P.²; Rios M.³; Argibay P.⁴

Instituto de Ciencias Básica y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires^{1 2 3 4} <sabrinac.bassi@hospitalitaliano.org.ar>

Se ha observado que luego de cirugías invasivas algunos pacientes presentan deficiencias cognitivas como pérdida de memoria, cambios de la función intelectual y del comportamiento. Por otra parte, existe evidencia de un aumento de citoquinas proinflamatorias en suero de pacientes luego de distintos tipos de intervención quirúrgica. Este aumento podría deberse al estrés que genera la cirugía. A su vez el estrés ejerce una activa participación en la regulación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). Los receptores de glucocorticoides (GR y MR) parecen ser regulados frente a situaciones estresoras. Hipótesis: las deficiencias cognitivas podrían deberse a un aumento en las citoquinas cerebrales o a una desregulación de GR y MR en el hipocampo debido al estrés de la cirugía. Objetivo: investigar la expresión de citoquinas y receptores de glucocorticoides en el hipocampo de ratas Wistar 24 horas después de una cirugía abdominal invasiva. Metodología: se extrajo ARN del hipocampo de rata mediante el método de TRIzol y se analizó la expresión de los genes IL6, IL6R, IL1a, IL1b, TNF α , TNF α R, GR y MR mediante PCR en tiempo real en animales sometidos a la cirugía con anestesia, animales sólo con anestesia y animales naive. Resultados: No hubo diferencias significativas en la expresión de IL1a, IL1b, TNF α , TNF α R, IL6R y MR entre los controles, los controles de anestesia y las ratas operadas. Se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la expresión de GR en las ratas operadas con respecto a los controles. Para el gen IL6 se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) debido a la anestesia. Conclusión: El estrés ocasionado por la cirugía invasiva es capaz de producir alteraciones en el eje HPA pero no en las citoquinas pro inflamatorias. Sin embargo, existe un aumento de IL6 debido a la anestesia; los datos obtenidos se correlacionan con lo observado en humanos periféricamente por lo tanto estos cambios podrían jugar un rol en los trastornos cognitivos.

- 190 (413) MODULACIÓN DOPAMINÉRGICA DE LA SECRECIÓN DE INTERLEUKINA 8 EN QUERATINOCITOS HACAT.** Parrado A.¹; De León R.²; Apicella C.³; Gentile M.⁴; Rey-rolán E.⁵

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr RA Margni, CONICET.^{1 2 3 4 5} <erey@ffyub.uba.ar>

El neurotransmisor dopamina (DA) es una catecolamina con efectos moduladores en el sistema inmune. Está implicada en la cicatrización de la piel. Los queratinocitos epidermales sintetizan y expresan receptores para catecolaminas y también producen citoquinas quimioattractantes y con acción proliferativa como IL-8 e IL-6. Previamente demostramos que la DA estimula la secreción de IL-6 en queratinocitos, efecto mediado fundamentalmente por receptores β -adrenérgicos. En este trabajo evaluamos el efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la secreción de IL-8 (ELISA) y la proliferación celular (reacción colorimétrica con WST-1) en queratinocitos HaCaT, línea celular humana no tumoral. El estudio se realizó en presencia/ausencia de antagonistas de los receptores α , β -adrenérgicos y dopaminérgicos y de ácido ascórbico (antioxidante). Observamos que la Dopamina (10^{-5} y 10^{-4} M) estimuló significativamente la producción de IL-8 luego de 24 hrs de incubación, tanto en presencia como en ausencia del antioxidante, sin alterar la proliferación celular (IL-8, DA 10^{-5} M: 193.0±23.0%, $p < 0.01$). El efecto estimulador de DA sobre IL-8 fue bloqueado significativamente por Propranolol, antagonista β -adrenérgico (DA 10^{-5} M + Propranolol 10^{-5} M: 141.2 ±10.9%, ns vs control). Por el contrario, no se observó efecto bloqueante con Sulpirida o Haloperidol (antagonistas dopaminérgicos) ni tampoco con Fentolamina (antagonista β -adrenérgico). Cabergolina, agonista dopaminérgico tipo D2, también incrementó significa-

tivamente la secreción de IL-8 (10-5M: $132.1 \pm 4.3\%$, $p < 0.01$), efecto que fue bloqueado parcialmente por Sulpirida. Entre los antagonistas dopaminérgicos evaluados sólo Haloperidol 10^{-4} M disminuyó significativamente la proliferación celular y la secreción de IL-8. Nuestros Resultados sugieren que los agonistas dopaminérgicos estimulan la producción de IL-8 en queratinocitos principalmente a través de receptores β -adrenérgicos y probablemente por dopaminérgicos.

191 (520) EXISTE DESREGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL EN LA DEPRESIÓN?. Bassi S.¹; Faccioli J.²; Fainstein Day P.³; Finkelsztein C.⁴; Argibay P.⁵

Instituto de Ciencias Básica y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires¹ ; Servicio de Psiquiatría del Hospital Italiano de Buenos Aires² ; Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Medicina Nuclear del Hospital Italiano de Buenos Aires³ ; Servicio de Psiquiatría del Hospital Italiano de Buenos Aires⁴ ; Instituto de Ciencias Básica y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires⁵ <sabrinas.bassi@hospitalitaliano.org.ar>

Se considera que la desregulación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) podría ser importante en el origen de la depresión mayor (MDD). Se ha reportado una relación entre la desregulación del eje HPA y la severidad, rasgos psicóticos, ansiedad, duración del episodio, cronicidad y número de episodios previos. Por otra parte, se ha observado que durante la fase aguda los pacientes deprimidos presentan hipercortisolemia. Bajo la hipótesis de que el tratamiento antidepressivo debería normalizar la actividad del HPA, el objetivo del trabajo es evaluar si existe una hipersecreción de cortisol en la enfermedad depresiva, si estos niveles disminuyen con el tratamiento con un antidepressivo dual y si se correlaciona con el mejoramiento clínico. Se han evaluado 6 pacientes antes y después del tratamiento. Los mismos fueron evaluados psiquiátricamente por escalas HDRS y MINI. Se recolectó la muestra de saliva a las 23 hs del día 0 y del día 42 de tratamiento y se midió el cortisol libre por radioinmunoensayo. Sólo 1 de los 6 pacientes presentó niveles de cortisol fuera del rango normal. Sin embargo, los niveles de cortisol de los 6 pacientes disminuyeron significativamente ($p < 0.01$) en un 50% luego del tratamiento. Este resultado se correlaciona con una disminución significativa ($p < 0.01$) del 69% en la escala de evaluación psiquiátrica luego del tratamiento (50% de disminución indica tratamiento efectivo). A diferencia de lo observado en otros trabajos, los pacientes estudiados no presentan hipersecreción de cortisol en la fase aguda de la depresión demostrando que su medición no podría utilizarse como marcador bioquímico de la enfermedad. Sin embargo, la mejora clínica se vio acompañada por una disminución en los niveles de cortisol en todos los casos. Podemos concluir que en estos pacientes la desregulación del eje HPA no se es evidente al inicio de la depresión pero su disminución contribuiría al mejoramiento clínico de los pacientes.

192 (167) ESTEROIDES ADRENALES Y SU EFECTO SOBRE LA FRECUENCIA DE CÉLULAS ESPECÍFICAS PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS EN PACIENTES COINFECTADOS CON HIV Y TUBERCULOSIS QUE CURSAN SÍNDROME DE RECONSTITUCIÓN INMUNE. Quiroga M.¹; Angerami M.²; Ameri D.³; Sued O.⁴; Salomon H.⁵; Bottasso O.⁶

Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA^{1 2} ; Hospital General de Agudos Juan A. Fernandez^{3 4} ; Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA⁵ ; Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR, Rosario, Argentina⁶ <fquiroga@fmed.uba.ar>

Múltiples trabajos han mostrado un desbalance en el perfil inmunoendócrino tanto en HIV como en tuberculosis (TB), pero aún no se ha explorado este aspecto en pacientes coinfectados (HIV-TB). En un 20% de estos pacientes se presenta una respues-

ta inflamatoria exacerbada, el Síndrome de Reconstitución Inmune (SRI), cuyas bases aún no están dilucidadas. Como las hormonas adrenales regularían la inmunidad celular, en este trabajo investigamos el rol de cortisol y dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la modulación de respuestas Th1 contra M. tuberculosis (Mtb) en individuos con HIV-TB, SRI y HIV+. Los pacientes con SRI presentaron niveles plasmáticos significativamente disminuidos de DHEA-sulfato (DHEA-s) en comparación con individuos HIV-TB y HIV+, mientras que los niveles de DHEA fueron mayores en pacientes HIV+ respecto a los grupos HIV-TB y SRI. No se observaron diferencias entre grupos en los niveles de cortisol. Se encontró una correlación positiva entre el recuento absoluto de LT CD4+ y la concentración sérica de DHEA-s en pacientes HIV-TB, sugiriendo una relación entre la concentración de dicha prohormona y el status inmune en dichos pacientes. Al estimular células periféricas mononucleares con Mtb sonicado, los pacientes con SRI mostraron la mayor frecuencia de células Mtb-específicas IFN- γ + (ELISPOT), seguidos por los individuos HIV-TB, siendo los pacientes HIV+ los que presentaron la menor frecuencia de células Ag-específicas. El agregado in vitro de cortisol disminuyó la frecuencia de células Mtb-específicas en todos los grupos. El tratamiento con DHEA incrementó la frecuencia de células Ag-específicas solo en pacientes con HIV-TB, sin contrarrestar el efecto inhibitorio del cortisol. Los datos aquí mostrados señalan la importancia del eje adrenal en la respuesta inmune a Mtb, aportando herramientas para el desarrollo en un futuro cercano de estrategias de intervención inmunológica en pacientes coinfectados con TB-HIV.

193 (212) MODIFICACIONES DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN ERITROCITOS SENESCENTES. Ensínck M.¹; Mufarrege N.²; Rucci A.³; Racca L.⁴; García Borrás S.⁵; Cotruello C.⁶; Biondi C.⁷; Racca A.⁸

Laboratorio de Inmunoematología. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR^{1 2 3 4 5} ; Laboratorio de Inmunoematología. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; CONICET⁶ ; Laboratorio de Inmunoematología. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR⁷ ; Laboratorio de Inmunoematología. Área Inmunología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR; CIUNR⁸ <mensinck@fbioyf.unr.edu.ar>

Debido a que los glóbulos rojos (GR) maduros son incapaces de sintetizar proteínas, se considera que alteraciones conformacionales y/o químicas en proteínas pre-existentes, producen cambios reconocibles en la superficie de la membrana. Las modificaciones de la principal proteína eritrocitaria banda 3, conducen a la exposición de un antígeno de senescencia implicado en la remoción selectiva de los GR senescentes (GRSe). El objetivo de este trabajo fue estudiar las modificaciones estructurales y oxidativas de las proteínas de membrana en poblaciones de distintas edades: GRSe y GR jóvenes (GRJ). Muestras de sangre periférica (n=15) de donadores voluntarios fueron centrifugadas en gradientes de Percoll para obtener poblaciones de GRSe y GRJ. Se prepararon las membranas eritrocitarias por lisis osmótica y se solubilizaron en buffer con SDS. Las proteínas se analizaron por SDS-PAGE. La estimación de la oxidación de las proteínas se realizó midiendo los grupos carbonilos por ELISA. La banda 3 se determinó por inmunoblotting. Las suspensiones eritrocitarias fueron incubadas con anti-IgG humana marcada con Alexa 488 y observadas por microscopía confocal. La densitometría de los gels no mostró cambios en el patrón de bandas entre ambas poblaciones eritrocitarias. El análisis de la oxidación de las proteínas demostró un aumento estadísticamente significativo en las suspensiones de GRSe (GRSe: 0.58 ± 0.09 nmoles/mg prot vs GRJ: 0.19 ± 0.05 ; $p < 0.01$). En el inmunoblotting se observaron diferencias significativas en la proteína banda 3 (GRSe: 88.3 ± 15.4 vs GRJ: 58.2 ± 10.2 ; $p < 0.05$) y sus productos de degradación (22.1 ± 5.8 vs 17.0 ± 5.2 ; $p < 0.05$). Por microscopía confocal observamos la presencia de IgG en los GRSe, mientras que los GRJ no presentaron imágenes de fluorescencia. Los Resultados obtenidos demuestran modificaciones en las proteínas de membrana durante

el envejecimiento eritrocitario y confirman la participación de IgG autóloga en el reconocimiento y remoción selectiva de los GRSe.

194 (603) CLONADO Y EXPRESIÓN DE ALERGENOS DE SOJA RECOMBINANTES. IDENTIFICACIÓN DE PEPTIDOS INMUNODOMINANTES DE REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA Y SOJA. Curciarelo R.¹; Candreva A.²; González V.³; Smaldini P.⁴; Fossati C.⁵; Parisi G.⁶; Petruccelli S.⁷; Docena G.⁸

LISIN; CIDCA^{1 2}; Unidad de Físicoquímica, Centro de Estudios e Investigaciones(UNQ).³; LISIN^{4 5}; Unidad de Físicoquímica, Centro de Estudios e Investigaciones (UNQ).⁶; CIDCA⁷; LISIN; CIDCA⁸ <curciarelo@biol.unlp.edu.ar>

La alergia a leche de vaca (ALV) constituye la principal alergia alimentaria que afecta a la población pediátrica argentina y de otras regiones. Además el 40% de los pacientes presentan reacciones adversas al tratamiento sustitutivo con fórmulas que contienen soja (S). A fin de estudiar la reactividad cruzada (RC) entre ambos sistemas y explicar la intolerancia clínica, se clonaron 4 alérgenos de S: A4A5B3, subunidad α de la β -conglucina, p34 y p28. Se evaluó su reactividad por diferentes métodos inmunoenzimáticos empleando antisueros policlonales y mAb específicos de caseínas bovinas, o sueros de individuos ALV, y en un modelo murino de ALV. Previamente se identificó un polipéptido (á-CTD) que contendría los epítopos responsables de dicha RC. La reactividad de los posibles epítopos se evaluó por síntesis de péptidos en fase sólida, scanning de alanina y por péptidos recombinantes. Las proteínas recombinantes y sus contrapartidas naturales, son reconocidas por los distintos Ac específicos de PLV, por esplenocitos y por mastocitos sensibilizados del modelo murino. Se determinó que los péptidos seleccionados contienen epítopos inmunodominantes, y se identificaron posiciones de aminoácidos críticas en cada epítipo para mantener la reactividad inmunológica. En conclusión, confirmamos la RC inmunológica e identificamos 3 epítopos inmunodominantes que podrían ser los responsables de la intolerancia clínica observada en pacientes con ALV. En base a estos Resultados planteamos modificar los péptidos y emplearlos para inducir tolerancia en el modelo murino de alergia.

195 (215) ESTUDIO MOLECULAR DE LAS EXPRESIONES DÉBILES DEL ANTÍGENO D. Luján Brajovich M.¹; Trucco Boggione C.²; Biondi C.³; García Borrás S.⁴; Racca A.⁵; Cotorruelo C.⁶

Laboratorio de Inmunoematología. Área Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario^{1 2 3 4}; Laboratorio de Inmunoematología. Área Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario; CIUNR⁵; Laboratorio de Inmunoematología. Área Inmunología. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario; CONICET⁶ <lujanmelina@yahoo.com.ar>

La expresión del antígeno D del sistema Rh en los glóbulos rojos (GR) presenta variaciones cuantitativas en algunos individuos. Actualmente en los Bancos de Sangre, se considera que los pacientes con expresión disminuida de los epítopos D, desarrollan una respuesta inmunológica luego de la transfusión de GR RhD positivos. Estudios recientes han demostrado que los receptores con variantes D débiles tipo 1, 2 y 3, no producen anticuerpos anti-D. El objetivo de este trabajo fue identificar expresiones débiles del antígeno D y genotipificar sus alelos. Se estudiaron 12672 muestras de donadores voluntarios del servicio de Hemoterapia del Hospital Provincial del Centenario. Se utilizaron 2 anticuerpos monoclonales anti-D para identificar los individuos RhD positivos, RhD negativos y fenotipos con variantes D débiles, por hemaglutinación. Se determinó el fenotipo Rh completo

con anticuerpos monoclonales específicos anti-C, anti-c, anti-E y anti-e en las muestras que presentaron aglutinación débil en medio salino (AD) y en las que solo reaccionaron con la prueba de la antiglobulina indirecta (PAI). Se obtuvo ADN por la técnica de salting out y se estudiaron por PCR-SSP cuatro SNPs responsables de alelos D débiles. Se identificaron por métodos serológicos 39 muestras con AD y los estudios moleculares permitieron caracterizar los siguientes alelos D débiles: 5 tipo 1, 4 tipo 2, 1 tipo 3 y 3 tipo 4. En 22 muestras con PAI positiva se genotipificaron los siguientes alelos débiles: 13 tipo 1, 3 tipo 2, 1 tipo 3 y 3 tipo 4. No se observó una correlación entre el fenotipo Rh completo y el tipo de D débil hallado. Estos hallazgos indican que las técnicas serológicas no determinan con precisión las distintas variantes débiles. Hemos observado que el mismo alelo D débil puede presentar una expresión fenotípica diferente en distintos individuos. La caracterización molecular de estos alelos constituye una herramienta útil para la selección de unidades compatibles en los Bancos de sangre.

196 (513) ALTERACIONES CUANTITATIVAS EN LOS SUBSETS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ESPLÉNICAS EN RATONES INFECTADOS O VACUNADOS CON VFA. Langellotti C.¹; Olivera V.²; Quattrocchi V.³; Pappalardo J.⁴; Di Giacomo S.⁵; Zamorano P.⁶; Vermeulen M.⁷

CONICET, Buenos Aires, Argentina¹; Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar^{2 3}; Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar; CONICET, Buenos Aires, Argentina⁴; Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar⁵; Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar; CONICET, Buenos Aires, Argentina⁶; CONICET, Buenos Aires, Argentina; Laboratorio de Inmunología, Academia Nacional de Medicina⁷ <clangellotti@cni.inta.gov.ar>

La fiebre aftosa es una enfermedad infecto-contagiosa, aguda y febril causada por el Virus de la Fiebre Aftosa (VFA) que afecta a los artiodáctilos, incluyendo rumiantes domésticos y cerdos. Debido a las grandes pérdidas causadas en la producción animal, es fundamental el desarrollo de vacunas que impidan la dispersión de la enfermedad. La vacuna utilizada actualmente contra el VFA contiene a la forma inactivada de este virus. A diferencia de la respuesta inducida por la infección, la vacuna no induce una rápida inmunidad ni tampoco genera una memoria duradera. Previamente demostramos que la vacunación con VFA inactivo induce un aumento significativo de las células dendríticas (CD) plasmacitoides, una disminución significativa de las CD mieloides en bazos de ratones BALB/c a los 3 dpv, mientras que no se observaron cambios en la población de CD linfoides. El objetivo de este trabajo consistió en profundizar las variaciones en las poblaciones de CD entre la vacunación y la infección. Para lo cual en primer lugar, evaluamos in vivo por técnica inmunohistoquímica la proporción de las CD en bazos obtenidos de ratones vacunados con VFA inactivo, confirmando un aumento efectivo en la cantidad de CD plasmacitoides (CD11c+B220+). Posteriormente, analizamos si la infección de ratones BALB/c con VFA inactivo induce cambios idénticos en las CD. Para lo cual, los ratones se inocularon con 104 DICT50 de VFA por vía i.p. Encontramos, que contrariamente a lo observado en los ratones vacunados, la infección provocó la disminución de todos los subsets de CD en aproximadamente un 50% para las CD plasmacitoides, 45% para las CD mieloides y 40% para las CD linfoides, versus sus contrapartes normales. Los Resultados obtenidos hasta el momento, indicarían que la respuesta inmune a corto plazo producida luego de la vacunación con virus inactivo es cuantitativamente diferente a la inducida por la infección con el virus activo

197. (149) PARÁMETROS DE ALERGIA MODIFICADOS DESPUÉS DE LA INMUNOTERAPIA. CARACTERÍSTICAS DE ACUERDO A LAS EDADES. Maldonado A.¹; Alaniz F.²; Cariddi L.³

Dpto de Microbiología e Inmunología. UNRC^{1 2 3} <amaldonado@exa.unrc.edu.ar>

Introducción. Los pacientes alérgicos asmáticos después de un año de inmunoterapia alérgica específica (ITE), muestran mejoría en la frecuencia e intensidad de los síntomas. El objetivo de la investigación fue demostrar que la ITE modula, según las edades, los parámetros clínicos, celulares y moleculares de alergia. Diseño del estudio. Fueron incluidos 81 pacientes alérgicos asmáticos: 28 lactantes, 36 niños, 17 adultos y 27 controles sanos. Al inicio y más de un año después, se realizaron: pico flujo espiratorio (PFE), pruebas cutáneas, eosinofilia sanguínea y mucosal, ensayo de liberación de β -hexosaminidasa (α -H) alérgico específico, índices de proliferación de células mononucleares (PBMC) estimuladas con PHA o alérgico, cuantificación de IgE, IFN- γ , IL-13 y sCD23. Resultados. Los niños post-ITE incrementaron los volúmenes de PFE, $p < 0.0001$. Los tres grupos con ITE redujeron la reactividad cutánea y los índices de liberación de β -H, $p < 0.02$ y menores. Los niños y adultos post-ITE disminuyeron: los niveles de IgE, $p < 0.05$, de eosinófilos mucosales, $p < 0.01$ y los niños la eosinofilia sanguínea, $p < 0.0001$. Las PBMC desafiadas con el alérgico, de infantes y niños post-ITE redujeron los índices de proliferación, ambos $p < 0.05$. Los pacientes alérgicos observaron menores niveles de IFN- γ y mayores valores de IL-13 y sCD23 que los controles, pero los cambios al año post-ITE, no fueron significativos. Los alérgicos de los grupos sin ITE mostraron valores sin cambios en algunos ensayos y de empeoramiento de la enfermedad en otros, con $p < 0.05$ y menores. Conclusiones. La ITE demostró efectividad terapéutica y cambios clínicos, celulares y moleculares. Se sugiere nueva evaluación con período más prolongado de ITE. La mayoría de los valores fueron indicadores de la evolución de la enfermedad y las modificaciones variaron según las edades.

198 (391) ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN E. COLI DEL ANTICUERPO MONOCLONAL ESPECIFICO ANTI-GLIADINA. Scabone C.¹; Vecchi B.²; Petruccelli S.³

CIDCA-Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.^{1 2 3}
cscabone@cidca.org.ar

El anticuerpo monoclonal (mAb) 1B4E9 es específico contra gliadinas y actualmente es de utilidad en la certificación de alimentos para celíacos. El mAb 1B4E9 no había sido clonado a nivel molecular, sólo estaba disponible el hibridoma productor (ref. Chirido 1998). Nuestro grupo ha clonado las cadenas pesadas y livianas de este mAb y ha realizado el modelado de la estructura tridimensional. La identificación de los epitopes de las gliadinas y de los residuos del anticuerpo más importantes en el reconocimiento del antígeno va a permitir proponer modificaciones en el mAb que mejoren los métodos de certificación. Para completar estos estudios es necesario obtener en niveles adecuados la expresión del anticuerpo 1B4E9. El objetivo del presente trabajo fue aumentar los niveles de expresión en *E. coli* del anticuerpo monoclonal anti-gliadina proveniente del hibridoma 1B4E9 mediante quimerización del Fab y el clonado como scFv (single chain) en los vectores pComb3X y pMalPSS. La quimerización es una de las estrategias más comunes para aumentar los niveles de expresión en *E. coli* de Fabs fusionando los dominios variables con dominios constantes de anticuerpos con buenos niveles de expresión. La quimerización del Fab anti-gliadina se realizó utilizando OE-PCR (Overlapping Extension PCR) para fusionar los dominios variables de ambas cadenas con los respectivos dominios constantes humanos. El producto final fue clonado en los vectores pComb3X y pMalPSS para su expresión en superficie de fagos M13 y expresión periplásmica en *E. coli*, respectivamente. Se construyó además la versión simple cadena (scFv) del anticuerpo anti-gliadina 1B4E9 que fue también clonado en los vectores pComb3X y pMalPSS. El vector pMalPSS provee una fusión N-terminal de MBP (Maltose Binding Protein), que aumenta los niveles de expresión de proteína soluble. Los Resultados de los inmunoensayos reveló que la mejor expresión se obtuvo con la construcción scFv en el pMalPSS.

199. (483) MARCACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS CON COLORANTES TRIAZÍNICOS: UNA ALTERNATIVA SIMPLE Y ECONÓMICA. Cela E.¹; Gonzalez Maglio D.²; Paz M.³; Weill F.⁴; Leoni J.⁵; Ferrari A.⁶

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{1 2 3 4 5 6} cecel@ffyb.uba.ar

Tradicionalmente, las técnicas inmunológicas de laboratorio utilizan anticuerpos marcados con enzimas, moléculas fluorescentes, ligandos radiactivos y oro coloidal. Esta última constituye la única forma de marcación utilizada en técnicas rápidas de diagnóstico, como el dot blot y la inmunocromatografía. Sin embargo, a pesar de su versatilidad, este método de marcación resulta costoso y laborioso, y en la actualidad no hay estrategias alternativas disponibles. El objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de marcar anticuerpos con un colorante triazínico (Red-HB120), por medio de un proceso sencillo y de bajo costo, para su uso en el diseño de técnicas rápidas de laboratorio. Este trabajo se llevó a cabo sobre un sistema conformado por un lisado de *E. coli* BL21 e inmunoglobulinas (Igs) de conejo específicas contra el lisado. Para optimizar la marcación, se ensayaron 3 condiciones de pH (8.25, 9.0 y 10.2) y 3 condiciones de tiempo de incubación (30, 60 y 120 min). En todos los casos, las Igs marcadas fueron separadas del colorante libre por exclusión molecular. Para cada una de las 9 combinaciones, se estudió: a) el grado de marcación, por medio de la relación de absorbancia entre el colorante y las Igs (510/280 nm); b) la disminución del título de las Igs específicas, por ELISA, y c) la intensidad del color final, por dot blot. Los Resultados mostraron que la marcación a pH 10.2 durante 120 min conduce a una mayor relación entre colorante e Igs. La titulación por ELISA indicó que, en estas condiciones, la inmunoreactividad de las Igs solo se ve levemente disminuida. A su vez, se comprobó que en esas condiciones de marcación, la intensidad de la coloración obtenida durante un ensayo de dot blot, es adecuada y máxima. Se concluye que la marcación de anticuerpos con colorantes triazínicos resulta una alternativa viable, económica y sencilla, para la obtención de reactivos de enorme utilidad en el diseño de técnicas rápidas de inmunodiagnóstico.

200 (630) EMPLEO DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE GIARDIA INTESTINALIS EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL MEDIANTE ELISA DE CAPTURA. Humen M.¹; Serradell M.²; Pérez P.³

*Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) - CCT La Plata - CONICET*¹; *Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA) - CCT La Plata - CONICET; Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas - UNLP*^{2 3}
mhumen@cidca.org.ar

La infección por *Giardia intestinalis* es una parasitosis gastrointestinal que puede ser asintomática o causar síndrome de mala absorción alimentaria. Actualmente, el diagnóstico se realiza por examen microscópico en busca de quistes o trofozoítos en materia fecal. Si bien existen ensayos comerciales de buena sensibilidad para la detección de antígenos de *G. intestinalis* en materia fecal, su elevado costo los hace de difícil acceso sobre todo en organismos de salud pública. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un ELISA de captura con anticuerpos poli- y monoclonales específicos previamente obtenidos en nuestro laboratorio, y evaluar su potencial utilidad para la detección de antígenos de *G. intestinalis* en extractos de materia fecal. Ensayos previos por Western blot mostraron que tanto el anticuerpo monoclonal (AcMo) 3A5 como un antisero de conejo (SCo) (contra un lisado de trofozoítos como inmunógeno) reconocen antígenos en extractos obtenidos a partir de 3 cepas diferentes de *G. intestinalis*. Para optimizar el ELISA de captura, se utilizaron concentraciones de 0,05 y 0,1 mg/fosa del AcMo, y dilucio-

nes 1/2000 y 1/20000 de SCo. En la mejor de las condiciones, el sistema fue capaz de detectar concentraciones de antígeno de hasta 0,1 mg/ml tanto en un lisado de trofozoítos como en materia fecal de ratones SPF adicionada de antígenos de *G. intestinalis*. A su vez, el ensayo fue capaz de detectar antígenos del parásito en muestras de animales infectados (comprobado por microscopía y ensayo inmunoquímico comercial). Actualmente se está evaluando el ensayo en materia fecal de animales infectados (ratones y meriones) así como también, la posible aplicación en muestras conservadas con formol. Los Resultados. Los Resultados obtenidos hasta el momento permiten vislumbrar la aplicación de los reactivos generados en un ensayo inmunológico que sea de fácil acceso para el sistema de salud pública de nuestro país.

201 (374) LA INFECCIÓN CRÓNICA CON TOXOPLASMA GONDII INDUCE SUPRESIÓN EN UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN ALÉRGICA PULMONAR. Fenoy I.¹; Giovannoni M.²; Chiurazzi R.³; Rodríguez F.⁴; Sánchez V.⁵; Cerny N.⁶; Frank F.⁷; Martin V.⁸; Goldman A.⁹

CECyMA, ECyT, UNSAM^{1 2 3 4 5}; IDEHU, Inmunología, FFyB, UBA-CONICET; Dpto Micro, FMED^{6 7}; CECyMA, ECyT, UNSAM^{8 9} <nachofny@gmail.com>

La sensibilización durante la etapa crónica de la infección con *T. gondii* resulta en una disminución de la inflamación alérgica. Los menores niveles de IL-4 e IL-5 en ganglio torácico (GT) sugieren una reducción de la respuesta Th2 hacia el alérgeno. Sin embargo, no se observó un desvío a Th1. Se demostró que ciertas infecciones podrían proteger contra el desarrollo de alergias al inducir la producción de citoquinas capaces de disminuir tanto la respuesta Th1 como la Th2. Evaluamos entonces la capacidad proliferativa de células de GT en ratones crónicamente infectados y sensibilizados con OVA por incorporación de [3H]timidina luego de la estimulación con OVA o ConA. Las células T de ratones infectados y sensibilizados (O+T) mostraron una menor proliferación que aquellas de animales alérgicos (O) (OVA: N:2±0, TOX:2±1, O:31±3*, O+T:5±2; ConA: N:108±14, TOX:92±13, O:98±14, O+T:42±12*; SI±ES). Estudiamos luego la habilidad de células totales de GT de ratones O+T o solamente infectados (TOX) de suprimir la proliferación de células T. Se co-cultivaron células de animales alérgicos (O) con células de los grupos TOX, O+T y N, y se estimuló con el alérgeno. Las células de GT del grupo O+T inhibieron la proliferación (N:27±2, TOX:18±3, O+T:6±3*; SI±ES). Evaluamos posteriormente la presencia de IL-10 en el sobrenadante de células de GT estimuladas con OVA o ConA. Los ratones alérgicos mostraron altos niveles de IL-10 mientras que los infectados y sensibilizados en la etapa crónica mostraron niveles significativamente inferiores. (OVA: N:15±7, TOX: 15±1, O:479±176*, O+T:35±15; ConA: N: 285±155, TOX: 72±20, O:903±165*, O+T:203±101; X±ES). La disminución de la proliferación detectada en los ratones sensibilizados durante la etapa crónica de la infección con *T. gondii* sería consecuencia de la acción de células con capacidad supresora. La IL-10 no jugará un rol en la supresión observada. * p<0,05 vs resto

202 (664) CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA Y COMPUTACIONAL DE GLY M BD³⁰K/P³⁴ EL MAYOR ALÉRGENO DE SOJA. Candreva A.¹; Curciarello R.²; González V.³; Parisi G.⁴; Petruccelli S.⁵; Docena G.⁶

CIDCA; LISIN^{1 2}; Unidad de Fisicoquímica, Cento de Estudios e Investigaciones UNQ^{3, 4}; CIDCA⁵; LISIN⁶ <coquicandreva@yahoo.com.ar>

Diferentes productos derivados de los porotos de soja son ampliamente utilizados en la elaboración de la mayor parte de los alimentos, a pesar de que se considere entre los ocho principales alimentos causantes de alergia. La soja posee más de 15 proteínas alergénicas, siendo el principal alérgeno la proteína Gly m Bd 30K/P34. En nuestro país no existe información sobre la importancia de esta proteína en alergias a soja, habiendo datos sólo de alérgenos de soja aéreos o de reactividad cruzada (RC) de

algunas proteínas de soja con proteínas de leche vacuna (LV). La identificación de las proteínas responsables de alergias y el estudio de sus estructuras es importante para entender las bases moleculares de la patología junto con la búsqueda de tratamientos alternativos. A partir de una biblioteca de cDNA de semillas inmaduras de soja se amplificó por PCR el gen codificante para P34; clonado en pENTR SD/TOPO (Invitrogen) y luego transferido al vector pDEST-HIS-MBP. El plásmido obtenido fue introducido en diferentes cepas de *E. coli* BL21, optimizándose las condiciones de expresión y purificación. Se probó la capacidad de P34 de unirse a anticuerpos IgE por ELISA empleando sueros de pacientes alérgicos a soja. Por inmunoblots se analizó la RC con proteínas de LV empleando: suero policlonal de cabra específico de proteínas de LV, anticuerpos monoclonales anti-caseínas, y sueros de pacientes alérgicos a LV. Se utilizaron también diversas herramientas bioinformáticas con el fin de identificar posibles epítopos IgE inmunodominantes, responsables tanto de la reactividad directa (RD) como de la RC. Se logró un buen rendimiento en la obtención de la proteína recombinante. Se comprobó su actividad antigénica y alérgica in vitro, y se demostró la RC de P34 con proteínas de LV. Se obtuvo además un modelo tridimensional de la proteína y se identificaron péptidos de P34 candidatos a ser posibles epítopos.

203 (54) INMUNOSUPRESIÓN POR EXPOSICIÓN CUTÁNEA A RADIACIÓN UVB: EFECTOS LOCALES Y SISTÉMICOS. Cela E.¹; Weill F.²; Paz M.³; Leoni J.⁴; González Maglio D.⁵

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{1 2 3 4 5} <ecela@ffy.uba.ar>

La exposición de la piel a la radiación ultravioleta (rUV) produce daño local (inflamación y muerte celular) e inmunosupresión sistémica (disminución de reacciones de hipersensibilidad de contacto, HSC). Sin embargo, no se conoce realmente hasta qué nivel se afectan los linfocitos. El objetivo del trabajo consiste en evaluar la modificación de la respuesta de linfocitos T luego de la exposición de la piel a dosis altas de rUV, tanto local como sistémicamente. Se utilizaron ratones alopécicos (SKH:HR1) separados en dos grupos de 5 ratones, uno control y otro irradiado con una dosis de 400 mJ/cm². Los animales se sacrificaron 24 hs post-rUV. Se extrajeron los ganglios inguinales (GI), axilares (GA) y el bazo, y se evaluaron el número total de células, su proliferación frente a Concanavalina A, la producción de IL-4, IL-10 e IFN- γ , y los porcentajes de CD3+, CD4+, CD8+ en epidermis y GI. Los ratones irradiados presentaron una disminución del número de células totales en bazo, no viéndose alterado en los ganglios. Las células de GI proliferaron menos, no obstante no se observaron diferencias en GA y bazo. El perfil de citoquinas mostró una marcada disminución en los niveles de IL-4, IL-10 e IFN- γ en el sobrenadante de cultivo de células de GI, mientras que sólo se observó una disminución de IL-10 en GA y de IL-4 en bazo. En cuanto a los porcentajes de células, en los GI de los ratones irradiados se vio un aumento de células CD3+ CD8+ y una disminución de CD3+ CD4+, mientras que en epidermis el porcentaje de células CD3+ CD4- CD8- se redujo notablemente. Dosis altas de rUV producen un estado de inmunosupresión muy marcado localmente (epidermis y GI), viéndose en GI una menor proliferación celular y una caída abrupta de los niveles de citoquinas asociadas a un perfil Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) y regulatorio (IL-10). En GA los efectos son más leves y sistémicamente (bazo) no se observan.

204 (609) LINFOPOYESIS B AUMENTADA EN LOS RATONES CTSLNKT/NKT. Badano M.¹; Camicia G.²; Costa H.³; Lorenzo D.⁴; Piazzon I.⁵; Nepomnaschy I.⁶

ILEX-CONICET; Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5 6} <noebadano@yahoo.com.ar>

Los ratones CTSLnkt/nkt, portadores de una delección en el gen de la catepsina L (CTSL), poseen un mayor porcentaje y número absoluto de linfocitos B en los ganglios linfáticos (GL). Correlativamente, presentan incrementos de diversas glicoproteínas de la matriz extracelular (ECM) en los GL. En el bazo mues-

tran un leve aumento de linfocitos B, mientras que los niveles de los componentes de la ECM son normales. En cambio, en la médula ósea (MO) las glicoproteínas de la ECM están disminuidas. En este trabajo investigamos los mecanismos involucrados en el aumento de células B en los GL. Experimentos utilizando bromodeoxiuridina y yoduro de propidio mostraron que los niveles de proliferación y apoptosis basal de células B en los GL y bazo de ratones nkt son normales. Mediante FACS, estudiamos las moléculas de adhesión que median la entrada de los linfocitos a los GL. Observamos un incremento en el porcentaje de células CD19+ que expresan altos niveles de la integrina LFA-1 y de CD44. (media % LFA-1 high en CD19+ \pm DS; n=4). nkt: 25,8 \pm 3,2; wt: 16,6 \pm 3,5, p<0,01. (media % CD44 high en CD19+ \pm DS; n=4). nkt: 16,5 \pm 2,1; wt: 10,4 \pm 0,9; p<0,01. Como la maduración del linaje B en la MO de los ratones nkt ocurre de manera normal (medida como el porcentaje de precursores B en cada estadio madurativo), investigamos la producción de células B mediante ensayos de unidades formadoras de colonias en un medio con metilcelulosa e IL-7. A los 7 días de cultivo, el recuento de colonias (CFU pre-B) fue mayor en los ratones nkt que en los wt. (media CFU pre-B \pm DS, n=3). nkt: 205 \pm 9; wt: 149 \pm 1; p<0,01. Estos resultados indican que la MO de los ratones nkt tiene una mayor producción de linfocitos B, efecto que se ve reflejado en un aumento en el número de células B que llegan a los GL. La CTSL podría participar en la regulación de la producción de los linfocitos B y su distribución en los órganos linfoides periféricos a través de su actividad órgano-específica sobre la composición de la ECM.

205 (129) MODULACION DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO EN MONOCITOS HUMANOS POR ACIDOS GRASOS.

Inzaugarat M.¹; Baz P.²; Cheriñavsky A.³

Inmunogenética, Hospital de Clínicas "Jose de San Martín", Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina^{1 2 3}
<m.euge.inzaug@gmail.com>

La NADPH oxidasa está involucrada en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en monocitos y neutrófilos, componente celular principal del infiltrado inflamatorio hepático en la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). En estos pacientes, los niveles plasmáticos de ácidos grasos (AG) son elevados. Los AG alteran la actividad de la PKC llevando a la fosforilación y activación de la NADPH oxidasa, aumentando la generación de ERO. El factor NF κ B es activado por ERO, translocándose al núcleo e induciendo transcripción de citoquinas proinflamatorias. Nos propusimos investigar el efecto de tres ácidos grasos sobre el estallido respiratorio de monocitos. Células THP-1 y monocitos frescos (Mo) provenientes de individuos control fueron incubados con concentraciones crecientes de ácido palmítico (saturado), oleico (monoinsaturado) y linoleico (poliinsaturado) durante 60 minutos a 37 °C. La producción de ERO fue medida mediante citometría de flujo utilizando diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) como marcador fluorescente. El índice de estimulación (IE) se definió como: Intensidad Media de Fluorescencia(IMF) Células estimuladas/IMF Células Basal. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA seguido del test T de Student. La respuesta de las células THP-1 fue diferente entre los ácidos grasos en células incubadas con las tres concentraciones estudiadas (200 μ M; p=0,0016, 400 μ M; p=0,0450 y 500 μ M; p=0,0012). El análisis post test reveló diferencias significativas en los IE en respuesta a ácido linoleico y palmítico comparado con ácido oleico en los tres casos. Los Mo mostraron una respuesta similar a la observada por la línea celular THP-1. Concluimos que los ácidos palmítico y linoleico estimulan el estallido respiratorio en monocitos humanos. Esta exagerada producción de ERO refleja un potencial riesgo de daño tisular en pacientes con elevados niveles de ácidos grasos plasmáticos, como los pacientes con EHNA, efecto que debe ser estudiado detalladamente.

ENDOCRINOLOGIA 3

206 (39) NIÑOS SELECCIONADOS POR SU RIESGO DE PADecer DIABETES TIPO 1 - DOS AÑOS DE TRATAMIENTO CON ACETIL-L-CARNITINA Y NICOTINAMIDA. Cresto J.¹; Fernández I.²; Trifone L.³; Tonietti M.⁴; Bergada I.⁵; Passicot G.⁶; Trabucchi A.⁷; Valdez S.⁸; Camberos M.⁹; Schenone A.¹⁰; Szlago M.¹¹; Fretchel G.¹²; Tellechea M.¹³; Poskus E.¹⁴

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)¹; Diabetes, Htal. de Niños "R. Gutiérrez"^{2 3 4}; Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)^{5 6}; Inmunología (IDEHU-CONICET), Farmacia y Bioquímica, UBA^{7 8}; Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)⁹; Fundación Enf. Neurometabólicas (FESEN)^{10 11}; Genética y Biología Molecular, Htal. de Clínicas, UBA^{12 13}; Inmunología (IDEHU-CONICET), Farmacia y Bioquímica, UBA¹⁴
<jcresto@cedie.org.ar>

Objetivos: Tratar a niños en alto riesgo de diabetes tipo 1 con acetil-L-carnitina (50 mg/Kg/día) y nicotinamida (25 mg/Kg/día) carentes de toxicidad. Métodos: Los niños fueron cosanguíneos de diabéticos tipo 1. Se estudiaron con HLA-DQBA, anticuerpos (GABA, PAA, IA2A), PTEVG (primer pico de insulina<49, Kg<1.40, log_n (área ins) x k_g<15, glucemia a los 60 min>140 mg%) y carnitina total y libre(<35 μ mol/l). Selección de Pacientes: Aquellos niños con anticuerpos positivos, primer pico de insulina<49 y log_n (área ins) x k_g<15. Pacientes estudiados: Seis niños fueron seleccionados por las condiciones establecidas, de los cuales, uno (TE) presentaba una diabetes clínica al momento del tratamiento y otro (RU) todavía no presenta anticuerpos (debe consignarse que los niños sin anticuerpos iniciales han presentado anticuerpos en el curso de su evolución). Salvo la diabética, los restantes se encuentran en tratamiento y han sido reclutados en distintos momentos, por lo tanto los tiempos de tratamiento son distintos. Se puede diferenciar la primera niña tratada (que comenzó en el año 2002) de los demás niños ingresados a través del Protocolo de Selección en curso (tiempos de tratamiento: 27, 21, 10 y 1 mes). La niña BL con 5 años de tratamiento normalizo todos sus valores y nunca presentó signos de intolerancia. El niño PVTS con 27 meses normalizó su primer pico de insulina y la ecuación (PP: 85 μ U, (área ins) x K_g: 39), los demás niños no han normalizado sus valores. Todos continúan en estudio y tratamiento. Conclusión: No se han presentado problemas por intolerancia o toxicidad y en todos se sigue evaluando su evolución. Ya que la Diabetes Tipo 1 tiene progresión variable, debe esperarse un tiempo razonable antes de sostener que se ha detenido la evolución diabética

207 (177) DOPAMINA Y HOMEOSTASIS DE LA GLUCOSA: EFECTOS EN LA SECRECIÓN DE INSULINA Y TOLERANCIA A LA GLUCOSA EN EL MODELO DE RATÓN KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2. García Tornadú I.¹; Risso G.²; Noain D.³; Rubinstein M.⁴; Becu-villalobos D.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2}; Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular³; Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Mo⁴; Instituto de Biología y Medicina Experimental⁵
<itornadu@dna.uba>

La relación entre el uso de agentes antidopaminérgicos y la homeostasis de la glucosa es un área poco explorada. Sin embargo está descrito que tratamientos crónicos de drogas neurolépticas producen hiperinsulinemia en adultos, estando además estrechamente asociado la aparición de diabetes en pacien-

tes psiquiátricos que se encuentran en tratamientos crónicos. Estudios realizados in vitro postulan un rol inhibitorio de la dopamina (DA) en la secreción de insulina, efecto que estaría mediado por receptores D2 (RD2) presentes en el islote pancreático. El objetivo fue evaluar la participación de los RD2 en un modelo in vivo e in vitro utilizando como herramienta el ratón knock out (KO) para el RD2. Estos animales presentaron niveles de glucosa en ayuno mayores respecto a los animales salvajes (105 ± 6 vs. 127 ± 6 mg/dl, $p=0.040$). Los ratones KO presentaron intolerancia a la glucosa, con menores niveles de insulina secretados ($p=0.03$). Una administración aguda de cabergolina (3 mg/kg), un agonista dopaminérgico, produjo intolerancia a la glucosa y una disminución en los niveles secretados de insulina. Este efecto fue parcialmente revertido con el uso de haloperidol (antagonista dopaminérgico) y los efectos de cabergolina y haloperidol sólo se observaron en los animales salvajes. En islotes aislados in vitro la DA ejerció un efecto inhibitorio sobre la secreción de insulina únicamente en los islotes de animales salvajes, efecto que fue bloqueado con antagonistas específicos para el RD2. Por último, al evaluar animales que carecen del RD2 únicamente a nivel de sistema nervioso central no encontramos diferencias entre genotipos en la secreción de insulina. Postulamos que la DA participaría en el control de la secreción de la insulina. La ausencia crónica de este efecto inhibitorio produciría un lento y progresivo deterioro en los islotes pancreáticos, alterando la secreción de insulina, hecho que conduciría al eventual desarrollo de un fenotipo de diabetes de tipo II.

208 (272) ALTERACIONES GENÉTICAS EN PACIENTES MENORES DE 21 AÑOS CON FEOCROMOCITOMA. Vieites A.¹; Sansó G.²; Barontini M.³; Levin G.⁴

CEDIE-CONICET- Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez^{1 2 3 4} <anavieites@yahoo.com>

Los feocromocitomas (feos) son tumores productores de catecolaminas que durante mucho tiempo fueron considerados esporádicos. Actualmente se sabe que pueden ser familiares, como parte de: Neoplasia Endócrina Múltiple (MEN) 2A o B, enfermedad de von Hippel Lindau (VHL), neurofibromatosis tipo 1 (NF1) y síndrome de paraganglioma familiar 1 y 4 por mutaciones del gen de la succinato dehidrogenasa (SDHD y SDHB). El objetivo de este trabajo fue evaluar en 44 pacientes menores de 21 años con diagnóstico bioquímico y anatomopatológico de feo, la presencia de alteraciones en los genes susceptibles de enfermedad hereditaria. Para el estudio de biología molecular se realizó la extracción de ADN de sangre periférica, la amplificación por PCR, el screening por SSCP y la confirmación por secuenciación y/o digestión enzimática. 14 pacientes fueron familiares (11 familias) o tuvieron fenotipo síndromico. En este grupo se observó un predominio de mutaciones del gen VHL (10/14), 2 pacientes con NF1 y 2 con MEN 2B. Entre los 30 pacientes restantes, con feo "aparentemente" esporádico, se identificaron mutaciones en 19 (63.3%): 15 en VHL (50%) y 4 en SDHB (13.3%). No se encontraron mutaciones en el RET ni en SDHD. 4 de los pacientes síndromicos fueron portadores normotensos, y el diagnóstico se hizo por dosaje de catecolaminas durante el seguimiento. En cuanto a la localización del tumor, en los pacientes con mutaciones de VHL predominó la bilateralidad (15/25), mientras que en los esporádicos la mayoría fue unilateral (7/11). El porcentaje de tumores extraadrenales fue mucho mayor entre los pacientes con mutaciones del gen de SDHB (3/4). Concluyendo, estos datos enfatizan la importancia de realizar el estudio genético en pacientes jóvenes con feo aparentemente esporádico dado la alta prevalencia de mutaciones, entre las cuales predomina la del gen de vhl.

209 (436) EL RECEPTOR ESTROGÉNICO ALFA DE MEMBRANA PARTICIPA EN LA ACCIÓN DEL 17-BETA ESTRADIOL EN INTERACCIÓN CON TRH MODULANDO LA SECRECIÓN DE PROLACTINA. Sosa L.¹; Gutiérrez S.²; Mascanfroni I.³; Soaje M.⁴; Palmeri C.⁵; Petiti J.⁶; Pellizas C.⁷; De Paul A.⁸; Torres A.⁹

Centro de Microscopía Electrónica-Fac de Ciencias Médicas-UNC^{1 2}; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología- CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.³; Laboratorio de reproducción y lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza, Argentina.⁴; Centro de Microscopía Electrónica-Fac de Ciencias Médicas-UNC^{5 6}; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología- CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.⁷; Centro de Microscopía Electrónica-Fac de Ciencias Médicas-UNC^{8 9} <ldvsosa@gmail.com>

Estradiol (E2) media sus efectos a través de receptores estrogénicos (RE) α y β intracelulares y de membrana. Si bien se ha descrito el rol modulador de E2 sobre la acción de TRH en lactotropas, la contribución de los RE α de membrana (RE α m) en este efecto no está completamente esclarecida. Nuestro objetivo fue estudiar la interacción de E2 y TRH determinando la participación de los RE α m y la vía la PI3K/Akt sobre la actividad secretoria de las lactotropas. Cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata hembra fueron tratados con E2 (10nM); E2-BSA (forma impermeable a la membrana, 10nM); solos o combinados con TRH (10nM) por 30min. La localización de los RE α m en lactotropas fue realizada por citometría de flujo (CF) en células no permeabilizadas para RE α m y permeabilizadas para PRL. Se emplearon inhibidores específicos para PI3K: LY294002 (10 μ M) y wortmanina (100nM) y el inhibidor de RE: ICI 182,780 (100nM). Se cuantificó PRL por RIA y la expresión de Akt total, fosforilada y de RE α por WB. La ultraestructura de lactotropas fue analizada por microscopía electrónica. Análisis estadístico: ANOVA-Tukey. La incubación con E2, E2-BSA, TRH y E2/TRH incrementaron la secreción de PRL, alcanzando los niveles más altos con E2-BSA/TRH. La liberación de PRL inducida por E2 y E2/TRH fue inhibida por ICI 182,780. La expresión de RE α total no presentó variaciones en los modelos estudiados. Por CF detectamos un porcentaje mayor de células lactotropas que expresaron RE α m en el modelo de interacción E2/TRH. La fosforilación de Akt solo fue incrementada por E2-BSA/TRH. Los inhibidores de PI3K bloquearon la liberación de PRL estimulada por E2-BSA/TRH. Las células lactotropas incubadas con E2-BSA/TRH exhibieron escasos gránulos secretorios y frecuentes figuras de exocitosis. Los resultados obtenidos sugieren que E2 potencia los efectos estimulatorios de TRH sobre la secreción de PRL mediante la participación de RE α de membrana y la activación de la vía de señalización PI3K/Akt.

210 (477) ESTUDIO EN RATONES WILD TYPE (WT) Y TRANSGÉNICOS (TG) EN COX-2 DE APOPTOSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR DIABETES. Francés D.¹; Mayoral Moñibas R.²; Martín-Sanz P.³; Carnovale C.⁴

Instituto de Fisiología Experimental - (IFISE-CONICET)¹ ; Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid, España^{2 3} ; Instituto de Fisiología Experimental - (IFISE-CONICET)⁴ <frances@ifise-conicet.gov.ar>

Se ha demostrado que existe un aumento de sustancias oxígeno reactivas (ROS) en el estado diabético, los cuales pueden actuar como mediadores de procesos pro-apoptóticos. Por otro lado, ROS puede activar vía JNK a la ciclo-oxigenasa tipo 2 (COX-2), que posee actividad anti-apoptótica activando la vía Akt e inhibiendo caspasas 9 y 3. Analizamos en hígado de ratones diabéticos las posibles vías de acción de COX-2 como un mecanismo de regulación de apoptosis. Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6JXDBA *Wt* y *Tg* en COX-2 de origen humano. Se los separó en dos grupos experimentales: Control (Buffer Citrato, pH 4,5) y DBT (tratados con Estreptozotocina, 200mg/kg p.c. en buffer citrato pH 4,5) obteniéndose los siguientes grupos experimentales ($n=4$ c/u): *Control W (CWt)*, *DBT Wt (DWt)*, *Control Tg (CTg)*, *DBT Tg (DTg)*. Siete días post-inyección, en hígado, se determinó el nivel de lipoperoxidación, como estimación de la producción de ROS, detectándose como malondialdehído, encontrándose un aumento significativo ($p<0,05$) en *DWt* (36%) y en

DTg (30%) vs. sus respectivos **C**. Se evaluó la vía de Akt, determinándose los niveles de P-Akt y la actividad PI3K. Se evidenció un descenso de la actividad PI3K (-35%) como del nivel de P-Akt (-30%) en **DWt** vs. **CWt**, atribuido a la deficiencia en insulina, situación revertida completamente en **DTg**. EL grupo **DWt** vs. **CWt** mostró un aumento en la expresión de proteínas pro-apoptóticas: Bad (90%) y Bax (56%) en mitocondria, liberación de citocromo c al citosol (250%) y las actividades de las caspasas-3 (47%), -8 (55%) y -9 (40%) y una disminución significativa de XIAP (-43%). La expresión de proteínas anti-apoptóticas aumentaron: Mcl-1 (**CTg**: 51%; **DTg**: 40%), Bcl-x₁ (**CTg**: 23%; **DTg**: 20%) y XIAP (**CTg**: 25%; **DTg**: 33%) vs. **CWt**. En resumen, se pudo establecer una situación pro-apoptótica en hígado en el estado diabético y que la sobre-expresión de COX-2 es capaz de mejorar esta situación principalmente a través de la activación de la vía de P-Akt.

- 211 (811) IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN DE LA TIROPEROXIDASA HUMANA. ANÁLISIS PREDICTIVO DEL EFECTO DE LAS MISMAS SOBRE LA ESTRUCTURA PROTEICA.** Belforte F.¹; Olcese M.²; Citterio C.³; González Sarmiento R.⁴; Targovnik H.⁵; Rivolta C.⁶

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3}; Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca⁴; Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca^{5 6} <fiorellabelforte@hotmail.com>

La tiroperoxidasa (TPO) es una hemoproteína de membrana involucrada en la biosíntesis de hormonas tiroideas. El 10% de los casos de hipotiroidismo congénito con bocio corresponden a defectos en la organificación de yodo y están asociados a mutaciones en los genes de TPO o en aquellos vinculados con la generación de H₂O₂ (Sistema DUOX). Con el objeto de identificar distintas mutaciones en el gen de TPO, evaluar su efecto deletéreo y desarrollar nuevas herramientas diagnósticas, se analizó una población de pacientes con hipotiroidismo congénito, bocio y test de descarga de perclorato positiva. Para ello se aisló ADN genómico a partir de sangre periférica y se amplificaron por PCR los 17 exones de TPO incluyendo las regiones intrónicas flanqueantes. Los productos fueron analizados por SSCP y secuenciados aquellos con migración diferencial respecto de controles. Se identificaron cinco nuevas mutaciones: c.796C>T, p.Q266X(exón 7); c.2000G>A, p.G667D(exón 11), c.1874 G>A, p.R595K(exón 11); c.2242 G>A, p.V748M(exón 13) y g.IVS16 -2 A>C(intrón 16). Así mismo, dos mutaciones ya descritas c.1186_1187insGGCC, p.R396fsX472(exón 8) y c.2421insC, p.C808fsX879(exón 14) fueron evidenciadas. Se procedió al análisis de predicción de la estructura secundaria proteica de las tiroperoxidases mutadas, al modelado molecular de las mismas y al análisis del grado de conservación evolutiva respecto a tiroperoxidases normales de distintas especies. Adicionalmente se identificaron siete nuevos polimorfismos: c.769G>T, p.A257S(exón 7), c. 1772 C>T, p.T561M(exón 10), c.1998C>T, p.D666D(exón 11), c.2286 C>T, p.R762R(exón 13), c.2513 C>T, p.S811F(exón 14), g.IVS11 +20 G>A(intrón 11) y g.IVS13 + 59 C>T(intrón 13). Las técnicas de biología molecular empleadas resultan de utilidad para la comprensión de la fisiopatología del hipotiroidismo neonatal de alta prevalencia y para mejorar su diagnóstico asegurando el asesoramiento genético a las familias afectadas y el tratamiento adecuado.

INMUNOLOGIA 5

- 212 (151) MASTOCITOS COMO CÉLULAS CLAVES EN LA INVASIÓN Y METÁSTASIS DEL CARCINOMA MAMARIO HUMANO.** Laguens G.¹; Coronato S.²; Chambo J.³; Portiansky E.⁴; Vincent N.⁵; Di Girolamo V.⁶

Facultad de Ciencias Médicas UNLP^{1 2 3 4 5 6} <glaguens@med.unlp.edu.ar>

La degradación de la matriz extracelular llevada a cabo por diversas proteasas generadas en células inflamatorias de la estroma y en las propias células tumorales, es una condición fundamental para la invasión y metástasis. Su activación depende de varias citoquinas entre ellas el TNF α . El objetivo de nuestro trabajo fue la cuantificación de mastocitos (MC) y su correlación con la actividad proteolítica y con la expresión de TNF α en carcinomas mamarios infiltrantes humanos. En 30 biopsias de carcinomas mamarios infiltrantes y 8 biopsias de mama sometidas a mamoplastías se realizaron homogenatos que fueron procesados para electroforesis en gel de poliacrilamida con 0,1% de gelatina. En el resto del material se efectuaron técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos anti-TNF α y anti-triptasa. Resultados: a- Los carcinomas mamarios presentan mayor cantidad de MC y mayor área triptasa+ (43 cel/mm²; 1453,03) que las mamas normales (4,6 cel/mm; 408,49) p<0,005 y p< 0,02, respectivamente. b- Se observa menor área de triptasa+ en los carcinomas con metástasis ganglionar linfática (909,19) comparado con los que no tienen metástasis (1757,59) p< 0,02. En cambio no hay diferencia significativa en el número de MC (42 y 44 cel/ mm² respectivamente). c- El 85 % de los carcinomas mamarios presentaron franca actividad gelatinolítica. En este grupo, la actividad proteolítica se correlacionó con la expresión de TNF α (Spearman's rho= 0,334 p< 0,02) y con el área de marcación triptasa + (Spearman's rho= 0,449 p < 0,04). En las mamas normales no se detectó actividad gelatinolítica ni expresión de TNF α . Los resultados sugieren que la menor área de triptasa en los carcinomas con metástasis es atribuible a degradación de los mastocitos. La citoquina proinflamatoria TNF α conjuntamente con la triptasa de los mastocitos considerada una potente gelatinasa, favorece la degradación de la MEC y la invasión tumoral en el cáncer mamario.

- 213 (471) RELACIÓN ENTRE VELOCIDAD DE CRECIMIENTO, AGRESIVIDAD Y EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 EN UN MODELO DE LINFOMA MURINO.** Zacarías Fluck M.¹; Salatino M.²; Hess L.³; Rabinovich G.⁴; Scharovsky O.⁵

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET, Ciudad de Buenos Aires²; Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR³; Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET, Ciudad de Buenos Aires⁴; Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR⁵ <marianozacarias@hotmail.com>

El linfoma L-DGE apareció espontáneamente en un ratón BALB/c y es mantenido por pasajes s.c. en ratones singéneos. Desarrolla metástasis ganglionares durante el crecimiento tumoral en baja frecuencia. Galectina-1 (Gal-1) es una proteína inmunoreguladora de unión a glicanos que juega un papel importante en la tolerancia inmunológica. Su sobreexpresión se asocia con la progresión maligna del tumor. Previamente habíamos demostrado que mediante un proceso de selección se obtuvo una variante del linfoma L-DGE caracterizada por una mayor velocidad de crecimiento (V) y capacidad metastásica que sobre-expresa galectina-1 en tumor primario (Tu), denominada L-DGE/M. El objetivo de este trabajo fue profundizar el estudio de este modelo y obtener una variante del linfoma de crecimiento lento (L-DGE/L) y estudiar su expresión de Gal-1. Se desafiaron 12 hembras BALB/c con L-DGE, vía s.c. (día 0). Se seleccionó como donante para L-DGE/L el tumor con menor V al día 21 y este procedimiento se repitió durante 16 pasajes consecutivos. Se estudió el crecimiento y la expresión de Gal-1 en L-DGE/L por WB. Además, se estudió la expresión de Gal-1 en Tu y metástasis (Met) de L-DGE/M por WB y qRT-PCR. La tasa de crecimiento de L-DGE/L fue menor que la de L-DGE (p=0,0423). La expresión de Gal-1 en Tu fue menor para L-DGE/L que para L-DGE (p=0,0133). Por otro lado, se encontró una disminución del 20% en la expresión de Gal-1 en Met de L-DGE y L-DGE/M respecto al Tu pero sin alcanzar

el significado estadístico. Respecto de L-DGE, la sobreexpresión de Gal-1 en Tu L-DGE/M se observó a nivel proteico pero no en ARNm, mientras que en Met se encontró una sobre-expresión de la proteína y del ARNm. Se logró obtener dos variantes del linfoma, una más agresiva que sobre-expresa Gal-1 en Tu y posee una alta capacidad metastásica, y una variante de crecimiento lento que sub-expresa Gal-1 en Tu sugiriendo una relación causal entre velocidad de crecimiento y expresión de Gal-1.

214 (175) CUANTIFICACIÓN DE LINFOCITOS CD4 Y CD8 EN LA ESTROMA TUMORAL DE CARCINOMAS MAMARIOS Y SU RELACIÓN CON LA QUEMOQUINA CXCL9. Di Girolamo V.¹; Coronato S.²; Chambó J.³; Laguens G.⁴

Facultad de ciencias médicas de la UNLP^{1 2 3 4}
<vdigirol@med.unlp.edu.ar>

La estroma que rodea los tumores malignos humanos presenta un infiltrado celular compuesto por linfocitos, mastocitos, macrófagos y células dendríticas, además de diferentes citoquinas y quemoquinas que interactúan con las células estromales y tumorales e intervienen en el comportamiento del tumor. El objetivo de nuestro trabajo fue cuantificar células CD4+ y CD8+ en el infiltrado celular de la estroma de carcinomas mamarios humanos y correlacionarlas con la presencia de la quemoquina CXCL9 (Mig), que tiene funciones quimiotácticas y angiostáticas. En biopsias en fresco de carcinomas mamarios (n=50) se realizaron técnicas de IHQ y de ELISA. Como controles se utilizaron biopsias mamarias provenientes de mamoplastias (n=10). Con la inmunomarcación de determinó y cuantificó la presencia de CD4+ y CD8+. En el sobrenadante de los homogenatos por medio de ELISA se investigó la presencia de Mig. La estroma de carcinomas mamarios presenta un elevado número de linfocitos comparada con mamas normales (p<0.001). El infiltrado de CD8+ supera ampliamente al de CD4+ (2:1) (p<0.0001). Mig se expresó en el 84% de los tumores, correlacionándose positivamente con CD8+ en los tumores que no presentaban metástasis (p<0.02). Las mamas normales no expresaron Mig. Conclusiones: Hay correlación entre la presencia de Mig y la afluencia de linfocitos CD8+ en los tumores sin metástasis, sugiriendo la posibilidad que estas células jueguen un papel importante en la inmunidad antitumoral, inhibiendo las metástasis.

215 (462) ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LOS GENES SUPRESORES DE TUMORES PTEN Y NUCLEOFOSMINA (NPM) EN LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS (LMA). Calvo K.¹; Mattaloni S.²; Divona M.³; Ammatuna E.⁴; Faraoni I.⁵; Pezzali S.⁶; García F.⁷; Lo Coco F.⁸; Noguera N.⁹

Instituto de Inmunología- Fac. Cs. Médicas- UNR; CONICET¹; IFISE-CONICET; Instituto de Inmunología- Fac. Cs. Médicas- UNR²; Departamento de Biopatología, Universidad de Tor Vergata- Roma- Italia^{3 4 5 6}; Instituto de Inmunología- Fac. Cs. Médicas- UNR; CONICET⁷; Departamento de Biopatología, Universidad de Tor Vergata- Roma- Italia⁸; Departamento de Biopatología, Universidad de Tor Vergata- Roma- Italia; CONICET⁹
<karinabioquimica05@yahoo.com.ar>

Introducción: NPM es una proteína multifuncional fundamentalmente nucleolar que trasloca del núcleo al citoplasma. Se reportó una variante mutada citosólica (NPMc+) en un 60% de pacientes adultos con LMA con cariotipo normal. NPMc+ perturba el desplazamiento de NPM normal (NPMwt) y de otras proteínas como Arf, importante en la respuesta supresora de tumor dependiente de p53. Por otro lado PTEN es una proteína de localización nuclear y citoplasmática, en citoplasma: inhibe la vía fosfatidilinositol-3kinasa y en núcleo: es supresora de tumores. En la Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) y en numerosos tumores PTEN se distribuye de modo aberrante en citoplasma. Hipótesis: NPMc+ podría influenciar la localización subcelular de otras proteínas supresoras de tumores por lo cual nos propusimos estudiar la interacción de NPMc+ y PTEN. Materiales y métodos: microscopía confocal en pacientes con LMA no LPA; ensayos de

inmunoprecipitación con anticuerpo anti-PTEN en células OCI (NPMc+) y THP1 (NPMwt); y microscopía confocal luego de la inducción de apoptosis en células OCI con distintas concentraciones de Doxorubicina (1, 3 y 6 µM). Resultados: en 36 pacientes se observó una asociación estadísticamente significativa (p= 0.014) entre la localización citoplasmática de PTEN y NPMc+, encontrándose PTEN citoplasmático en un 83% de los casos LMA NPMc+ y sólo un 37% en LMA NPMwt. NPM no se detectó en el inmunoprecipitado con PTEN. Se observó un incremento en la inducción de apoptosis en forma dosis dependiente (C= 2,2%; 1= 33,9%; 3= 59,9% y 6= 69,8%) y un aumento en la localización nuclear de PTEN a medida que aumenta la concentración de Doxorubicina. Conclusión: PTEN no sería deslocalizada al citoplasma a partir de una interacción directa con NPMc+ ya que ante un estímulo apoptótico éste se relocalizó en el núcleo, ejerciendo su posible función pro-apoptótica.

METABOLISMO Y NUTRICIÓN 2

216 (249) ACIDO α- LIPOICO: EFECTOS IN VIVO E IN VITRO EN RIÑÓN EN UN MODELO DE ENDOTOXEMIA. Cimolai M.¹; Vanasco V.²; Evelson P.³; Alvarez S.⁴

Programa De Radicales Libres En Biología (PRALIB-CONICET), Cátedra de Fisicoquímica. Facultad De Farmacia y Bioquímica, Universidad De Buenos Aires, Buenos Aires^{1 2 3 4}
<mccimolai@ffyb.uba.ar>

La endotoxemia es un proceso de inflamación aguda generalizada. Aun no se conoce el mecanismo molecular que conduce a la falla multiorgánica, que involucra alteraciones graves a nivel pulmonar, hepático, intestinal y renal. El ácido α-lipoico (LA) es un producto natural que participa en el metabolismo energético. Hemos demostrado previamente que el LA *in vivo* previene la disfunción mitocondrial en la endotoxemia. El objetivo del presente trabajo fue profundizar el estudio del efecto del LA *in vivo* y evaluar sus efectos *in vitro*, con el objetivo de dilucidar el mecanismo de acción de este compuesto en este modelo y en riñón. Ratas Sprague Dowley hembras fueron tratadas con LPS 10 mg/kg o coinyectadas con LA 100mg/kg. Los grupos de estudio fueron: control, LA, LPS, LPS + LA. Los ensayos *in vitro* se realizaron sobre riñón control utilizándose concentraciones de 0-1.5 mM LA. Se utilizó como muestra corteza renal. Estudios *in vivo*: en el grupo LPS se halló disminuida la actividad del complejo I (Control: 155±9 nmol/min.mgprot) e IV (Control: 348±31 nmol/min.mgprot) en un 32% (p<0.05) respecto al grupo control. La producción de óxido nítrico mitocondrial (NO) se encontró aumentada en 1.2 veces (Control: 0.345±0.039 nmolNO/min.mg.prot; p<0.05). El tratamiento con LA (grupo LA+LPS) previno estos cambios en todos los parámetros. No se han encontrado diferencias significativas en el daño oxidativo a lípidos en ninguno de los cuatro grupos. Por otro lado se evaluó el consumo de oxígeno en tejido renal y la expresión de la mtNOS por Western Blott. Estudios *in vitro*: No se encontraron diferencias significativas respecto al control para ninguno de los parámetros analizados, indicando que los efectos del LA no son directos sobre la cadena respiratoria. Los resultados demuestran que el ácido lipoico es una alternativa válida para prevenir la disfunción mitocondrial observada en la endotoxemia y además, sugieren que el LA no ejerce efectos directos sobre la cadena respiratoria.

217 (348) ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS 2 Y 9 DE TEJIDO ADIPOSO EN INSULINO-RESISTENCIA. Miksztoicz V.¹; Zago V.²; Lucero D.³; Gamba C.⁴; Friedman S.⁵; Schreier L.⁶; Berg G.⁷

Lab. de lípidos y lipoproteínas. Dpto. Bioq. Clínica Facultad de Farmacia y Bioquímica. INFIBIOC-UBA^{1 2 3}; Cátedra de Bioquímica General y Bucal. Fac. de Odontología. UBA^{4 5}; Lab. de lípidos y lipoproteínas. Dpto. Bioq. Clínica Facultad de Farmacia y Bioquímica. INFIBIOC-UBA^{6 7}
<veronica_mik80@hotmail.com>

Las metaloproteasas (MMP) 2 y 9 son colagenasas sintetizadas en distintos tejidos, actúan degradando la matriz extracelular; en el tejido adiposo intervienen en la angiogénesis. La administración aguda de insulina no solo regularía la actividad de lipoproteína lipasa (LPL) de tejido adiposo (TA) sino también la de MMPs. Recientemente se asoció a MMPs con la inactivación de LPL en el endotelio. Objetivo: Evaluar actividad de MMP2 y 9 y de LPL en el TA de un modelo de IR temprana. Ratas macho Wistar recibieron 12 sem dieta estándar, subdivididas en 2 grupos, control (C n=6) y DRS (n=6) al cual se le suministró sacarina 30% en agua. En sangre se determinaron parámetros metabólicos como indicadores de IR. Se removió y pesó TA visceral, se midió actividad lipolítica y gelatinolítica en TA epididimal. DRS presentó aumento de insulina: $3,31 \pm 2,27$ vs C: $0,73 \pm 0,36$ ng/ml $p < 0,03$, manteniendo glucemias sin diferencias, aumento de triglicéridos (TG) séricos: 159 ± 45 vs 69 ± 19 mg/dl $p < 0,006$. Ácidos grasos libres fueron mayores en DRS: $0,8 \pm 0,1$ que en C: $0,5 \pm 0,2$ mM $p < 0,05$. DRS mostró aumento de TA visceral $15,1 \pm 2,8$ vs $8,4 \pm 2,3$ g $p < 0,008$, y disminución de MMP2: 4274 ± 2700 vs 7603 ± 1800 Unidades Arbitrarias (UA) y MMP9: 4100 ± 2800 vs 8500 ± 2900 UA, $p < 0,05$. LPL fue menor en DRS ($11,2 \pm 1,8$ vs $14,5 \pm 0,8$ mU/g TA, $p < 0,03$) y mostró correlación directa con MMP9 ($r = 0,81$, $p < 0,01$) e inversa con TG/HDL ($r = -0,77$, $p < 0,02$). MMP9 mostró una tendencia inversa con TG/HDL ($r = -0,55$, $p = 0,08$). La disminución de LPL y MMPs en ratas DRS, muestra que su actividad en TA estaría modulada negativamente por la IR desde sus primeros estadios. La correlación directa entre ambas enzimas descartaría el posible efecto de MMPs sobre la inactivación de LPL.

218 (594) ALTERACIONES EN LA LOCALIZACIÓN Y NIVELES HEPÁTICOS DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA FRENTE A LA ADMINISTRACIÓN DE AGENTES PORFIRINO-GENICOS. Sampayo R.¹; Lavandera J.²; Meiss R.³; Batlle A.⁴; Buzaleh A.⁵

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET¹; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET²; Departamento de Patología, Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina³; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET⁴; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET⁵ <ro_sampa@hotmail.com>

La óxido nítrico sintetasa (NOS) juega un rol relevante en la regulación fisiológica en mamíferos. Esto se debe a que el óxido nítrico (NO), sintetizado por esta enzima, modula la vasodilatación y la captación de oxígeno mitocondrial además de ser un factor anti-apoptótico. Sin embargo, la síntesis desregulada de NO puede llevar a muerte celular por daño oxidativo en la membrana mitocondrial. Cobra importancia, entonces, el nivel intracelular de hemo que, siendo cofactor de la NOS, regularía la producción de NO. De hecho, una teoría que explica el deterioro neurológico en el ataque agudo en las Porfirias está relacionada con la deficiencia de hemo. La reducción en el pool de hemo libre puede producirse por exposición a ciertos fármacos como los anestésicos. Teniendo en cuenta nuestros resultados previos, donde la actividad hepática de la NOS mitocondrial (mtNOS) se modificó frente a la administración de anestésicos volátiles y otros agentes porfirinogénicos, nos propusimos, entonces, estudiar si también producían alteraciones sobre los niveles de mtNOS o la localización celular de la isoforma "neuronal" (nNOS). Por Western Blot observamos que la mayoría de los tratamientos redujo los niveles de mtNOS: 70-80% ($p < 0,01$) con Veronal, Enflurano e Isoflurano agudo, Griseofulvina (Gris) tópica y etanol; y 40% ($p < 0,05$) por allisopropilacetamida y ayuno. El Isoflurano crónico cuadruplicó los niveles de mtNOS ($p < 0,01$) y se duplicaron por Gris oral ($p < 0,05$). El Enflurano crónico no afectó. El estudio inmunohistoquímico reveló que el Enflurano crónico ha duplica-

do el porcentaje de hepatocitos con nNOS en citosol y reducido la proporción de células con nNOS nuclear. Esto hablaría de una redistribución subcelular de esta enzima, además de un posible aumento en su síntesis. Las alteraciones sobre la NOS en hígado podrían afectar las funciones metabólicas de este tejido y, posiblemente, producir un daño sistémico severo a nivel vascular por una desregulación en la síntesis de NO.

219 (138) "EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS N-3 DE ORIGEN VEGETAL EN DISLIPEMIA E INSULINO RESISTENCIA EXPERIMENTAL". Rossi A.¹; Lombardo Y.²; Chicco A.³

Dpto de Cs. Biológicas, FBCB, UNL, Santa Fe.^{1 2 3} <arossi@fcb.unl.edu.ar>

Ratas alimentadas crónicamente con dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipemia, insulino resistencia e incremento de triglicéridos (Tg) hepáticos. La sustitución de la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz -AM- por semilla de chíca (Salvia hispánica L.: Salba) rica en 18:3 n3 (19%p/p), normaliza la dislipemia disminuyendo la esteatosis hepática. Objetivo: Analizar la actividad de enzimas hepáticas relacionadas con la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos para determinar su participación en la disminución de los Tg hepáticos en los animales alimentados con chíca. Metodología: Ratas macho Wistar, peso inicial 200g, fueron alimentadas con: Lote 1: dieta control (DC) (p/p: almidón 65.9%, AM 11%, proteínas 15%), Lote 2: DRS (sacarosa 65.9%, AM 11%, proteínas 15%). Luego de 3 meses, el Lote 2 fue dividido aleatoriamente en dos subgrupos: uno continuó con DRS y en el otro se sustituyó la fuente de grasa (AM) por semilla de chíca (Lote 3: DRS + chíca) hasta completar el período experimental (5 meses). El lote 1 continuó con DC hasta el 5to mes. En cada lote se analizó: plasma, 1) niveles de Tg, ácidos grasos, insulina y glucosa; hígado, 2) contenido de Tg y actividad de enzimas lipogénicas y oxidativas: Sintetasa de ácidos grasos (SAG), Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH), Acetil-CoA carboxilasa (ACC), Carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) y Oxidasa de ácidos grasos (FAO). Resultados: La presencia de chíca en la dieta revirtió la dislipemia y disminuyó los niveles de Tg en hígado ($p < 0,05$). Estos cambios se acompañaron de una disminución de las actividades SAG, G6PDH y ACC ($p < 0,05$) junto a un aumento de las actividades CPT-1 y FAO ($p < 0,05$) en hígado. Estos resultados sugieren que el alto contenido de ácidos grasos n-3 de la semilla de chíca, junto a su importante contenido de fibras, podría ejercer un efecto beneficioso sobre la homeostasis de lípidos y glucosa en el modelo experimental de dislipemia y resistencia insulínica inducido nutricionalmente.

ONCOLOGÍA 3

220 (319) INTERACCIÓN ENTRE RECEPTORES DE ESTRÓGENO Y RECEPTORES DE PROGESTERONA EN CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL Giulianielli S.¹; Gorostiaga M.²; Lanari C.³

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3} <giulianelli@dna.uba.ar>

El tumor murino hormono-dependiente C4-HD, crece *in vivo* en ratones BALB/c sólo en presencia de acetato de medroxi-progesterona (MPA), y expresa altos niveles de receptores de estrógeno *alfa* (RE α) y de progesterona (RP). Demostramos que los RP son esenciales para el crecimiento tumoral, y que paradójicamente, el mismo es inhibido por estrógenos o por antiestrogénicos. Se sabe que el RE α y el RP pueden interactuar a nivel citosólico, sin embargo hemos demostrado una interacción nuclear entre ambos receptores en tumores creciendo con MPA. Postulamos que esta interacción nuclear es necesaria para la proliferación celular mediada por progestágenos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el mecanismo de esta interacción en cultivos primarios de células epiteliales C4-HD (Epi-HD) y en la línea de cáncer de mama humano T47D, ambas estimuladas por MPA. Por inmunofluorescencia (IF) y microscopía confocal, demostramos

que el tratamiento con 10nM de MPA por 5, 10 y 30 minutos, aumenta la co-localización nuclear entre RP y RE α ($p < 0.001$) en ambos tipos celulares. Ensayos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos nucleares, corroboraron estos resultados. Se demostró además que MPA induce fosforilación del RE α en Ser118 y Ser167, y el pegado del mismo a su secuencia consenso de respuesta en el ADN (ERE), en Epi-HD. Finalmente, observamos interacción nuclear entre ambos receptores fosforilados (pSer118 RE α y pSer294 RP), luego de 15 minutos en presencia de MPA ($p < 0.001$). Los resultados demuestran que la interacción física entre RE α y RP, en el núcleo celular, es dependiente de MPA. Este mecanismo sería necesario para activar respuestas proliferativas mediadas por progestágenos. Estos resultados apoyarían el uso de antiestrógenos junto con antiprogéstágenos en cáncer de mama.

221 (544) RESPUESTA DIFERENCIAL AL TRATAMIENTO CON RETINOIDEOS DE LOS COMPONENTES LUMINALES Y MIOEPITELIALES EN LA LÍNEA TUMORAL MAMARIA MURINA LM38-LP. Campodónico P.¹; Farias E.²; Bal De Kier Joffé E.³; Todaro L.⁴

Instituto de Oncología¹; Mount Sinai School of Medicine NY USA²; Instituto de Oncología "A. H. Roffo"³ <pcampod@yahoo.com>

Los retinoides (Rds) son de gran interés en los ensayos clínicos de tratamiento y prevención de cáncer debido a su rol en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. El objetivo es investigar el papel de la vía de señalización de los Rds en la interacción entre células luminales (LEP) y mioepiteliales (MEP) de la línea mamaria murina LM38-LP. Esta línea celular expresa todos los receptores retinoides y los mismos son funcionales. Frente al tratamiento con Rds, esta línea celular respondió con un aumento de células senescentes (SA-b-Gal, microscopía) en el compartimiento MEP y apoptosis (ensayo Anexina V) en el LEP. Este efecto fue revertido cuando las células fueron tratadas con un antagonista de RAR α . Empleando anti E-caderina/Inmunobeads, se separaron en forma transiente los compartimientos LEP y MEP de LM38-LP. Determinamos que el tratamiento con Rds indujo un aumento significativo de RAR β sólo en las células LEP (RT-PCR). El tratamiento con Rds aumentó la capacidad de adhesión de la línea mixta tanto a fibronectina (recuento celular, $41 \pm 12\%$ de células adheridas Control vs $92 \pm 6\%$ ATRA) como a BSA ($7 \pm 2\%$ control vs $34 \pm 7\%$ ATRA). En cuanto a los dos componentes de la línea, sólo indujo un aumento en la adhesión a fibronectina del componente MEP ($41 \pm 13\%$ Control vs $76 \pm 20\%$ ATRA). El tratamiento con retinoides disminuyó parcialmente el número de células con alta actividad de la enzima ALDH (marcadora de células stem y progenitoras, ensayo Aldefluor, sustrato de ALDH conjugado a FITC, y marcación con anti CD133, $2,0 \pm 0,1\%$ células positivas en Control vs $0,5 \pm 0,1\%$ ATRA). Estos resultados sugieren que los Rds son capaces de inhibir el crecimiento, mediante eventos apoptóticos y arresto celular, y modular la adhesión de la línea LM38-LP en forma diferencial entre sus componentes y que RAR α estaría implicado. También sugieren la existencia de una población stem/progenitora en esta línea.

222 (612) EFECTOS ADITIVOS Y SINÉRGICOS DE LA COMBINACIÓN DE LA TERAPIA GÉNICA CON HIFN β Y DROGAS ANTINEOPLÁSTICAS. ESTUDIOS IN VITRO. Villaverde M.¹; Gil Cardeza M.²; Glikin G.³; Finocchiaro L.⁴

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo. Unidad de Transferencia Genética^{1 2 3 4} <roquetaoreias@yahoo.es>

La terapia génica con interferón beta (hIFN β) es una estrategia antitumoral más efectiva y menos tóxica que el tratamiento con la proteína recombinante (rhIFN β). Por otro lado, la combinación de drogas antineoplásicas para el tratamiento del cáncer es una herramienta ampliamente utilizada en la clínica, brindando, generalmente, mejores resultados que la monoterapia. Para

conocer la farmacodinamia del tratamiento genético del hIFN β en combinación con drogas antineoplásicas, nos propusimos estudiar sus efectos citotóxicos en dos líneas celulares altamente sensibles al interferón beta: i) M8 (melanoma humano) y ii) EW7 (sarcoma de Ewing). A tal fin, las células control y las lipofectadas con el plásmido β -gal o hIFN β fueron sembradas en monocapa o sobre una cubierta de agar sólido, como esferoides. Luego de 24 horas, se agregaron las distintas drogas antineoplásicas y, a los 5 días (monocapa) se determinó la viabilidad utilizando el reactivo MTS. Por otro lado, los esferoides se evaluaron a los 9 días, comparando alteraciones morfológicas y el diámetro de los mismos. Las monocapas de EW7 fueron más sensibles que las de M8 para seis de las ocho drogas evaluadas. La lipofección con β -gal o hIFN β potenció el efecto de BLM en monocapas de M8 ($p < 0.05$). Los esferoides de EW7 presentaron un claro efecto sinérgico hIFN β /BLM que no se observó en su monocapa ($p < 0.01$). En M8, la lipofección de hIFN β potenció la citotoxicidad de BTZ y VCN produciendo en ambos casos efectos sinérgicos ($p < 0.05$). La combinación hIFN β /CBP presentó efectos aditivos en ambas líneas ($p < 0.05$). Sorpresivamente en EW7, el gen del hIFN β actuó en forma antagónica al MTX. Los resultados obtenidos demuestran que la combinación de drogas antineoplásicas con la terapia génica del hIFN β podría ser más efectiva que los tratamientos individuales. El estudio de las características farmacocinéticas de estas combinaciones permitirá evaluar la factibilidad de la aplicación clínica de las mismas.

223 (646) 21-OH 6,19-EPOXYPROGESTERONA: UN NUEVO GLUCOCORTICOIDE DISOCIADO CON PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS PERO SIN EFECTOS ANTIAPOPTÓTICOS SOBRE CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS DE RATÓN TRATADAS CON QUIMIOTERÁPICOS. Orqueda A.¹; Veleiro A.²; Bal De Kier Joffé E.³; Kordon E.⁴; Burton G.⁵; Pecci A.⁶

LEGMA, IFIBYNE-CONICET, Depto de Química Biológica, FCEN, UBA¹; Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA²; Instituto de Oncología Ángel Roffo³; LEGMA, IFIBYNE-CONICET, Depto de Química Biológica, FCEN, UBA⁴; Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA⁵; LEGMA, IFIBYNE-CONICET, Depto de Química Biológica, FCEN, UBA⁶ <andresorqueda@yahoo.com.ar>

Los Glucocorticoides (GCs) son utilizados como coadyuvantes en el tratamiento de tumores sólidos con antineoplásicos como el paclitaxel (PXL) y la doxorubicina (DOXO). Sin embargo, estas hormonas pueden generar resistencia a la terapia probablemente al inhibir la apoptosis disparada por los quimioterápicos mediante la inducción de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-X $_L$. El objetivo del presente trabajo fue comparar los efectos del glucocorticoide Dexametasona (Dex) con los de 21OH-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP), un esteroide antagonista de la actividad transactivadora de los GCs pero agonista del efecto trans-represor sobre NF κ B. La acción de ambos esteroides sobre la apoptosis inducida por DOXO o PXL se comparó en células de la línea tumoral mamaria de ratón LM3 analizando la actividad de Caspasa-3 y la expresión de Bcl-2 y Bcl-X $_L$. Los resultados de ensayos utilizando el siRNA de BclX $_L$ muestran que la participación de esta proteína es relevante en la resistencia a DOXO generada por Dex. Por otro lado, contrariamente a Dex, 21OH-6,19OP no revierte la apoptosis inducida por los quimioterápicos DOXO (100% respecto al basal) o PXL (3 veces respecto al basal), ni modifica los niveles de Bcl-X $_L$ y Bcl-2. Sin embargo, 21OH-6,19OP tendría efectos antiinflamatorios dado que en la línea tumoral de epitelio pulmonar humano A549 inhibe la acción del Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) sobre la inducción de la expresión (medida por qRT-PCR) de los marcadores proinflamatorios Interleuquina-8 (IL-8) y Ciclooxigenasa-2 (COX-2). En su conjunto, los resultados indican que 21OH-6,19OP conservaría las propiedades antiinflamatorias de los GCs sin mantener sus efectos antiapoptóticos, surgiendo así como un posible candidato al tratamiento de tumores sólidos como el cáncer de mama.

- 224 (486) EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS HSP27 Y HSP70 EN LÍNEAS CELULARES DE ADENOCARCINOMA COLORECTAL DEFICIENTES Y NO DEFICIENTES EN HMLH1. Nadin S.¹; Cuello Carrión F.²; Ciocca D.³; Vargas Roig L.⁴

Laboratorio de Biología Tumoral, IMBECU, CCT Mendoza-CONICET¹; Laboratorio de Oncología, IMBECU, CCT Mendoza-CONICET^{2,3}; Laboratorio de Biología Tumoral, IMBECU, CCT Mendoza-CONICET⁴
<snadin@lab.cricyt.edu.ar>

Diversos trabajos han mostrado los efectos celulares de la hipertermia. Sin embargo, sus consecuencias no han sido estudiadas en células tumorales deficientes y no deficientes en hMLH1. La proteína hMLH1 es uno de los componentes del sistema de reparación de mal apareamiento de bases (Mismatch Repair: MMR). Tanto el sistema MMR como las proteínas de golpe de calor (HSPs) se relacionan con la resistencia a drogas antineoplásicas. En este trabajo, determinamos la expresión de HSP27 y HSP70 en las líneas celulares de adenocarcinoma colorectal humano HCT116 (hMLH1-deficiente, parental), HCT116+ch3 (hMLH1-no deficiente, complementada con el cromosoma 3), y HCT116+ch2 (control, complementada con el cromosoma 2). Las células fueron incubadas durante 1 hora a 41 y 42°C, un grupo fue recolectado inmediatamente luego del tratamiento térmico (tiempo 0, T0), y los otros grupos se dejaron recuperar a 37°C durante 4 y 24 hs (T4 y T24 respectivamente). Se evaluó la expresión de HSP27 y HSP70 por inmunocitoquímica y *Western blot* y el daño al ADN mediante *alkaline comet assay*. Luego del golpe de calor, observamos mayor expresión de HSP27 y HSP70 en la línea celular HCT116+ch3, en comparación con las líneas celulares deficientes en hMLH1. Se observó elevada acumulación nuclear de HSP70 en las células HCT116+ch3 luego del golpe de calor a 41 y 42°C. La hipertermia causó significativo daño en el ADN en las tres líneas celulares. Llamativamente, en la línea celular HCT116+ch3, el daño originado por el golpe de calor fue más severo (score 3: 31-60% de daño y score 4: 61-95% de daño). Por otra parte, a 42°C el daño observado en las células HCT116+ch3 fue superior al de la línea parental. Estos resultados preliminares demuestran por primera vez, la expresión diferencial de HSP27 y HSP70 en células tumorales deficientes y no deficientes en hMLH1 y constituyen el paso inicial para estudiar las posibles implicancias de estas proteínas en la citotoxicidad de los análogos de platino.

PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR 1

- 225 (63) PTH INHIBE LA SEÑAL DE SUPERVIVENCIA DE AKT EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO CACO-2: PARTICIPACIÓN DE LA FOSFATASA PP2A Y LA VÍA DEL AMPc. Calvo N.¹; Russo De Boland A.²; Gentili C.³

UNS - Depto. de Biología, Bioquímica y Farmacia.^{1 2 3}
<nrcalvo@criba.edu.ar>

AKT desempeña un rol central en la supervivencia celular, su fosforilación es estrictamente regulada, mediante la acción combinada de quinasas y fosfatasa. Previamente demostramos que la hormona paratiroidea (PTH) promueve la apoptosis en la línea celular Caco-2 y que modula la fosforilación de AKT en respuesta a la apoptosis mediante la serina/treonina fosfatasa PP2A. El objetivo de este trabajo es profundizar el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en los efectos de PTH en estas células intestinales. Ensayos de inmunoprecipitación mostraron que el tratamiento con PTH (10⁻⁸ M, 48 horas) induce la asociación de AKT con la subunidad catalítica de PP2A e incrementa su actividad fosfatasa. Utilizando microscopía confocal se observó que PTH promueve la translocación de PP2A del citosol a la mitocondria, resultados que fueron confirmados mediante aislamiento subcelular seguido de *Western blot*. La hormona disminu-

ye la viabilidad de estas células en un 56%, y el ácido okadaico (1nM), un inhibidor de PP2A, revirtió este efecto, sugiriendo que esta enzima participa en la viabilidad de las células Caco-2 dependiente de la hormona. Análisis por *Western blot* revelan que PP2A también desempeña un rol en la activación por PTH de caspasa-3 y la degradación de su sustrato PARP. Usando inhibidores específicos se demostró que la vía del AMPc contribuye a la desfosforilación de AKT y a la activación de PP2A inducidas por PTH, mientras que PKC y p38 MAP quinasa no participan en estos eventos. En resumen, estos resultados sugieren que la fosfatasa PP2A y la vía del AMPc actúan concertadamente para inactivar a AKT y provocar apoptosis en las células intestinales Caco-2 expuestas a PTH.

- 226 (183) REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE ATAXIA TELANGIECTASIA MUTADA (ATM), UNA PROTEÍNA CLAVE EN EL CONTROL DEL CICLO CELULAR Y LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN. Moiola C.¹; De Luca P.²; Vazquez E.³; De Siervi A.⁴

Departamento de Química Biológica, FCEyN - UBA. CONICET.^{1 2 3 4} <c_moiola@yahoo.com>

ATM es una quinasa que participa principalmente en la reparación del ADN y el control del ciclo celular, mediante la activación por fosforilación de diversas proteínas en respuesta al daño en la doble hebra del ADN. Mutaciones en este gen contribuyen a un aumento en la inestabilidad genómica. En próstata los polimorfismos de ATM se consideran un factor de riesgo para contraer cáncer y este riesgo se ve incrementado en los individuos portadores de mutaciones en BRCA1, siendo estos genes componentes del camino de señalización en respuesta al daño en el ADN. Sin embargo, hasta la fecha poco se conoce acerca de la regulación transcripcional de ATM. Nuestro objetivo es dilucidar qué factores y bajo qué condiciones ATM está siendo regulado en células tumorales de próstata. Estudios previos de nuestro laboratorio basados en inmunoprecipitación de la cromatina seguido de "arrays" de promotores (ChIP-chip) demostraron que las proteínas p300 y BRCA1 se unen al promotor de ATM. En el presente trabajo validamos este hallazgo mediante la técnica de ChIP y determinamos que las proteínas BRCA1 y p300 se unen al promotor de ATM en líneas celulares de cáncer de próstata. Mediante ensayos de genes reporteros y retrotranscripción seguida por PCR en tiempo real (RT-qPCR) detectamos que BRCA1 regula la transcripción en respuesta al daño genotóxico. Además, encontramos que el tratamiento con doxorubicina, produce una represión significativa de la transcripción de ATM. Más aún, en respuesta a la estimulación con hormonas, el receptor de andrógenos (AR), el factor de transcripción más importante asociado al cáncer de próstata, se une al promotor de ATM regulando su transcripción. Todos estos resultados sugieren que la regulación transcripcional del gen ATM es muy compleja y está gobernada por proteínas involucradas en diversos procesos celulares como BRCA1, p300 y AR.

- 227 (237) LA VÍA EXTRÍNSECA ESTÁ INVOLUCRADA EN LA APOPTOSIS DE ESPERMATOCITOS EN RATONES HÍBRIDOS CON FUSIONES ROBERTSONIANAS. Rodríguez V.¹; Díaz De Barboza G.²; Ponce R.³; Merico V.⁴; Garagna S.⁵; Tolosa De Talamoni N.⁶

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba^{1 2}; Química y Física Biológicas, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba³; Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Università degli Studi di Pavia, Italia^{4 5}; Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba⁶
<vrodriguez@biomed.uncor.edu>

El deterioro espermatogénico y las vías apoptóticas están involucradas en la esterilidad de ratones que presentan fusiones Robertsonianas. Anteriormente, demostramos en híbridos (2n=38)

que surgen del cruzamiento de ratones hembras *Graomys griseoflavus* (2n=34) y machos *Graomys centralis* (2n=42), que la vía intrínseca apoptótica está involucrada en la muerte de espermatocitos, exhibiendo redistribución de Bax y citocromo c que lleva a la fragmentación del ADN. En este trabajo evaluamos la participación de la vía extrínseca apoptótica en la muerte de células germinales y determinamos los niveles séricos de testosterona (T) de híbridos y parentales de 1, 2 y 3 meses (m) de edad. Se estudió la expresión de moléculas apoptóticas Fas, Fas-L y caspasa-3 y de la molécula antiapoptótica calbindina D_{28K} (CB) mediante técnica de inmunohistoquímica y análisis de Western blot. La fragmentación del ADN se evaluó por TUNEL. Los resultados mostraron mayor expresión de Fas, Fas-L, caspasa-3 y CB en los híbridos a los 2 y 3m en comparación con los parentales. Solamente los espermatocitos en paquitene evidenciaron tinción positiva para los marcadores apoptóticos y CB. El índice apoptótico alcanzó en los híbridos un valor de 78% y 44% a los 2 y 3m. En los parentales al mes de edad se encontraron espermatocitos (+) a TUNEL y a los demás marcadores que disminuyeron con el tiempo. Los niveles séricos de T fueron más bajos en los híbridos en comparación con los parentales. En conclusión, la alta expresión de Fas, Fas-L y caspasa-3 indican que la vía extrínseca estaría involucrada en una manera dependiente de caspasa en la muerte de las células germinales de ratones híbridos infértiles Robertsonianos. Los bajos niveles de T podrían contribuir al deterioro de la espermatogénesis. La presencia de CB en los espermatocitos sugiere un mecanismo de protección celular ante la muerte por apoptosis.

- 228 (286) EL SUPRESOR TUMORAL BRCA1 ATENUA LA RESPUESTA A ANDROGENOS REGULANDO DIRECTAMENTE AL PROMOTOR DEL ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA).** Zalazar F.¹; De Luca P.²; Cotignola J.³; Moiola C.⁴; Elguero B.⁵; Ferrando M.⁶; Vazquez E.⁷; De Siervi A.⁸

Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{1 2 3 4 5 6 7 8}. <fzalazar@qb.fcen.uba.ar>

El Antígeno Prostático Específico (PSA) es el más importante marcador clínico molecular del cáncer de próstata. El promotor de este gen está regulado por el Receptor de Andrógenos (AR) y sus ligandos. En su promotor se encuentran tres sitios de respuesta a andrógenos (ARE I, II y III). Al unirse el AR al sitio ARE III se reclutan co-reguladores, como p300 y p160, los que forman un complejo proteico que a su vez recluta a la RNA Pol II, y es utilizado como plataforma para transcribir a PSA. El objetivo de este trabajo es encontrar los co-reguladores de AR que se asocian al promotor de PSA. Recientemente demostramos que el supresor tumoral BRCA1 se une al promotor de PSA. En el presente estudio, utilizando la técnica de "ChIP scanning", localizamos el sitio de unión de BRCA1 a este promotor. Clonamos 3 fragmentos de dicho promotor río arriba del gen de la luciferasa; uno contiene 4,3 Kb río arriba del sitio de iniciación de la transcripción e incluye todos los sitios ARE (PSA 4,3Kb), los otros dos fragmentos fueron subclonados a partir de éste. Uno contiene solo el promotor proximal con los sitios ARE I y ARE II (PSA1,5Kb) y el otro contiene el "enhancer" distal con el sitio ARE III (PSA "1,5Kb). Utilizando estas construcciones encontramos que la co-transfección del plásmido de expresión de BRCA1 con el promotor de PSA 4,3Kb atenúa la inducción por andrógenos de este promotor. Cuando repetimos este ensayo utilizando los otros dos plásmidos subclonados encontramos un hallazgo muy interesante, BRCA1 regula solamente al PSA "1,5Kb. Estos resultados indican que BRCA1 regula la región que contiene el promotor distal de PSA que incluye el sitio más fuerte de respuesta a andrógenos (ARE III). Estos hallazgos confieren a BRCA1 un rol crucial en el cáncer de próstata. El desafío actual es dilucidar el mecanismo molecular subyacente y las consecuencias fisiológicas de esta regulación para facilitar el tratamiento y/o prevención del cáncer de próstata.

INMUNOLOGÍA 6

- 229 (821) INTERLEUKIN 4 MODULATES NEUROINFLAMMATORY RESPONSES IN VIVO.** Soria J.¹; Gaviglio E.²; Arroyo D.³; Rodríguez-galan C.⁴; Iribarren P.⁵

CIBICI-CONICET, Fac de Ciencias Químicas - UNC^{1 2 3 4 5} <javiersoria@fcq.unc.edu.ar>

Microglial cells (MC) are key immune cells within the central nervous system (CNS). They participate in CNS homeostasis being able to become activated once they contact exogenous and endogenous pro-inflammatory signals. After activation, MC coordinate the inflammatory responses to repair the CNS parenchyma, however, persistent activation may cause neurodegeneration. Anti-inflammatory cytokines such as IL-4 and IL-13 may induce "alternative activation" of MC which regulate neurotoxic inflammation. Here, we evaluated the effects of IL-4 on the CNS inflammatory response induced by systemic injections of lipopolysaccharide (LPS) on IL-4 KO mice. Our preliminary results indicate that MC isolated from IL-4 KO mice showed increased expression of MHC class II, CD80 and CD86 molecules than MC from wild type (WT) mice (p<0.05). After the LPS treatment the expression of costimulatory molecules on MC was higher than MC from non-treated mice (p<0.05). The expression of CD80 and CD86 in splenic CD11b+ cells was similar in IL-4 KO and WT. However, after LPS injections, the expression of MHC class II molecules was also increased in splenic CD11b+ cells from IL-4 KO mice compared to WT (p<0.05). These preliminary results suggest that IL-4 may be an important factor modulating CNS inflammatory response *in vivo*.

- 230 (743) PEPTIDOGLYCAN OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS INDUCES ATYPICAL CELL DEATH OF MICROGLIAL CELLS BY A CASPASE-3 INDEPENDENT PATHWAY.** Arroyo D.¹; Gaviglio E.²; Soria J.³; Rodríguez-galan M.⁴; Iribarren P.⁵

CIBICI-CONICET, Facultad de Cs. Químicas, UNC^{1 2 3 4 5} <daniarroyo@fcq.unc.edu.ar>

Microglial cells (MC) are involved in responses of the central nervous system (CNS) against infections, aseptic inflammation, injury and neurodegeneration. These cells are accumulated at sites of injury and became activated when they contact either endogenous or exogenous signals (pathogens). Our preliminary studies have shown that after prolonged stimulation of MC with peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* (PGN, TLR2 agonist) several neurotoxic factors (IL1b, TNFa, IL6 and nitric oxide (NO)) were produced and MC death was induced. However, the intracellular mechanisms involved in these effects were unknown. Our goal was to study the mechanisms responsible of the cell death induced by PGN. Kinetic studies of MC (BV2) treated with PGN showed the presence of AnnexinV/7AAD double positive cell staining and low levels of early apoptotic cells (AnnexinV+), suggesting the presence of necrosis. In addition, BV2 cells stimulated with PGN showed, by electronic microscopy, the presence of double membrane vesicles (compatible with the ultrastructure of autophagic vesicles) and strong vacuolization in the cell cytoplasm. These findings correlated with both a particulated pattern of cytoplasmic staining with Monodansylcadaverine (MDC) and with detection by western blot of clivated LC3B (LC3B II), in samples from PGN-treated BV2 cells. These effects were inhibited by the autophagy specific inhibitor, 3-Methyladenine (3 MA). Furthermore, we found a decrease of BCL-2 protein (apoptosis and autophagy negative regulator) expression. Moreover the effects of PGN were caspase 3 independent. These preliminary results suggest that PGN is able to induce atypical MC death, probably by induction of exacerbated autophagy in a caspase 3-independent manner.

231 (302) PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE FASCIOLA HEPÁTICA: PARTICIPACIÓN DE LECTINAS TIPO C EN SU INTERACCIÓN CON MACRÓFAGOS PERITONEALES. Guasconi L.¹; Serradell M.²; Masih D.³

Dpto Bioq Clínica, CIBICI-CONICET, FCQ-UNC, Córdoba, Argentina^{1 2 3} <lguasconi@fcq.unc.edu.ar>

F. hepática durante su ciclo de vida libera productos de excreción-secreción (PES) responsables de mecanismos de inmunomodulación en el hospedador. Previamente observamos que PES son capaces de inducir Macrófagos (MΦ) con propiedades inmunomodulatorias frente a un estímulo como LPS (aumento de IL-10 y Arginasa, disminución de nitritos y TNF) y que algunos de estos efectos se revierten parcialmente al preincubar las células con Laminarina e inhibidor de Syk. Por ello decidimos profundizar en el rol de receptores tipo lectina C como Dectin-1 y MR (receptor de manosa) en el reconocimiento de PES por MΦ peritoneales. MΦ peritoneales de ratones Balb/c normales fueron preincubados con Mannan (bloqueante para MR), anti-Dectin-1 o medio solo por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente las células fueron lavadas y estimuladas con PES, PES previamente tratado con manosidasa, LPS o medio solo por 48 h a 37 °C y 5% CO₂. Se determinó la actividad de Arginasa, producción de IL-10 y TGFβ, y la expresión de MR. Al preincubar las células con anti-Dectin-1 observamos una reversión parcial en el incremento de Arginasa ($p < 0,001$), TGFβ ($p < 0,04$) e IL-10 ($p < 0,004$), y al preincubarlas con Mannan y PES libre de residuos manosa observamos una reversión parcial en el incremento de Arginasa ($p < 0,01$, $p < 0,001$ resp) y TGFβ ($p < 0,001$, $p < 0,001$ resp). También observamos que PES induce un aumento en la expresión de MR en MΦ peritoneales. Estos resultados nos permiten concluir la participación de Dectin-1 y MR en la interacción de PES de *F. hepática* con MΦ peritoneales y en los efectos ejercidos por los mismos sobre estas células, hecho que nos permite seguir profundizando en las vías de señalización utilizadas por PES para modular la conducta de estas células de la inmunidad innata.

232 (472) MACRÓFAGOS CON CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS INTRACELULAR INHIBEN SUS FUNCIONES PROINFLAMATORIAS Y MODULAN LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA ANTICRIPTOCÓCCICA. Chiapello L.¹; Garro A.²; Spesso M.³; Masih D.⁴

CIBICI, CONICET; Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3 4} <chiapello@fcq.unc.edu.ar>

Cryptococcus neoformans y *C. gattii* son los agentes causales de criptococosis pulmonar o diseminada. Estas levaduras encapsuladas difieren en su fisiopatología, y la persistencia de *C. neoformans* en el hospedador dependería de su capacidad para sobrevivir intracelularmente en los macrófagos. El objetivo fue investigar si *C. neoformans* y *C. gattii* modulan la actividad proinflamatoria de macrófagos y los efectos de macrófagos con levaduras fagocitadas en la modulación de la respuesta de linfocitos de animales infectados. Los macrófagos se obtuvieron de lavados peritoneales o bronqueoalveolares de ratas Wistar o ratones Balb/c, luego de 3 h de adherencia en DMEM y 5 ig/ml de LPS. Posteriormente, se incubaron por 3 h con levaduras preopsonizadas. Luego de varios lavados e incubación por 24 h se determinó la producción de TGF-β₁, IL-10, INFγ, TNF y óxido nítrico (NO) por ELISA de captura o reacción de Griess. Por otra parte, se infectaron ratas o ratones vía intraperitoneal o intranasal con una suspensión de levaduras. Luego de 7 días se obtuvieron linfocitos de bazo (LB) o de nódulos linfáticos drenantes (NL). Los LB o NL se cultivaron con macrófagos tratados con levaduras, macrófagos o en medio solo, y luego de 7 días se estudió la respuesta proliferativa y la producción de citoquinas. Resultados: *C. neoformans* inhibió significativamente la producción TNF ($p < 0,002$) y NO ($p < 0,001$), e incrementó la producción de TGF-β₁ ($p < 0,02$) e IL-10 ($p < 0,05$) por macrófagos. *C. gattii* mostró una tendencia similar, pero los efectos moduladores fueron menos pronunciados respecto a *C. neoformans*. Se observó que

macrófagos con *C. neoformans* fagocitado suprimían la respuesta proliferativa de NL o LB ($p < 0,05$), con incremento de la producción de TGF-β₁ ($p < 0,003$) y disminución de TNF ($p < 0,01$). Conclusiones: *C. neoformans* luego de ser fagocitado, inhibe las funciones proinflamatorias de los macrófagos y estas células inhiben la respuesta de linfocitos T anticriptocócica.

233 (140) ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMATICOIDES E INCREMENTO EN SU ACTIVIDAD ANTI-HIV INDUCIDA POR CÉLULAS EPITELIALES. C F A Rodríguez Rodríguez 1, M Cabrini 1, J Sabatté 1, F Remes Lenicov 1, C Ana 1, J Geffner 1

¹Centro Nacional de Referencia para el Sida, Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina <crodriguez@fmed.uba.ar>

Las células dendríticas plasmacitoides (CDp) participan en la inmunidad anti-viral, gracias a su capacidad de producir altos niveles de IFN de tipo I en la fase aguda del proceso infeccioso. Se encuentran en órganos linfáticos secundarios, sangre y puerta de entrada de infecciones que afectan a las mucosas. Aquí, analizamos la actividad moduladora ejercida por células epiteliales sobre las CDp. Empleamos CDp aisladas de sangre periférica por selección positiva (Miltenyi) y las líneas celulares de colon Caco-2 y HT-29. Las CDp (1x10⁵) fueron cultivadas en ausencia o presencia de monocapas de células Caco-2 y HT-29. El co-cultivo con células Caco-2 y HT-29 por 24 h resultó en una expresión incrementada (intensidad media de fluorescencia) de CD86, CD40, HLA-DR y CD83 ($p < 0,01$ vs controles). La producción de citoquinas inflamatorias se mostró también incrementada: IL-1, 755pg/ml ± 131 vs 104pg/ml ± 307; TNF?, 1481pg/ml ± 723 vs 15pg/ml ± 5; IL-6, 423pg/ml ± 57 vs 138pg/ml ± 32; e IFN?, 9461pg/ml ± 1116 vs 118pg/m ± 64 vs (n=3, $p < 0,05$ vs controles). No observamos maduración fenotípica o estimulación de producción de citoquinas con sobrenadantes de células Caco-2 o HT-29, o cocultivos con líneas celulares no epiteliales. Evaluamos, por último, si el co-cultivo de las CDp con células HT-29 resultaba en una actividad anti-viral incrementada. Empleando células Ghost transfectadas con GFP, CD4 y CXCR4 observamos, por citometría de flujo, que las CDp co-cultivadas con células HT-29 mostraron una mayor actividad anti-viral: porcentaje de células GFP positivas = 93 ± 5 vs 64 ± 17 vs 40 ± 10, para células Ghost incubadas sin CDp, o con CDp no-preincubadas o preincubadas con células HT-29, respectivamente (n=3, $p < 0,01$, para CDp vs CDp pretratadas con HT29). Nuestros resultados sugieren que la funcionalidad de las CDp es susceptible de ser modulada por células epiteliales, en la puerta de entrada de infecciones virales que ingresan a través de las mucosas.

234 (611) MODULACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS POR EL SISTEMA COLINÉRGICO.

Vojacek L.¹; Lombardi G.²; Nahmod K.³; Jancic C.⁴; Sales M.⁵; Amaral M.⁶; Español A.⁷; Vermeulen M.⁸; Geffner J.⁹; Salamone G.¹⁰

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Argentina.¹; 2-CEFYBO-2^a Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA²; IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Argentina.^{3 4}; 2-CEFYBO-2^a Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA⁵; IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Argentina.⁶; 2-CEFYBO-2^a Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA⁷; IIHEMA, Academia Nacional de Medicina, Argentina.^{8 9 10} <ludmilavojacek@hotmail.com>

Acetilcolina (ACh) es el neurotransmisor por excelencia del sistema colinérgico. Media su acción a través de dos diferentes sistemas de receptores, los receptores muscarínicos (mAChR) y los receptores nicotínicos (nAChR). Previamente describimos la presencia de receptores muscarínicos en células dendríticas humanas (CD) y caracterizamos la presencia de acetiltransferasa (AChT), la enzima que cataliza la síntesis de ACh. En este traba-

jo analizamos el impacto del sistema colinérgico en la producción de citoquinas por CD. Los monocitos fueron purificados a partir de sangre periférica de dadores sanos no fumadores, por selección positiva (kit de CD14, Miltenyi, % pureza >95). Fueron diferenciados a CD por cultivo con GM-CSF + IL-4 por 5 días, en presencia o ausencia de carbacol (10^{-9} M), agonista estable de ambos receptores, muscarina (10^{-8} M), agonista selectivo de mAChR, nicotina (10^{-8} M), agonista selectivo de nAChR y neostigmina (20 μ M), inhibidor de la degradación de ACh endógena. Luego de 5 días de cultivo las células fueron incubadas en presencia o ausencia de LPS 0.5 μ g/ml durante 24hs. Analizamos la influencia del sistema colinérgico en la producción de las citoquinas IL-12p70, TNF- α e IL-6. Observamos una disminución significativa ($p < 0.01$) en la producción de IL-12 y de TNF- α cuando la diferenciación y maduración fue realizada en presencia de carbacol o nicotina, mientras que se encontró un incremento significativo ($p < 0.01$) en la producción de IL-12 y TNF- α al realizar los cultivos en presencia de neostigmina o muscarina. No se observaron diferencias en ninguno de los tratamientos en relación a la producción de IL-6. Estos resultados sugieren que la actividad proinflamatoria de las CD es regulada por el sistema colinérgico.

235 (496) IMPLICANCIA DE LAS VÍAS LINFÁTICA Y SANGÜÍNEA EN LA ENTRADA DE NEUTRÓFILOS A GANGLIOS LINFÁTICOS EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN INMUNE. Gorlino C.¹; Ranocchia R.²; Morón G.³; Maletto B.⁴; Pistoiresi M.⁵

CIBICI - Facultad de Ciencias Químicas^{1 2 3 4 5}
<cgorlino@fcq.unc.edu.ar>

Cuando ratones BALB/c son inmunizados s.c. con OVA más CFA (animales OVA/CFA) e inyectados con OVA-FITC en la almohadilla plantar se produce un flujo de neutrófilos OVA-FITC⁺ (Ne/OVA-FITC⁺) en los ganglios linfáticos drenantes (LN). El objetivo de este trabajo fue determinar el rol de las vías linfática y/o sanguínea en la entrada de Ne/OVA⁺ a los LN de animales OVA/CFA. El análisis por inmunofluorescencia de cortes histológicos de LN de animales OVA/CFA, obtenidos 6 horas después de la inyección en la pata con OVA-FITC, permitió observar la presencia de Ne/OVA-FITC⁺ en la luz de vasos linfáticos (LYVE-1⁺) y en la luz de vénulas del endotelio alto (MECA-79⁺). Para confirmar que Ne/OVA⁺ migran desde la piel hacia LN utilizando la vía linfática se realizaron experimentos de transferencia adoptiva. Para ello, Ne de médula ósea de animales normales fueron incubados *in vitro* con complejos inmunes (ICs: suero inmune de conejo anti OVA y OVA) o sin ICs y marcados con CFSE. Luego, se los inyectó en la pata izquierda de animales OVA/CFA o normales (la derecha recibió PBS) y 90 minutos después se extrajeron LN. Los resultados obtenidos por citometría de flujo en animales OVA/CFA fueron: LN izquierdo (Ne+ICs): $0,4 \pm 0,1\%$, LN derecho (PBS): $0,08 \pm 0,01\%$ ($p < 0,05$); Ne sin ICs: $0,07 \pm 0,01\%$, PBS: $0,035 \pm 0,003\%$ ($p < 0,05$ Ne sin ICs vs Ne+ICs) y en animales normales: LN (Ne+ICs): $0,005 \pm 0,003\%$ ($p < 0,01$ animales normales vs animales OVA/CFA). Para corroborar la implicancia de la vía endovenosa, se realizaron similares experimentos de transferencia pero inyectando i.v. Ne/DiIc₍₁₈₎-DS⁺. Los resultados en animales OVA/CFA fueron: Ne+ICs: $1,0 \pm 0,2\%$; Ne sin ICs: $0,31 \pm 0,06\%$ ($p < 0,05$); y en animales normales: Ne+ICs: $0,030 \pm 0,006\%$ ($p < 0,001$ animales normales vs animales OVA/CFA). Estos resultados demuestran que en nuestro modelo experimental los Ne llegan por vía linfática y por vía sanguínea a LN y que esta migración es dependiente de ICs y de la presencia de un estado inflamatorio.

236 (253) EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUEMOQUINAS EN POBLACIONES DE MONOCITOS DERIVADAS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS. Balboa L.¹; Romero M.²; Musella R.³; Castagnino J.⁴; Abbate E.⁵; Sasiain M.⁶; Alemán M.⁷

Il-Hema, Academia Nacional de Medicina^{1 2}; Servicio de Neumonología, Hospital Muñiz^{3 4 5}; Il-Hema, Academia Nacional de Medicina^{6 7} <luciana_balboa@hotmail.com>

Durante infecciones crónicas, tales como la Tuberculosis (TB), el pool de células dendríticas y macrófagos tisulares es renovado mediante el reclutamiento de progenitores mieloides y de monocitos (Mo) circulantes. Los Mo humanos se clasifican en dos poblaciones en función de la expresión de CD16: una población CD16- que es CCR2+, y otra CD16+ que es CX3CR1+/CCR5alto. El objetivo de este trabajo es caracterizar la expresión de receptores de quemoquinas en las poblaciones de Mo derivadas de pacientes con TB. Para ello, se aislaron las células mononucleares a partir de sangre periférica (SP) y de líquido pleural (LP) por gradiente de Ficoll-Hypaque. Se evaluó la expresión de moléculas de superficie en la región de Mo mediante citometría de flujo y se cultivaron 18 horas con o sin el agregado de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb, H37Rv), valorándose posteriormente la inducción de apoptosis por la unión de Annexina-V conjugada a FITC. Encontramos un aumento en el porcentaje de Mo CD16+ en SP de TB respecto a individuos sanos (N) (N=10 \pm 0.8; TB=27 \pm 2.5). Dicho incremento también se observó en LP derivado de TB comparado con pleuresías causadas por cáncer pulmonar (LP-TB=57 \pm 5; LP-CP=8 \pm 1). Los niveles de CCR2 y CCR5 fueron superiores en ambas poblaciones de Mo en TB ($p < 0.05$). Notablemente, los Mo CD16+ adquirieron la expresión de CCR2 y los CD16- la de CCR5 en TB ($p < 0.05$). Además, el LP libre de células indujo la expresión de CD16 y CCR5 en Mo de N ($p < 0.05$). Por otro lado, Mtb indujo apoptosis en ambas poblaciones de Mo por igual, por lo tanto el aumento de la población CD16+ en LP no puede explicarse por muerte selectiva de los Mo CD16-. En conclusión, los Mo CD16+ están incrementados en circulación y en el sitio de infección en pacientes con TB. Las poblaciones de Mo de TB presentan un patrón de expresión de receptores de quemoquinas diferente al de N. Resta por establecer si existe una migración diferencial de los Mo CD16+ hacia el LP.

237 (512) EVALUACIÓN DIRECTA DEL DAÑO PRODUCIDO IN VIVO POR RADIACIÓN UV A CÉLULAS DE LANGERHANS. Cela E.¹; Leoni J.²; González Maglio D.³

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{1 2 3} <ecela@ffybu.uba.ar>

La radiación ultravioleta (rUV) afecta directamente a las células de la epidermis, la capa exterior de la piel. Dentro de estas células se encuentran los queratinocitos, las células de Langerhans (dendríticas) y linfocitos T (en ratones LT γ δ). Los estudios del daño producido por rUV fueron realizados históricamente sobre los distintos tipos celulares aislados *in vitro*. El objetivo fue estudiar alteraciones mitocondriales en células de epidermis (células totales y células de Langerhans) de ratones expuestos a rUV. Dos grupos (uno irradiado con 400 mJ/cm² y otro control sin irradiar) de 6 ratones alopécicos (SKH:HR1) fueron utilizados para realizar una doble marcación con sondas fluorescentes: DiOC₆ (evaluación del potencial de membrana mitocondrial) y MitoSOX (evaluación de la producción mitocondrial de O₂^{•-}, mO₂^{•-}). Posteriormente se realizó una doble marcación sobre otros dos grupos de 5 animales (uno irradiado y uno control) utilizando DiOC₆ y anti-CD11c. Para las marcaciones se tomó una muestra de piel del lomo de los animales, se separó la epidermis utilizando dispasa y se obtuvo una suspensión celular por disgregación mecánica del tejido. No se observaron diferencias en la mO₂^{•-}, pero sí en la cantidad de células con mitocondrias polarizadas (funcionales) en la población total de células ($p < 0.01$). Al realizar la segunda marcación se observó una marcada disminución en los niveles de células CD11c⁺ con mitocondrias polarizadas en los animales irradiados ($p < 0.01$). Es posible determinar directamente el daño producido en las células de la epidermis mediante la utilización de sondas fluorescentes. Las células de la epidermis (tanto la población total como las CD11c⁺) pierden la funcionalidad mitocondrial luego de la exposición de los animales a rUV. La posibilidad de medir directamente el daño sobre células tomadas de los animales permitirá el estudio de la protección de distintos tipos celulares por tratamientos como protectores solares, antiinflamatorios, y otros.

238 (629) EL LEUCOTRIENO C4 POTENCIA LA CAPTACIÓN ANTIGÉNICA A TRAVÉS DE SU ACCIÓN SOBRE LOS RECEPTORES LTRI Y LTRII EXPRESADOS EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS. Alvarez C.¹; Amaral M.²; Nahmod K.³; Geffner J.⁴; Vermeulen M.⁵

Lab Inmunología Academia Nac. Medicina^{1 2 3 4 5}
<mvermeulen@hematologia.anm.edu.ar>

Los cisteinil-leucotrienos (C4, D4 y E4) son mediadores lipídicos derivados del ácido araquidónico. Son potentes mediadores inflamatorios secretados por los mastocitos, basófilos, eosinófilos y macrófagos. Actúan como potentes espasmógenos y promueven la secreción de moco. Previamente, demostramos que el leucotrieno C4 (LTC4), incrementa la expresión de CD86 y la captación antigénica por las células dendríticas (CD). El objetivo de este trabajo, fue profundizar en los mecanismos involucrados en esta modulación. Las CD se obtuvieron a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 en presencia de GM-CSF. Las CD se incubaron con antagonistas de los receptores LTB1 o LTB2 (1µM) por 1 h, se lavaron y se trataron o no con LTC4 (0.01µM) por 30 min. a 37°C, y se analizó la internalización de Dextran-FITC (DX) y zymozán-FITC (Zy) por citometría de flujo. Encontramos que el bloqueo del receptor LTB1 con el antagonista montelukast (Mtk) revirtió el incremento en la captación de Zy en CD tratadas con LTC4 (media de la intensidad de fluorescencia (IF) ±ES; Ct: 180 ±15; LTC4, 249±21; Mtk, 157±15; Mtk+LTC4, 174±13, n=4; pd<0.05. Por el contrario, la endocitosis de DX fue parcialmente bloqueada por los antagonistas de ambos receptores. Luego, evaluamos los mecanismos a través de los cuales el LTC4 potencia la captación antigénica. Observamos que el empleo de manano (Mn), un inhibidor del receptor de manosa, contrariamente a lo esperado, incremento la captación de DX en CD tratadas con LTC4, alrededor del 15% vs CD LTC4 no incubadas con Mn. Finalmente, estudiamos las principales vías de activación en CD. Llamativamente, encontramos una potente inducción de P-p38 cuando las CD fueron expuestas al LTC4 por 30 min, por el contrario no encontramos activación de ERK1/2 ni Akt. Los resultados podrían indicar que las CD expuestas al LTC4 a través de la activación de la p38 adquieren un mayor potencial para captar el antígeno vía los receptores LTRI y/o LTRII.

239 (696) MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA LIBERACIÓN DE IL-1β POR NEUTRÓFILOS HUMANOS. Gabelloni M.¹; Fuxman Bass J.²; Geffner J.³; Salamone G.⁴; Catalano M.⁵; Trevani A.⁶

IIHema, Academia Nacional de Medicina; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{1 2}; IIHema, Academia Nacional de Medicina; Dpto de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA^{3 4}; Dpto de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA⁵; IIHema, Academia Nacional de Medicina; Dpto de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA⁶ <lauragabelloni@gmail.com>

La IL-1β es liberada por el procesamiento proteolítico de su precursor, la pro-IL-1β. En distintos tipos celulares, la estimulación de receptores citosólicos de tipo NOD por productos microbianos o señales de daño endógeno conduce a la formación de un inflammasoma, que recluta y activa a la caspasa-1, la enzima responsable del procesamiento de la pro-IL-1β. También, la pro-IL-1β podría ser procesada por mecanismos independientes de caspasa-1, aún no caracterizados. En este trabajo evaluamos la capacidad de los neutrófilos humanos de producir IL-1β y los mecanismos moleculares involucrados. Los neutrófilos pre-tratados con LPS liberaron IL-1β en respuesta a ATP, PMA, sobrenadante de cultivo del patógeno *P. aeruginosa* (SCPa) y frente al co-cultivo con la bacteria entera (pg/ml IL-1β detectados por ELISA: 15±6; 85±25; 521±85; 361±43; 231±49; 218±55; para medio, LPS -200 ng/ml-, LPS+PMA 20 ng/ml; LPS+ATP 2mM; LPS+5% SCPa o 10⁷ bacterias/ml, respectivamente; n=6, p<0,05). La liberación de IL-1β inducida por todos los agonistas excepto

el PMA, fue significativamente reducida por el inhibidor II de caspasa-1 (% inh. 19±4; 59±13; 76±6; para PMA, ATP y SCPa, respectivamente; n= 8, p<0,05). El pre-tratamiento de neutrófilos con DPI (inhibidor de NADPH oxidasa) redujo marcadamente la producción de IL-1β inducida por PMA y SCPa, mientras que el pre-tratamiento con catalasa, que degrada el H₂O₂ producido por activación de la NADPH oxidasa, incrementó su liberación inducida por ATP, PMA y SCPa. En conjunto, nuestros resultados sugieren que los neutrófilos liberan IL-1β por un mecanismo que involucra la actividad de la caspasa-1, aún cuando no descartan que un mecanismo independiente de caspasa-1 también pueda ser operativo. Al menos en respuesta a PMA y SCPa, la liberación de IL-1β parece requerir la activación de la NADPH oxidasa y, a su vez, los intermediarios reactivos del oxígeno podrían ejercer un mecanismo regulatorio negativo de la liberación de IL-1β.

240 (780) INHIBIDOR DE PROTEASAS TIPO KUNITZ DE FASCIOLA HEPÁTICA: ROL SUPRESOR EN LA ACTIVACIÓN INICIADA POR LIGANDOS TOLL EN CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS. Falcón C.¹; Carranza F.²; Cervi L.³

CIBICI, Dpto. Bioquímica Clínica Facultad de Cs. Químicas, UNC^{1 2 3} <cfalcon@fcq.unc.edu.ar>

La interacción de un patógeno con células dendríticas (CD) determina el estado de madurez de estas células, evento clave para definir el perfil de respuesta adaptativa. Los antígenos de helmintos en general, no producen maduración clásica en CD y modulan la activación de estas células por ligandos de TLR. Resultados previos mostraron que antígenos de un extracto total (TE) de *Fasciola hepatica* inhiben las señales de activación inducidas por LPS en CD murinas. El objetivo de este trabajo fue identificar el componente del parásito *F. hepatica* capaz de inhibir las señales de activación de CD iniciada por ligandos de TLR. Se realizó un fraccionamiento de TE, obtenido a partir de gusanos adultos de hígados bovinos infectados, por cromatografía de tipo FPLC. De las diferentes fracciones obtenidas, una de bajo PM (FVII), presentó actividad inhibitoria de la producción de TNF por CD de médula ósea de ratones BALB/c estimuladas con LPS (p< 0.05). Por el contrario una fracción de alto PM (FI) estimuló por sí misma la producción de TNF. CD tratadas con la FVII y FI presentaron niveles de TNF mas bajos que las CD estimuladas solo con FI. El análisis de FVII por electroforesis SDS-PAGE mostró la presencia de dos bandas de 6,5 y 13 kDa, las cuales revelaron un 90% de homología con un inhibidor tipo kunitz de *F. hepatica*, lo que representaría monómero y dímero de la misma proteína. Demostramos también que la vía JAK-STAT3 estaría involucrada en la inhibición de la producción de IL-12p70 por antígenos del parásito, ya que el uso de un inhibidor de esta vía (AG490), revirtió parcialmente la supresión ejercida por TE sobre la activación de las CD por LPS, incrementando los niveles de IL-12p70 (p<0.05). Los resultados muestran que un inhibidor de proteasas tipo kunitz encontrado en *Fasciola hepatica*, presenta propiedades inmunomoduladoras de la activación de CD por ligandos TLR, lo cual tendría una proyección como una molécula inmunosupresora de respuestas inflamatorias.

241 (689) RESPUESTA DIFERENCIAL DE LOS ASTROCITOS FRENTE A CANDIDA ALBICANS EN CULTIVOS ALTAMENTE ENRIQUECIDOS O EN PRESENCIA DE MICROGLIA. Figueredo M.¹; Renna M.²; Sotomayor C.³

CIBICI-CONICET^{1 2 3} <maurifig_@hotmail.com>

Las células residentes del Sistema Nervioso Central (SNC) constituyen los principales elementos de respuesta temprana frente a la invasión de este órgano por un agente infeccioso. Microglia (M) y astrocitos (As) forman parte de esta población y, si bien numerosas publicaciones confirman el rol de las primeras en diferentes modelos experimentales in vitro, el papel de los As continúa siendo controversial debido a la heterogeneidad de los resultados producto del escaso consenso en las técnicas de obtención e inadecuado control en la pureza. El objetivo de nuestro tra-

bajo fue estudiar la respuesta de los As frente al hongo *C. albicans* y a ligandos de receptores innatos implicados en su reconocimiento (LPS, PGN, Zymosan) en un modelo in vitro, estrictamente controlado, utilizando cultivos primarios (ratas Wistar) altamente enriquecidos en astrocitos (As >95%, M<1%, FACS), astroglioma C6 y cultivos mixtos de células gliales (As75-85% y M 10-15%). La secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF α e IL-1 β en sobrenadantes de cultivos estimulados durante 24h (ELISA) no evidenció diferencias frente a los distintos estímulos, tanto en As enriquecido como en la línea C6. Mientras que se observó un aumento significativo de estas citoquinas en cultivos mixtos bajo las mismas condiciones ($p<0.05$). La acumulación de nitritos presentó un comportamiento similar. Interesantemente el agregado de medios condicionados provenientes de cultivos mixtos estimulados con el hongo, a cultivos enriquecidos en As, fue capaz de aumentar en ellos la expresión de TNF α e IL-1 β , la enzima iNOS y el receptor TLR-2 (RT-PCR). Resultados preliminares confirman un comportamiento similar en cultivos primarios murinos. Estos hallazgos indican que los As carecen de una alta reactividad por sí mismos, sin embargo bajo condiciones inflamatorias o en presencia de otras células del SNC, serían capaces de contribuir al desarrollo de una respuesta temprana frente a un microorganismo agresor como *C. albicans*.

242 (358) UNA RESPUESTA INMUNE HUMORAL ESPECÍFICA DETERMINA LA PRESENCIA DE NEUTRÓFILOS CARGADOS CON ANTÍGENO EN GANGLIOS LINFÁTICOS.

Maletto B.¹; Gorlino C.²; Ranocchia R.³; Zamory S.⁴; Morón G.⁵; Pistoresi M.⁶

CIBICI (CONICET) Facultad de Ciencias Químicas UNC^{1 2 3 4 5 6} <belkys@fcq.unc.edu.ar>

Los neutrófilos (Ne, Ly6G^{high}) son las principales células OVA-FITC⁺ reclutadas en los ganglios linfáticos drenantes (LN) en ratones inmunizados con OVA más CFA (animales OVA/CFA) e inyectados en la almohadilla plantar con OVA-FITC. El desarrollo de este infiltrado no requiere una respuesta inmune específica de linfocitos T. El objetivo de este trabajo fue analizar si el desarrollo del infiltrado de Ne en LN requiere de una respuesta humoral específica para OVA y/o de un estado inflamatorio. Para ello, ratones inmunizados con PBS/CFA fueron inyectados i.p. (días 25 y 26) con suero inmune de animales OVA/CFA (problema) o con suero no-inmune (control). Los ratones fueron inyectados (día 27) en la pata con OVA-FITC y a las 6 horas se evaluó la presencia de Ne/OVA-FITC⁺ en LN. Los resultados se expresan como % de células OVA-FITC⁺ en la población de Ne: problema:79 \pm 4, control:6 \pm 2; $p<0.05$. Para estudiar la especificidad de la respuesta humoral requerida, ratones inmunizados con PBS/CFA fueron inyectados i.p. (días 25 y 26) con suero inmune de ratones KHL/CFA (grupo I y II) o suero no inmune (III). En el día 27 fueron inyectados en la pata con KHL-FITC (grupo I) o OVA-FITC (grupo II y III) y a las 6 horas se evaluó la presencia de Ne/FITC⁺ en LN. Los resultados (expresados como % de células OVA-FITC⁺ o KHL-FITC⁺ en la población de Ne) fueron: grupo I:96 \pm 6, grupo II:4 \pm 1 y grupo III:6 \pm 2 ($p<0.05$ grupo I vs II). Para estudiar la participación del estado inflamatorio se siguió el mismo esquema experimental. Ratones normales inyectados con suero inmune de ratones OVA/CFA (problema) o con suero no-inmune (control) fueron desafiados con OVA-FITC en la pata. Los resultados se expresan como % de células OVA-FITC⁺ en la población de Ne, problema:87 \pm 5, control:14 \pm 8, $p=0.002$. Estos resultados nos permiten concluir que el infiltrado de Ne/FITC⁺ en LN requiere una respuesta inmune humoral específica de antígeno pero es independiente del estado inflamatorio del animal.

243 (373) CÉLULAS MIELOIDES GR1+CD11B+ INDUCIDAS EN ANIMALES VIEJOS POR ADMINISTRACIÓN DE CPG-ODN SUPRIMEN LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T MEDIANTE ARGINASA. Ranocchia R.¹; Gorlino C.²; Harman M.³; Morón G.⁴; Maletto B.⁵; Pistoresi M.⁶

CIBICI(CONICET)-Facultad de Ciencias Químicas-UNC^{1 2 3 4 5 6} <ranocchia@fcq.unc.edu.ar>

Recientemente demostramos que CpG-ODN in vitro, en presencia de IFN- γ , es capaz de estimular arginasa en macrófagos, enzima cuya inducción ha sido descrita bajo el estímulo de citoquinas Th2. Cuando estudiamos el efecto de la administración in vivo de CpG-ODN en ratones de 18 meses de edad (viejos), observamos que se induce una respuesta inmunosupresora en bajo, caracterizada por supresión de la proliferación de linfocitos T (Li T) ($p<0.05$), aumento de células mieloides (Gr1⁺CD11b⁺) (Normal (N): 4,1 \pm 0,3% vs CpG-ODN: 9,0 \pm 0,4 %, $p<0.01$) y alta actividad de arginasa (N:15,2 \pm 8,6 vs CpG-ODN: 199 \pm 30 mU arginasa/mg proteína, $p<0.05$). Con el objetivo de determinar el potencial inhibitorio de estas células mieloides, células Gr1⁺CD11b⁺, purificadas de bajo de ratones viejos que recibieron (día -10) 100 μ g de CpG-ODN en IFA s.c., fueron cocultivadas con Li T de ratón joven sin tratamiento obtenidos por selección positiva con Ac anti-CD90 y estimulados con anti-CD3/CD28. Así, Li T cocultivados en presencia de células Gr1⁺CD11b⁺ de animales viejos, desafiados con CpG-ODN, exhibieron una disminución en la proliferación comparado con Li T cocultivadas con Gr1⁺CD11b⁺ de animales viejos no tratados o cultivadas solas ($p<0.05$). Además, el antagonista de arginasa Nor-NOHA inhibió la supresión de la proliferación de Li T causada por células Gr1⁺CD11b⁺. Estos resultados indican que la administración de CpG-ODN a animales viejos induce células mieloides con capacidad de ejercer un efecto supresor de la proliferación de Li T y que esto ocurre a través de un mecanismo que involucra a arginasa. Si bien el estímulo con CpG-ODN permitiría inducir una óptima respuesta inmune en animales viejos, la inducción de células mieloides supresoras sería uno de los mecanismos regulatorios de la acción inmunoestimulante de CpG-ODN que estarían contribuyendo en limitar la intensidad y extensión de la respuesta inmune.

244 (599) EFECTO DE BACILLUS SUBTILIS PROBIÓTICO SOBRE EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO Y LA RESPUESTA HUMORAL. Goñi A.¹; Saball E.²; Salvarrey M.³; Rovetto A.⁴; Mendez M.⁵; Grau R.⁶

Departamento de Microbiología, Fac Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, CONICET-Rosario^{1 2 3 4 5 6} <anibaljuangoni@yahoo.com.ar>

La diseminación de la resistencia a antibióticos constituye uno de los principales problemas en los tratamientos de infecciones. *Bacillus subtilis* natto (BSN) probiótico es capaz de esporular de una manera Spo0A-dependiente y gracias a su capacidad para colonizar la mucosa intestinal podría generar una barrera de protección contra patógenos en reemplazo del uso de antibióticos promotores del crecimiento. En este trabajo se estudió el efecto de BSN como promotor de crecimiento y su efecto sobre la respuesta inmunológica. La promoción del crecimiento resultó significativamente mayor con respecto a grupos controles tanto en animales de laboratorio (ratas) como de granja (pollos) alimentados diariamente con 10¹⁰ esporas de BSN/kg de alimento. Los índices de morbilidad y mortandad fueron también mejores para los tratamientos con BSN. Para investigar sobre las bases de este efecto probiótico decidimos indagar el comportamiento del sistema inmunológico. BSN fue capaz de activar in vitro todas las vías del sistema del complemento. Estudios de ELISA contra C3 unido covalentemente a la superficie de BSN puso de manifiesto un rol esencial del factor transcripcional de BSN Spo0A para la activación del complemento. Esta activación llegó hasta C5 convertasa y no se detectó unión a C9, lo que indicaría que BSN proficiente en Spo0A (pero no en mutantes Spo0A deficiente) es opsonizado y luego fagocitado por macrófagos, para la presentación de antígenos y activación de la inmunidad humoral. Esto fue corroborado al evaluar la respuesta de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero en pollos alimentados con esporas de BSN probiótico. En pollos alimentados con suplementos de BSN el título de anticuerpos anti-GRC fue de 210 \pm 20 mientras que en el grupo control fue de 50 \pm 15 ($p<0.05$). Por lo tanto BSN es capaz de estimular las respuestas innata y específica, ambas dependientes del factor de transcripción Spo0A, arrojando luz sobre su mecanismo de acción como probiótico esporulado.

244b. (351) ADMINISTRACIÓN PREVENTIVA DE BACTERIAS LÁCTICAS EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS CON CICLOFOSFAMIDA. ESTUDIO DE CÉLULAS LINFÓIDES DE MÉDULA ÓSEA. Salva S.¹; Villena J.²; Herrera M.³; Barbieri N.⁴; Pacheco V.⁵; Alvarez S.⁶

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET)¹; Instituto de Bioquímica Aplicada. Universidad Nacional de Tucumán²; Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET)^{4,5,6}. <jcvillena@cerela.org.ar>

En estudios previos se demostró que el tratamiento preventivo con bacterias lácticas (BL) inmunomoduladoras, disminuye los efectos adversos asociados a la mielosupresión inducida por la ciclofosfamida (CF). En este trabajo se evaluaron los cambios en la población linfóide de médula ósea (MO) y sangre (S) posteriores a la quimioterapia, y se estudió la influencia de tratamientos preventivos con BL probióticas a ese nivel. Diferentes grupos de ratones albino-suizos fueron alimentados con *Lactobacillus casei* CRL431 (Lc) o *L. rhamnosus* CRL1506 (Lr) durante 2 o 5d consecutivos respectivamente. Al finalizar cada tratamiento, estos grupos y ratones controles sin tratar (C), recibieron una inyección intraperitoneal de CF (150 mg/kg). Los estudios se realizaron a diferentes tiempos post-quimioterapia. En S y MO se evaluó el n° total de linfocitos y las poblaciones linfoides B y T por citometría de flujo, para lo cual se analizó la expresión de B220, CD3, CD4 y CD8. La administración de CF indujo una severa reducción de linfocitos en MO y S en todos los grupos. Los ratones tratados con Lc y Lr mostraron una recuperación más temprana de estas células en MO, retornando a los valores normales a los 7d y 14d respectivamente, a diferencia del grupo C, que se recuperó recién a los 21d. La CF disminuyó las células B (B220) en MO y S. Sólo el grupo tratado con Lc normalizó el n° de dichas células desde los 7d en MO ($p < 0,05$), a expensas de un aumento de linfocitos B inmaduros (B220low) ($p < 0,05$). Además, el grupo Lc presentó mayores valores de células B (B220) en S con respecto al grupo C. La CF indujo disminución de células T (CD3) en S y MO, sin alterar la relación CD4/CD8. Los tratamientos con BL no tuvieron influencia a este nivel durante el periodo estudiado. La administración de BL inmunomoduladoras, previo a un tratamiento quimioterapéutico, permitiría la recuperación temprana de la población linfóide B en médula ósea. Dicho efecto sería dependiente de la cepa de BL utilizada.

244c. (721) REDUCCIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD DE UN AISLADO PROTEICO DE SOJA MEDIANTE LA ACCIÓN HIDROLÍTICA DE BACTERIAS LÁCTICAS. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO SENSIBILIZADO SUBCUTÁNEAMENTE CON PROTEÍNAS DE SOJA. Aguirre L.¹; Maldonado Galdeano C.²; Garro M.³; Savoy De Giori G.⁴

CERELA (Centro de Referencias para Lactobacilos)¹; CERELA (Centro de Referencias para Lactobacilos); UNT Fac.Bqca., Qca. y Fcia. Cát. Inmunología²; CERELA (Centro de Referencias para Lactobacilos)³; CERELA (Centro de Referencias para Lactobacilos); UNT Fac.Bqca., Qca. y Fcia. Cát. Microbiología Superior.⁴ <laguirre@cerela.org.ar>

La soja, rica en proteínas e importante en nutrición, contiene compuestos alergénicos que producen elevados niveles de IgE en pacientes sensibles. Distintos procesos (hidrólisis enzimática, tratamiento térmico y/o ultrafiltración) se aplican para disminuir su alergenicidad. El uso de bacterias lácticas (BAL), con efecto benéfico (probiótico) en el huésped, constituye una alternativa tecnológica innovadora. El objetivo de este trabajo fue evaluar la reducción de la inmunoreactividad de las proteínas de soja mediante su hidrólisis por acción de BAL. Se desarrolló un modelo murino sensible a la proteína de soja. Para ello se utilizaron ratones Balb/c que fueron inmunizados subcutáneamente con 100 mg de un aislado proteico de soja (APS). Los ratones sensibilizados dieron un incremento (47%) de IgE específica, medida por ELISA directo, con respecto al control. La inmunoreactividad se evaluó en APS, APS calentado (80°C 20 min) y sus correspondientes hidrolizados. Estos últimos se obtuvieron tratando los sustratos

proteicos con suspensiones concentradas (30X) de *Lactobacillus* (L.) *paracasei* subsp. *paracasei* (L. *paracasei*) CRL 207, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581 y *L. helveticus* CRL 1062. Los sustratos proteicos (APS y APS calentado) y la suspensión celular (relación 2:1) se incubaron a 37°C, 24 h, tomando muestras a diferentes tiempos. La unión de IgE con APS y con los hidrolizados, evaluada por ELISA directo, mostró una relación directa entre el grado de hidrólisis y la reducción de la inmunoreactividad. Todas las cepas de BAL fueron capaces de disminuir la inmunoreactividad del APS siendo *L. paracasei* CRL207, el microorganismo más efectivo (77% de reducción a las 24 h). El uso de APS calentado como fuente proteica en presencia de las BAL no mejoró la reducción de la inmunoreactividad respecto al APS sin tratar. El uso de BAL constituiría una innovación tecnológica para la obtención de alimentos potencialmente hipoadérgicos de soja.

NEUROCIENCIAS 2

245 (29) ESTUDIO DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR LAS VARIANTES NORMAL Y MUTADA DEL RECEPTOR P2X7. Aprile García F.¹; Liberman A.²; Senin S.³; Paezpereda M.⁴; Stadler H.⁵; Acuña M.⁶; Gerez J.⁷; Refojo D.⁸; Panhuysen M.⁹; Sillaber I.¹⁰; Stühmer W.¹¹; Holsboer F.¹²; Arzt E.¹³

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET, Bs.As, Argentina^{1,2,3}; Affectis Pharmaceuticals, Martinsried, Alemania^{4,5}; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET, Bs.As, Argentina^{6,7}; Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania⁸; Affectis Pharmaceuticals, Martinsried, Alemania^{9,10}; Instituto Max Planck de Medicina Experimental, Göttingen, Alemania¹¹; Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania¹²; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET, Bs.As, Argentina¹³ <fapirle@fbmc.fcen.uba.ar>

Los receptores P2X7 son canales de calcio activados por ATP conformados por subunidades de dos pasos de membrana que se asocian como homo o heterotrímeros. Su largo dominio citoplasmático activa una cascada de transducción de señales, que incluye a la MAPK ERK 1/2. Mediante distintos estudios genéticos se encontró que pacientes con trastornos depresivos poseen con una incidencia significativa, una variante polimórfica del gen P2X7, encontrada en el aminoácido 460 (Gln460Arg). El objetivo de este trabajo consiste en investigar cómo estos cambios en la secuencia aminoacídica de P2X7 afectan la función del receptor. Se estudió el ingreso de calcio extracelular por P2X7 en la línea celular HEK293 comparando clones estables para P2X7, para P2X7 con la mutación en Gln460Arg y clones coexpresores de ambas variantes, mediante microscopía de fluorescencia utilizando la técnica de Fluo 4-AM y el rol de la cascada de las MAPK mediante ensayos de Western Blot. Se pudo observar que, en homocigosis, la variante mutada de P2X7 tiene la misma funcionalidad que el receptor WT, es decir, ambas variantes de P2X7 producen un marcado aumento de calcio intracelular (800% respecto a HEK293 parental, $p < 0,01$) al ser activados con BzATP (50 μ M), un análogo de ATP, específico para receptores P2X7. Cuando ambas subunidades fueron coexpresadas se produjo una marcada disminución en la entrada de calcio (60% respecto a HEK P2X7-WT, $p < 0,001$). A su vez, células que expresan una sola variante de P2X7 mostraron una marcada activación de la MAPK ERK 1/2, mientras que la activación en células coexpresoras de ambas variantes de P2X7 fue marcadamente menor. Este fenómeno se produjo tanto en células HEK293 sin P2X7 endógeno transfectadas establemente con las subunidades de P2X7, como en células gliales con P2X7 endógeno transfectadas con la variante mutante del receptor. Estos resultados fundamentan el

mecanismo de acción en heterocigosis en presencia de la variante mutada de P2X7.

246 (76) PREGNENOLONA SULFATO PROMUEVE LA LIBERACIÓN DE GABA EN NÚCLEO SEPTAL LATERAL DE RATAS MACHO ADULTAS. Nanfaro F.¹; García S.²; Casas S.³; Giuliani F.⁴; Escudero C.⁵; Bazzocchini V.⁶; Cabrera R.⁷; Yunes R.⁸

Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, LINCE - IMBECU - CONICET^{1 2 3 4 5 6 7 8} <fnanfaro@gmail.com>

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que el esteroide neuroactivo (ENA) pregnenolona sulfato inyectado en la estructura límbica denominada núcleo septal lateral (NSL) impide el reconocimiento de objetos novedosos. EL NSL, rico en somas gabaérgicas, recibe eferencias glutamatérgicas del hipocampo y se comunica con este a través del septum medial. Interviene en la discriminación de objetos novedosos -tarea hipocampo-dependiente- que resulta de la tendencia innata del roedor de explorar su medio ambiente. En este estudio examinamos la modulación in vitro de la liberación de GABA por pregnenolona (Preg) y pregnenolona sulfato (Preg-S) en NSL. El efecto de los ENA se evaluó midiendo la liberación de GABA-H⁺ estimulada por K⁺ 20 mM en cortes de NSL, empleando la técnica de superfusión dinámica. Los reactivos empleados fueron: Preg 1.2 µM, Preg-S 1.2 µM y solución salina como control. La liberación de GABA-H⁺ se expresó como porcentaje de liberación respecto a la liberación basal, y fue analizada estadísticamente aplicando el test de Kruskal-Wallis. En condiciones basales la liberación de GABA fue 35.5% (SEM±1.68). El uso de Preg no modificó los valores con respecto al control (38±3.5). Por su parte, la administración de Preg-S incrementó significativamente la liberación de GABA-H⁺ con respecto al basal (52.6±4.2; p<0.05). Estos resultados muestran que el NSL incorpora eficientemente el neurotransmisor GABA. Adicionalmente, la liberación de dicho neurotransmisor es modulada positivamente por Preg-S pero no por Preg. Lo expresado sugiere que las modificaciones comportamentales previamente reportadas pueden estar relacionadas con la modulación gabaérgica por Preg-S en NSL, resultando en la imposibilidad de reconocer objetos familiares. Sugerimos que en las especies en las que existan las formas sulfatadas y no sulfatadas de estos ENA, la condición de sulfatación del mismo puede resultar en una suerte de "switch" molecular.

247 (207) LOCALIZACIÓN DE FUENTE EPILEPTOGENA EN UN PACIENTE CON ESCLEROSIS HIPOCAMPAL Y DISPLASIA CORTICAL FOCAL. Seifer G.¹; Blenkmann A.²; Consalvo D.³; Princich J.⁴; Muravchik C.⁵; Kochen S.⁶

Laboratorio de Epilepsia - IBCN - Conicet - UBA^{1 2 3 4} ; LEICI, Facultad de Ingeniería, Universidad de La Plata, La Plata, Argentina⁵ ; Laboratorio de Epilepsia - IBCN - Conicet - UBA⁶ <seifergustavo@yahoo.com.ar>

Introducción: Las técnicas de localización de fuente podrían facilitar la evaluación prequirúrgica en la epilepsia refractaria y patología dual (esclerosis hipocampal (EH) derecha y una displasia cortical focal (DCF) temporal posterior derecha). Dado un registro de EEG se denomina problema inverso a la estimación de las fuentes de corriente dentro del cerebro que producen estas señales. Objetivos: Establecer la distancia entre los dipolos y las lesiones vistas en resonancia magnética nuclear. Material y Método: Paciente mujer de 21 años, diestra, con antecedentes de crisis febriles y epilepsia refractaria desde 9 meses. Semiología ictal: a. sensación de deja vu, inmovilidad, ruptura de contacto, giro cefálico lento a izquierda y automatismos bimanuales, b. sensación de inestabilidad. IRM de encéfalo: esclerosis hipocampal (EH) derecha y una displasia cortical focal (DCF) temporal posterior derecha. Se utilizó el modelo de dipolo de corriente equivalente (ECD) en un paciente candidato a cirugía, portador de una patología dual. Se seleccionó Actividad paroxística interictal (API) de EEG de 64 canales. Se digitalizó la posición de los electrodos

a partir de un lápiz electromagnético (Polhemus). Utilizando el programa BESA se obtuvo un ECD para cada API y luego fueron transportados a las reconstrucciones 3D de IRM (Brain Voyager2000). Finalmente se analizó la distribución de los dipolos y su distancia a la lesión. Resultados: Se obtuvieron 83 dipolos de localizados en el polo temporal derecho, con una distancia promedio con la EH 21mm. Conclusiones: La localización coincidió con el registro invasivo. La técnica de localización de fuentes es una herramienta prometedora en la evaluación prequirúrgica siendo menos costosa y agresiva.

248 (273) ACTIVACIÓN DE CASPASA-3 POR ANTICUERPOS ANTI-MUSCARÍNICOS EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN. Reina S.¹; Sterin-borda L.²; Passafaro D.³; Borda E.⁴

Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA^{1 2 3 4} <slreina@yahoo.com>

En las glándulas salivales de pacientes con Síndrome de Sjögren primario (SSp) se reportó una sobre-expresión de enzimas reguladoras del fenómeno apoptótico (FA), sugiriendo su participación en a la patogénesis del daño glandular en la enfermedad autoinmune. El objetivo de este trabajo fue investigar si los anticuerpos anti muscarínicos de pacientes con SSp disparan el FA en una línea celular A-253 del epitelio glandular salival humano. Por cultivo celular de la línea glandular humana A-253, por transferencia terminal de deoxinucleótidos (TUNEL) estudiamos la fragmentación del ADN y mediante la medición de la actividad de la caspasa-3 estudiamos la vía del FA. Se utilizó una inmunoglobulina G antipeptido M3 (IgG-M3), purificada por afinidad en presencia del péptido sintético correspondiente al 2do dominio extracelular del mAChR humano. La IgG-M3 fue capaz de incrementar el FA en las células A-253 de una manera concentración y tiempo dependiente (600%±50, n=8), siendo la concentración máxima de 1x10-9M en 48 hs. La IgG normal (10±2, n=7) o la fracción no anti-peptido (7±1, n=8) no mostraron efecto en el sistema estudiado. La IgG-M3 indujo el clivaje y la activación de la caspasa-3 (1.52±0.07, n=8), al igual que el agonista pilocarpina (0.07±0.06, n=7). En ambos casos el 4-DAMP (1x10-7M) (0.05±0.004, n=5) y el péptido M3 (1x10-7M) (0.05±0.002, n=6) inhibieron la acción de la IgG-M3 sobre el FA, sin ser modificado por el péptido no relacionado. La activación de la caspasa-3 inducida por la IgG-M3 fue bloqueada por inhibidor de la fosfolipasa C [U-73122 (5x10-6M)] (0.04±0.002, n=6), el inhibidor de la de la calcio-calmodulina [W-7 (5x10-6M)] (0.06±0.004, n=5) y por el inhibidor del flujo de calcio [verapamilo (5x10-6M)] (0.07±0.005, n=5). Nuestros resultados sugieren que los Ac IgG-M3 presentes en el SSp, tienen la capacidad de incrementar el FA en las células epiteliales glandulares de manera caspasa-dependiente y mediante la activación del sistema enzimático acoplado a los mAChR.

249 (381) ALTA RECURRENCIA FAMILIAR DE CONVULSIONES FEBRILES: DESCRIPCIÓN DE 20 SUJETOS AFECTADOS EN 2 FAMILIAS. Kauffman M.¹; Consalvo D.²; Pereira De Silva N.³; Kochen S.⁴

IBCN, Facultad de Medicina, UBA, CONICET^{1 2 3 4} <marcelokauffman@gmail.com>

Introducción y Objetivos: Aunque no es infrecuente el antecedente de la patología o de eventos comiciales en el grupo familiar de los sujetos con epilepsia, sí lo es la observación de familias que segregan el trastorno en un modo sugestivo de la existencia de una alteración monogénica. Largamente ha sido conocida la existencia de agregación familiar de las convulsiones febriles, presentándose ésta rara vez como un trastorno con alta penetrancia familiar. Nuestro objetivo es describir las características clínicas de 2 familias que muestran una alta recurrencia familiar de convulsiones febriles. Materiales y Métodos: Descripción clínica, neurofisiológica y genética de dos familias con alta recurrencia familiar de convulsiones febriles. Resultados: Una de las familias segrega convulsiones febriles simples, en al menos 2 generaciones, en 8 sujetos. Aisladamente se han presentado cri-

sis febriles más allá de los 5 años de edad, evidenciándose en todos los casos una excelente evolución sin requerimiento de terapéutica en la mayoría de los sujetos. En los casos analizados no se objetivaron alteraciones en las neuroimágenes y la electrofisiología. El patrón de herencia parece corresponder al de un trastorno autosómico dominante. La otra familia segrega convulsiones febriles y afebriles, en al menos 5 generaciones, en 12 sujetos con alta variabilidad intra-familiar en la respuesta al tratamiento farmacológico y la semiología de las crisis afebriles. El patrón de herencia autosómico dominante y la segregación de crisis febriles y afebriles sugieren un diagnóstico de epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus. Conclusión: Se presentan dos familias que segregan formas familiares monogénicas de convulsiones febriles.

250 (382) CARACTERIZACION GENETICO-MOLECULAR DE LA DISTONIA DE TORSION PRIMARIA (DPT) ASOCIADA AL GEN DYT1 EN POBLACION ARGENTINA. Perandones C.¹; Irrisarri M.²; Uribe Roca M.³; Pellene L.⁴; Calandra C.⁵; Caputo M.⁶; Alechine E.⁷; Corach D.⁸; Micheli F.⁹

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, ANLIS, Dr. Carlos G. Malbrán; Programa de Parkinson y Movimientos Anormales, Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA¹; Programa de Parkinson y Movimientos Anormales, Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA^{2 3 4 5}; Servicio de Huellas Digitales Genéticas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.^{6 7 8}; Programa de Parkinson y Movimientos Anormales, Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA⁹ <claudia.perandones@gmail.com>

La delección heterocigota (c.904_906delGAG) en el exón 5 del gen DYT1, es la mutación asociada al 85% de los casos de Dystonia Primaria de Torsión (DPT) de comienzo temprano. Sólo un 30% de los portadores de dicha delección son afectados. Se ha propuesto que los polimorfismos rs1801968 (D216H) y rs3842225 (758Gdel) ubicados en el exón 4 y en el extremo 3'UTR del gen, podrían modular la penetrancia de dicha mutación. Objetivo: Evaluar el rol potencial de los polimorfismos en la penetrancia de la delección c.904_906delGAG. Se incluyeron 33 individuos (distónicos 19 y familiares de primer grado sin distonía 14). El análisis de los loci en los 33 individuos se realizó mediante técnica de PCR de tiempo real (RT-PCR) y Desnaturalización Térmica de Alta Resolución (HRM). A fin de confirmar los resultados se procedió a la secuenciación automatizada de la mayoría de las muestras. Se detectó la delección GAG en el 42% de los pacientes con distonía y en la totalidad de los mismos la variante D216. En todos los grupos familiares se detectó al menos un familiar de primer grado asintomático con la delección GAG y sin la variante protectora 216H. En un grupo familiar constituido por un caso índice con distonía, una hermana con temblor y otra con Síndrome de Gilles de la Tourette, no se detectó la delección GAG, pero sí la presencia de la variante 216H. Conclusión: empleando un método de diagnóstico sencillo, confiable y específico se genotipificaron tres variantes del gen DYT1 involucradas en la DPT. Nuestros resultados preliminares han corroborado la baja penetrancia de la delección GAG y sugieren que la misma no podría atribuirse sólo al potencial efecto protector de la variante 216H. Nuestros hallazgos corroboran clínicamente, por primera vez, la hipótesis (basada en ensayos en líneas celulares) de que la variante 216H si bien ha mostrado ser protectora en presencia de la delección GAG, podría tener un rol patogénico predisponente en ausencia de la misma.

251 (461) EFECTO DE FLUOXETINA EN LA MEMORIA ESPACIAL DE RATAS CONTAMINADAS CON PLOMO. Vargas P.¹; Cruz M.²; Fracchia L.³

Cátedra de Metodología de la Investigación - Facultad de Medicina de la UNT^{1 2 3} <pavargas@uolsinetis.com.ar>

Estudios previos indicaron que la intoxicación crónica con plomo producía alteraciones permanentes en la dinámica de libera-

ción de serotonina de áreas cerebrales específicas involucradas en aprendizaje y memoria. Objetivo: Evaluar la memoria espacial luego de la inyección de Fluoxetina en ratas contaminadas con plomo. Metodología: Se estudiaron ratas Wistar machos tratadas desde el destete con 50 ppm de AcPb en el agua de bebida. Los controles (C) recibieron agua potable. Cumplidos 3 meses de tratamiento una parte de los animales con Pb y una parte de los controles fueron inyectados intraperitonealmente con 5 mg/kg de peso de Fluoxetina (F) durante 10 días. Se formaron así 4 grupos: Pb+F, Pb, F y C. Luego de la última inyección, se estudió la memoria espacial en el Laberinto Acuático de Morris, realizando una sesión de entrenamiento y luego la evaluación a los 5 minutos. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y se analizaron estadísticamente con el Test de Mann Whitney, considerando significativo $p < 0,05$. Resultados: Se observó un aumento significativo del tiempo en los ensayos de recuperación del grupo Pb respecto de C y F a los 5 minutos del entrenamiento (Pb 166 \pm 8 vs C 123 \pm 13 seg; $p=0,03$) y (Pb 166 \pm 8 vs F 55 \pm 17 seg; $p=0,0003$); mientras que no se encontró diferencias significativas entre Pb+F y C (Pb+F 90 \pm 26 vs C 123 \pm 13 seg; $p=0,1$). Conclusiones: Estos resultados confirman que el plomo estaría afectando el proceso de la memoria espacial a través de un mecanismo en el que interviene serotonina, ya que la administración intraperitoneal de Fluoxetina (inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina) logra modificar este efecto dando como resultado un desempeño semejante al grupo no tratado con este metal, lo que permitiría considerar nuevas formas de tratamiento de los efectos de la exposición crónica y a bajas concentraciones de Plomo. (Proyecto financiado por el Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán - CIUNT).

252 (552) EFECTO DE TIANEPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOCAMPAL DE RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES, ANSIEDAD Y ACTIVIDAD HEDÓNICA EN UN MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN. Trujillo V.¹; Durando P.; Suárez M.²

Cátedra de Fisiología Animal - FCFEYN - U.N.C.^{1 2} <vero.trujillo@yahoo.com.ar>

La regulación de los receptores de glucocorticoides (GR) es de gran importancia en la fisiopatología de los desordenes relacionados al estrés, tales como ansiedad y depresión. El hipocampo es una estructura que expresa gran cantidad de GR y es vulnerable a los efectos de las hormonas de estrés, a menudo elevadas en pacientes depresivos. Además en sujetos con esta patología existe una expresión disminuida de GR respecto a sujetos sanos. Tianeptina es un antidepresivo tricíclico que activa la recaptura de serotonina. El objetivo de este trabajo fue determinar los efectos del tratamiento crónico con tianeptina (10 mg/kg) sobre la ansiedad y la expresión de GR en el hipocampo. Se utilizaron ratas Wistar macho, las cuales fueron sometidas a un protocolo de estrés crónico variable durante 24 días. Este tratamiento es usado como modelo de depresión. Se realizó el test Plus Maze con el fin de evaluar los índices de ansiedad, mientras que para determinar el estado hedónico de los animales, una vez por semana se registró la cantidad bebida de agua y de una solución de sucrosa (1%) para calcular el consumo y la preferencia por la sucrosa. Los niveles de GR fueron determinados por inmunohistoquímica en las capas CA1, CA2, CA3 y Giro Dento del hipocampo dorsal. Nuestros resultados muestran que el estado depresivo produce un aumento significativo de los índices de ansiedad ($p < 0,05$), mientras que la droga no fue efectiva en revertir este efecto. Por otro lado, tianeptina muestra una tendencia a aumentar la expresión de GR en todas las capas analizadas, aunque esta tendencia fue más marcada en la CA1. No se observaron cambios en el estado hedónico de los animales con ninguno de los tratamientos. En conclusión, tianeptina muestra una interesante tendencia a revertir algunas de las alteraciones relacionadas a la depresión, en la regulación del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal, aunque sería necesaria una muestra mayor para encontrar resultados estadísticamente significativos.

253 (556) CONSECUENCIAS A LARGO PLAZO DE LA SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA Y EL ESTRÉS CRÓNICO EN ADULTOS SOBRE LA MEMORIA DE RECONOCIMIENTO DE OBJETOS Y LA ACTIVIDAD NEURONAL DEL HIPOCAMPO DORSAL EN RATAS. Rivarola M.¹; Suárez M.²

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales-Universidad Nacional de Córdoba^{1 2} <arivarola@efn.uncor.edu>

Durante las primeras etapas de la vida en los mamíferos, el medio ambiente y la interacción madre-hijo son esenciales para el normal desarrollo neuronal y conductual. Se ha demostrado que la exposición temprana a situaciones estresantes aumenta la vulnerabilidad a padecer psicopatologías en la vida adulta. La separación materna en etapas críticas del desarrollo postnatal en ratas, es un evento altamente estresante y se considera como un modelo que produce ansiedad, depresión e hiper-respuesta al estrés. Se conoce, además, que en los desordenes psiquiátricos relacionados al estrés, existen alteraciones de la memoria y aprendizaje. Por lo tanto resulta de enorme interés conocer los mecanismos neurobiológicos subyacentes a la interacción entre el estrés y los procesos cognitivos. En el presente trabajo se evaluaron los efectos de la separación materna sobre la memoria episódica y la actividad hipocámpica en respuesta al estrés crónico impredecible en ratas adultas. Ratas Wistar macho fueron separadas de su madre 4,5 horas diariamente durante las 3 primeras semanas de vida. A los dos meses de edad los animales fueron expuestos a un protocolo de estrés crónico variable de 24 días. Posteriormente se evaluó la memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo (15min) y a largo plazo (24hs), y la actividad neuronal en hipocampo dorsal mediante la determinación de la inmunoreactividad a FOS. Los resultados demostraron que la separación materna temprana afecta la memoria de reconocimiento a corto plazo e incrementa la actividad FOS en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo dorsal. El estrés crónico impredecible, en cambio, deteriora la memoria a largo plazo tanto en los animales criados como en los separados de su madre, sin repercusiones significativas sobre la actividad de las neuronas hipocámpicas. Podemos afirmar que estrés temprano y el estrés crónico de adultos afectan de manera diferencial diversos aspectos de los procesos mnémicos y la actividad nerviosa en hipocampo.

254 (692) FACTORES NEUROBIOLÓGICOS ASOCIADOS CON TRASTORNOS DEPRESIVOS EN EL EMBARAZO Y EL PUERPERIO. Fracchia L.¹; Vargas P.²; Cruz M.³; Hernando P.⁴; Albornoz L.⁵; Galindo L.⁶; Charubi J.⁷; Chahla R.⁸; Chaila Z.⁹; Santana M.¹⁰; Varela Bano A.¹¹

Cátedra de Metodología de la Investigación, Facultad de Medicina. UNTucumán^{1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11} <fracchia@amet.com.ar>

Las alteraciones en el estado del ánimo durante el posparto pueden ir desde el *blues* maternal a la psicosis. Las explicaciones para estos trastornos a menudo se centran en el brusco descenso de las hormonas luego del parto pero las evidencias son contradictorias. El objetivo del presente trabajo fue analizar factores neurobiológicos asociados con trastornos depresivos en el embarazo y el puerperio. En una cohorte de 446 madres primerizas concurrentes al Instituto de Maternidad y Obstetricia Ntra. Sra. de las Mercedes de San Miguel de Tucumán se identificaron dos grupos de 34 madres cada uno con una edad promedio de 20.4±4.6 años; ambos grupos se diferenciaron por presentar o no disturbios emocionales durante el tercer trimestre de la gestación (*Malaise Inventory*) y depresión entre la cuarta y sexta semana posparto (*Edimburgo Postnatal Depression Scale* y criterios diagnóstico del DSMIV). Previo consentimiento informado aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UNTucumán, se extrajeron muestras sanguíneas entre las 8 y 10 de la mañana. Se determinaron las siguientes variables, Prolactina (PRL) por IRMA; Cortisol (Co), Estradiol (E), Progesterona (P), β-HCG por RIA y por métodos enzimáticos Colesterol total (Ct). Los resultados mostraron que los niveles de PRL y Co estaban

significativamente elevados en el grupo con depresión tanto antes como después del parto ($pd \leq 0.001$), así mismo en este grupo se encontró las diferencias (Δ) para E y Ct significativamente altas con respecto al control ($pd \leq 0.05$), no observándose diferencias significativas para P y β-HCG. Aunque se necesita profundizar en esta línea de estudio, estas evidencias muestran una correlación entre los tests psicológicos y el perfil hormonal y a PRL, Co, E y Ct como potenciales marcadores biológicos de los trastornos del ánimo durante la gestación y el posparto.

255 (777) DINÁMICA CELULAR EN EL DAÑO HIPÓXICO NEONATAL SOBRE LA MIELINOGENESIS. Millet V.¹; Pasquini L.²

Depto de Química Biológica IQUIFIB Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2} <violemillet@gmail.com>

El daño hipóxico/isquémico es una de las principales causas de la Leucomalacia Periventricular, una lesión de la sustancia blanca periventricular vinculada con la disfunción neurológica en niños prematuros. Los estudios en roedores se han enfocado en la fisiopatología del daño neuronal mientras que el daño a la sustancia blanca ha recibido mucha menos consideración, aún cuando es el principal contribuyente a la disfunción neurológica. El modelo más usado emplea ratas P7 e involucra la ligadura de la arteria carótida y posterior exposición a tiempos variables de hipoxia. Por sus características anatómicas este modelo es de difícil realización en ratones y limita el uso de animales transgénicos. Recientemente ha sido publicada la utilización de un modelo en ratas P1 expuestas a 8% de PO₂ durante 2 h. Trabajamos con ratones C57BL-6 transgénicos que expresan EGFP bajo el promotor de una de las proteínas características de las células oligodendrogliales, 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPasa). Evaluamos proliferación, activación, diferenciación y apoptosis de células gliales en ratas y ratones CNPasa-EGFP sometidos por 2h a hipoxia a P1 y evaluados a P4, P14 y P21. Nuestros resultados muestran un daño sobre la mielinización por inmunohistoquímica de MBP y expresión de CNPasa-EGFP en el cingulum. Esta hipomielinización fue acompañada por activación astrogliar determinada por aumento de inmunotinción para GFAP en el cingulum y en cuerpo estriado, especialmente en el área perivascular. También se observó un aumento de células GFAP positivas en la zona subventricular (SVZ) sugiriendo un incremento en las células madre neurales. Además se observó un aumento en la proliferación celular en animales evaluados por incorporación de BrdU, especialmente en el cuerpo caloso, cingulum y SVZ. Nuestros resultados aunque no concluyentes indican que éste sería un buen modelo para estudiar los mecanismos que llevan al daño oligodendroglial en la hipoxia neonatal.

256 (377) ALTERACIONES DE LA ORGANIZACION DE LA SUSTANCIA BLANCA EN PACIENTES CON DISPLASIAS CORTICALES FOCALES (DCF) Y EPILEPSIA REFRACTARIA ESTUDIADOS CON TECNICAS DE TENSOR DE DIFUSION (ITD) EN RESONANCIA MAGNETICA (RM). Princh J.¹; Blenkman A.²; Seifer G.³; Consalvo D.⁴; Kochen S.⁵

CONICET - Instituto de Biología Celular y Neurociencias de Robertis Facultad de Medicina UBA^{1 2 3 4 5} <ayahuasc@hotmail.com>

Introducción y objetivos: Las ITD permiten detectar alteraciones de la sustancia blanca asociadas a las DCF, que exceden a los hallazgos estructurales detectados mediante Imágenes de RM convencional, reflejando cambios en la organización de las redes involucradas. Material y métodos: Se estudiaron con técnicas de ITD con una resolución de 2x2x2mm midiendo 32 direcciones de Gradientes en un equipo de RM de 1.5Tesla (11) pacientes con diagnóstico clínico, electroencefalográfico y mediante RM Convencional de Alta Resolución de DCF asociadas a epilepsia refractaria. Se analizaron mediante inspección visual y con medición de

valores de Anisotropía Fraccional (AF) en Areas de Interés sobre la lesión, áreas perilesionales y distantes a ellas en el hemisferio ipsilateral. Resultados: Se encontró disminución de la AF sobre la lesión y área perilesional en un 98% de los pacientes, de estos el 82% asocio aumento de la AF en tractos de sustancia blanca profundos, distales a la lesión y área peri lesional en el hemisferio ipsilateral. Conclusiones: EL aumento de los valores de AF reflejan una organización mas eficiente de la sustancia blanca en áreas distales a las lesiones visualizadas tanto en RM convencional como en aquellas con disminución de la AF asociadas en áreas perilesionales. De confirmarse los hallazgos en un numero de casos estadísticamente significativos, se podría considerar una reorganización mas eficiente de los tractos de sustancia blanca remanentes en el hemisferio ipsilateral a las DCF con el fin de intentar mantener su función. Estos hallazgos además podrían tener un papel importante en el origen y propagación de las crisis convulsivas en esta población.

257 (36) LA ADMINISTRACIÓN DE PROGESTERONA REDUCE LA ALODINIA MECÁNICA Y TÉRMICA EN ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO: POSIBLE ROL DE LA PROTEÍNA QUINASA C Y LA SUBUNIDAD 1 DEL RECEPTOR N-METIL-D-APARTATO. Coronel M.¹; Labombarda F.²; Roig P.³; Villar M.⁴; De Nicola A.⁵; González S.⁶

IBYME-CONICET¹ ; IBYME-CONICET²; Facultad de Medicina, UBA² ; IBYME-CONICET³ ; Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral⁴ ; IBYME-CONICET⁵; Facultad de Medicina, UBA⁵ ⁶ <coronel@dna.uba.ar>

El dolor neuropático se produce como consecuencia de una lesión o disfunción del sistema nervioso. Aún no existen terapias efectivas para su tratamiento. La isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKC γ) y la subunidad 1 del receptor NMDA (NR1) generan hiperexcitabilidad de las neuronas espinales, proceso clave en el dolor crónico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración de progesterona (PROG), esteroide neuroactivo con probada acción neuroprotectora, sobre la conducta nociceptiva y la expresión de PKC γ y NR1 en animales con dolor neuropático. Ratas macho Sprague-Dawley con una compresión crónica de su nervio ciático (CCN) o intactas (C) fueron inyectadas diariamente con PROG (16 mg/kg sc; CCN+PROG n=10; C+PROG n=5) o vehículo (CCN n=10; C n=5). La conducta nociceptiva se evaluó periódicamente (días 0, 1, 3, 7, 10, 14 y 17) utilizando los tests de von Frey y Choi: los animales con CCN desarrollaron alodinia mecánica y térmica en la pata ipsilateral a partir del día 10 ($p < 0.001$ vs C en ambos casos), mientras que en animales tratados con PROG se redujo significativamente la intensidad y el número de respuestas dolorosas ($p < 0.01$ vs CCN, $p > 0.05$ vs C para ambos parámetros). El número de neuronas inmunoreactivas para PKC γ , NR1 y su forma fosforilada activa (pNR1) se determinó en la médula espinal lumbar (L3-L6) luego de perfundir los animales el día 18. En animales con CCN se observó un importante incremento en el número de neuronas inmunoreactivas para PKC γ , NR1 y pNR1 en las láminas I-II del asta dorsal ipsilateral ($p < 0.001$ vs C en todos los casos), mientras que en animales tratados con PROG el número de neuronas positivas para cada marcador fue significativamente menor ($p < 0.01$ vs CCN, $p < 0.05$ vs C en todos los casos). Estos resultados muestran que el tratamiento con PROG modula moléculas involucradas en el proceso de hipersensibilidad central, logrando la atenuación del dolor neuropático. (M808 y M016 UBACYT, PIP 112-200801-00542).

258 (197) EFECTOS DE PROGESTERONA SOBRE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF) EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA DEGENERACION ESPINAL DEL WOBBLER. Meyer M.¹; González Denisse M.²; Gargiulo Monachelli G.³; Garay L.⁴; Pietranera L.⁵; Lima A.⁶; De Nicola A.⁷

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET¹ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET²;

Depto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA² ; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET³ ; División Neurología Hospital Ramos Mejía³ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁴ ; Depto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA⁴ ⁵ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁶ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁷ ; Depto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA⁷ <mariameyer@dna.uba.ar>

El ratón Wobbler presenta una mutación de la proteína de tráfico intracelular Vps54. Previamente demostramos que en motoneuronas espinales la expresión de ARNm para BDNF se encuentra disminuida en Wobblers en estadio establecido, mientras que la progesterona corrige esta deficiencia. Actualmente empleamos Wobblers genotipificados wr/wr de 3 estadios: progresivo temprano (1-2 meses), establecido (5-8 meses) y tardío (12 meses) y controles NFR/NFR de edades similares. La mitad de cada grupo recibió progesterona en pellet de 20 mg por 18 días. Secciones medulares fueron incubadas con una sonda oligonucleotídica complementaria para las bases 562-609 del BDNF. Las secciones se expusieron a film Kodak Biomax durante 24 hs. Los autorradiogramas se analizaron por densitometría empleando NIH Image Software (NIMH, Bethesda, USA). Los datos se expresaron como % del background de secciones expuestas a 35S en presencia de 20x de sonda no radioactiva. Se analizaron la sustancia gris ventral anterior (VA), ventral lateral (VL) y dorsal (D), empleando anova de 1 y 2 vías y post-hoc test. No se obtuvieron cambios en la etapa progresiva temprana entre wr/wr y NFR/NFR con o sin progesterona. En la etapa establecida, los wr/wr mostraron menos expresión de ARNm para BDNF respecto de NFR/NFR en VL ($p < 0.05$). El tratamiento con progesterona de wr/wr elevó dicha expresión en VA ($p < 0.02$) VL ($p < 0.02$) y D ($p < 0.006$). No hubo cambios entre NFR/NFR y wr/wr con y sin progesterona en la etapa tardía, pero curiosamente los NFR/NFR + progesterona mostraron mayor expresión de BDNF que los no tratados en VA, VL y D ($p < 0.05$). Conclusiones: los cambios del ARNm para BDNF no son precoces y ocurren al establecerse clínicamente la enfermedad. La progesterona revierte la deficiente expresión de BDNF en wr/wr sintomáticos pero no en progresivos tempranos y tardíos. La sensibilidad de NFR/NFR de 12 meses a la progesterona evidenciaría cambios incipientes degenerativos propios de la edad mediana del ratón.

259 (682) CARACTERISTICAS BIOMOLECULARES DE LA MITOCONDRIOPATIA DE LA MOTONEURONA ESPINAL DEL WOBBLER Y SU REVERSION POR PROGESTERONA. González Denisse M.¹; Converso D.²; Meyer M.³; Garay L.⁴; Gargiulo Monachelli G.⁵; Carreras M.⁶; Poderoso J.⁷; De Nicola A.⁸

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET¹; Dto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA¹; Laboratorio de Metabolismo del oxígeno, Hospital de Clínicas, UBA²; Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET³; Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET⁴; Dto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA⁴; Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET⁵; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, UBA⁶; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, UBA⁷; Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET⁸; Dto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA⁸ <mcgonza@dna.uba.ar>

En motoneuronas espinales de Wobbler, la mutación de la proteína de tráfico intracelular Vps 54 en el cromosoma 11 ocasiona un intenso estrés oxidativo asociado a niveles tóxicos del óxido nítrico (NO) e hiperactividad de la NOS. Estas motoneuronas presentan signos de vacuolización citoplasmática (paraptosis) con cristolisis mitocondrial por microscopía electrónica. Trabajos previos demostraron que la administración de progesterona a Wobbler disminuye la degeneración vacuolar de motoneuronas, previene las lesiones mitocondriales y disminuye la actividad de

la NOS en neuronas y astrocitos. En el presente trabajo, empleamos ratones Wobbler genotipificados de ambos sexos con sintomatología clínica, la mitad de los cuales recibieron un pellet de progesterona s.c. (20mg) x 18 días. Se diseccionaron las médulas espinales cervicales y lumbares. Se determinó, por un lado, la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial: I (consumo de NADH), I-III (NADH-citocromo c) y IV (citocromo c-oxidasa) y, por otro, la expresión de la enzima nNOS mitocondrial y citosólica por Western Blot. Los resultados demostraron una reducción significativa del % de actividad del complejo I de Wobbler en relación a controles en la región cervical (83.27 ± 2.9 vs controles, $p < 0.001$); mientras que el tratamiento con progesterona elevó significativamente este parámetro (Wobbler vs Wobbler+progesterona, 108.8 ± 1.06 ; $p < 0.001$). No se registraron cambios de los complejos I-III y IV de las regiones cervical o lumbar. La nNOS mitocondrial pero no la citosólica, se encontró aumentada en el Wobbler y disminuida por progesterona. Conclusión: sugerimos que el intenso estrés oxidativo del Wobbler podría originarse en la anormal hiperfunción de la nNOS mitocondrial con lesiones del complejo I. La progesterona revierte este mecanismo, normalizando la función de la motoneurona y mejorando, en parte, los signos clínicos que provoca la neurodegeneración espinal.

260 (782) CUPRIZONE-INDUCED DEMYELINATION IN CNP:GFP TRANSGENIC MICE. Bartucci S.¹; Silvestroff L.²; Soto E.³; Gallo V.⁴; Pasquini J.⁵; Franco P.⁶

Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA^{1 2 3} ; for Neuroscience Research, Children's National Medical Center, Washington, USA⁴ ; Facultad de Farmacia y Bioquímica- UBA^{5 6} <pgfmail@yahoo.com.ar>

Cuprizone (bis-cyclohexanone oxaldihydrazone) was previously shown to induce demyelination in white matter enriched brain structures. In the present study we used the cuprizone demyelination model in transgenic mice expressing the enhanced green fluorescent protein (GFP) under the 2'-3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) promoter. The use of these particular transgenic mice allows easy detection of cells belonging to the entire oligodendrocyte (OLG) lineage, ranging from OLG precursors to mature myelinating OLGs. We were able to evaluate the precise extent of oligodendroglial cell damage and recovery within the murine adult central nervous system (CNS) after inducing demyelination by acute cuprizone intoxication. A generalized loss of GFP+ cells was observed after cuprizone exposure, and correlated with a decline in myelin basic protein (MBP) expression. OLGs were depleted in many brain areas that were previously thought to be unaffected by cuprizone treatment. Thus, in addition to the well known cuprizone effects on the medial corpus callosum, we also found a loss of GFP+ cells in most brain structures, particularly in the caudatus putamen, cortex, anterior commissure, olfactory bulb, hippocampus, optic chiasm, brainstem and cingulum. A week after cuprizone removal from the diet, GFP+ oligodendroglial cells began to repopulate the damaged structures. However, this recovery time was insufficient to allow a significant increase in MBP expression. Hence, during early remyelination stages, GFP expression precedes that of MBP and allows OLG detection before myelin restoration.

REPRODUCCION 3

261 (430) INFLUENCIA DE ACIDOS GRASOS EN LA DIETA SOBRE EL TESTICULO DE UNA LINEA DE RATAS OBESAS Y DIABETICAS TARDIAS. Vázquez S.¹; Gutiérrez S.²; Gayol M.³; Hisano N.⁴

Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR¹ ; Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR^{2 3} ; Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR⁴ <noriyuki@cimero.org.ar>

En otros países se estudian suplementos dietarios naturales que disminuyen la glicemia y sus efectos oxidativos. Estudiamos el efecto de una dieta con el agregado de semillas de chíá (*Salvia hispanica* L. rica en ácido graso omega 3 y antioxidantes) sobre la histología testicular de ratas de la línea β (diabéticas tardías). Ratas macho de la línea β desarrolladas y criadas en el Bioterio de la Cát. de Biología (n=5) fueron alimentadas desde los 21 días de edad con alimento balanceado comercial+semillas de Chíá (C + CH) como suplemento dietario y a otro grupo β considerado control (n=5) se le suministró alimento balanceado comercial (C). A los 300 días de edad los animales se sacrificaron con sobredosis de éter. Los testículos fueron diseccionados y se fijaron en Carnoy y refijados en formaldehído al 4% en PBS, luego fueron procesados con las técnicas histológicas de rutina, coloreados con H-E. Los preparados se visualizaron en un microscopio Leitz. Glicemia (C+CH): 1.20 ± 0.02 g/l; (C) 1.46 ± 0.13 g/l. Trigliceridemia: (C+CH): 3.36 ± 0.54 g/l, (C): 5.41 ± 0.99 g/l. El grupo control (C) presentó túbulos con pérdida de la arquitectura epitelial y masas celulares intraluminales con imágenes compatibles de apoptosis. En el grupo β alimentado con chíá (C+CH) se observó túbulos seminíferos con bordes irregulares, el epitelio testicular con espacios intercelulares, células germinales en distintos estadios de la espermatogénesis y luz tubular con presencia de espermatozoides. Los animales β (C+CH) manifestaron un retraso en la instalación del síndrome metabólico, mientras que los animales que ingirieron una dieta comercial(C) desarrollaron Diabetes tipo II y obesidad que se correlacionan con los hallazgos histológicos testiculares. Sugerimos que el consumo de la semilla de Chíá reduce los efectos del síndrome diabético, la obesidad y enlenteció el envejecimiento testicular.

262 (235) EN EL TESTÍCULO DE RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL LA ISOFORMA INDUCIBLE DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ES MODULADA SELECTIVAMENTE Y GENERA UN AUMENTO DEL CONTENIDO DE ÓXIDO NÍTRICO. Jarazo Dietrich S.¹; Jacobo P.²; Pérez C.³; Mazzocchi L.⁴; Lustig L.⁵; Theas M.⁶

Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA^{1 2 3 4 5 6} <sabrina.jarazo@gmail.com>

El testículo a pesar de ser un órgano inmunoprivilegiado, puede desarrollar cuadros de inflamación que cursan con infertilidad. Para estudiar los mecanismos involucrados en el daño testicular, desarrollamos un modelo de inflamación crónica, la orquitis autoinmune experimental (OAE), caracterizado por el infiltrado de linfocitos y macrófagos y la apoptosis de las células germinales. La óxido nítrico sintasa (ONS) posee un importante papel en la modulación de la apoptosis de las células germinales en el testículo normal y patológico, por lo que estamos interesados en estudiar su papel en el desarrollo de la orquitis. Previamente demostramos por inmunohistoquímica, un aumento de la expresión de las isoformas constitutivas de la ONS (neuronal y endotelial, Ca^{2+} dependientes) y de la inducible (i, Ca^{2+} independiente) en el intersticio y en las células del túbulo. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el sistema ONS-ON en el testículo de ratas con OAE. La OAE fue inducida por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo experimental, E); las ratas control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes. El contenido de ON, evaluado por el método colorimétrico de Griess, fue mayor en el grupo E vs C (media \pm DE μ M/mg proteína C: 0.30 ± 0.29 , E: 0.90 ± 0.53 , $p < 0.01$). La actividad de la ONS fue evaluada mediante la conversión de L-arginina [H^3] a L-citrulina [H^3] en presencia de Ca^{2+} para determinar la actividad total (T) y en ausencia de Ca^{2+} para determinar la de la ONSi. La actividad en ambas condiciones fue mayor en el grupo E vs C y se revirtió en presencia del inhibidor L-NAME (media \pm DE fmol/min/mg proteína, ONST: C: 0.47 ± 0.36 , E: 2.65 ± 1.18 $p < 0.001$, E+L-NAME (2mM): 0.59 ± 0.28 ; ONSi: C: 0.92 ± 0.35 , E: 1.98 ± 1.00 $p < 0.05$). Por Western blot observamos un aumento de la expresión de la ONSi en el grupo E vs C. En conclusión, demostramos que en la OAE el aumento de la producción de ON se debe a una modulación selectiva de la actividad y de la expresión de la ONSi.

263 (279) REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LACTATO EN CÉLULAS DE SERTOLI POR CÉLULAS GERMINALES.

Scarcelli R.¹; Galardo M.²; Pellizzari E.³; Meroni S.⁴; Cigorraga S.⁵; Riera M.⁶

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)^{1 2 3 4 5 6} <rocioalberti@hotmail.com>

Las células de Sertoli (CS), componente somático del tubo seminífero, son fundamentales para el mantenimiento del epitelio germinal. La adecuada producción de lactato (L) por células de Sertoli es sumamente importante ya que este metabolito de la glucosa representa una fuente energética para espermatoцитos y espermátides (CG). Se ha demostrado que en conjunto con FSH, factores de crecimiento y citoquinas producidos localmente en el testículo regulan la producción de L. El objetivo de este trabajo fue determinar si las CG participan en la regulación de la producción de L y asimismo si CG regulan señales de transducción en CS. Se utilizaron cultivos de CS provenientes de ratas de 20 días de edad que fueron co-cultivadas con CG (espermatoцитos y espermátides) provenientes de ratas de 28 días de edad. Los resultados se expresan como media±DS (n=3). Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas. Se demostró que tanto la presencia de CG como de medio condicionado de CG (MCCG) por 48 hs en cultivos de CS aumentan la producción de L (B: 7.4±1.2^a; CG: 28.2±2.7^b; MCCG: 12.4±1.1^c µg/µg ADN). Asimismo, se observó que CG aumenta la incorporación de glucosa (B: 812±98^a; CG: 2465±165^b). Por otro lado, se demostró que CG eran capaces de regular las vías de PI3K/PKB y de ERK1/2 en CS. Los resultados indican que las CG regulan la producción de L y el estado de activación de las vías de PI3K/PKB y ERK1/2 en CS.

264 (224) REGULACION POR LACTATO DE LA EXPRESION GENICA EN CELULAS GERMINALES. Galardo M.¹; Riera M.²; Scarcelli R.³; Pellizzari E.⁴; Cigorraga S.⁵; Meroni S.⁶

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)^{1 2 3 4 5 6} <mngalardo@cedie.org.ar>

La espermatogénesis ocurre en un microambiente particular en el que están presentes numerosos productos de secreción de las células de Sertoli. Las células de Sertoli metabolizan activamente la glucosa siendo la mayoría de este sustrato energético convertido a lactato (L) y secretado al medio extracelular. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* demostraron que L mantiene los niveles de ATP y la vitalidad de las células germinales (CG). Por otro lado, en células musculares de la línea L6 se demostró que L regula la expresión de genes relacionados con su propio metabolismo. La posibilidad que L pueda ejercer un efecto semejante en CG no ha sido aún analizada. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de L en la regulación de la expresión génica en CG. Se utilizaron CG (espermatoцитos meióticos y espermátides tempranas) aisladas de testículos de ratas de 28 días de edad. Las mismas fueron cultivadas por 24 horas en ausencia o presencia de distintas concentraciones de L. Se analizaron por Northern Blot los niveles de ARNm de genes relacionados con el transporte de L a través de membranas (Transportadores de monocarboxilatos: MCT 1, 2 y 4) y con la oxidación de L a piruvato (Lactato deshidrogenasa: LDH A y C). Los resultados se expresan como % del nivel basal (X±DS, *p<0.05, n=3). Se observó que L aumenta los niveles de MCT 1 (L10mM: 210±20*; L20mM: 230±20*), de MCT 2 (L10mM: 270±40*; L20mM: 180±20*) y de LDH C (L10mM: 172±20*; L20mM: 170±10*). No se observó modificación en los niveles de MCT 4 y de LDH A. Los resultados indican que el lactato podría actuar como una molécula señal y regular la expresión de genes relacionados con su propia oxidación y transporte a través de la membrana en espermatoцитos meióticos y espermátides.

265 (725) EFECTO DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA SOBRE LA FISIOLÓGIA ESPERMÁTICA. Saez Lancellotti T.¹; Boarelli P.²; Espinola S.³; Cid Barría J.⁴; Césari A.⁵; Fornés M.⁶

Laboratorio de Investigaciones Andrológicas de Mendoza (LIAM), Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo^{1 2 3 4}; Instituto de Investigaciones Biológicas, UNMdP⁵; Laboratorio de Investigaciones Andrológicas de Mendoza (LIAM), Instituto de Histología y Embriología de Mendoza (IHEM), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo⁶ <efsaez@yahoo.com>

La hipercolesterolemia representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, y en nuestros estudios la encontramos asociada con una pobre calidad seminal que podría desencadenar infertilidad masculina. Investigamos los efectos de la ingesta de lípidos (saturados e insaturados) sobre la fisiología espermática. En trabajos previos describimos el modelo animal (conejes raza neocelandés bajo dietas experimentales, suplementadas con 16% grasa vacuna o 14% aceite de oliva extra virgen de producción local). Anteriormente observamos que conejes hipercolesterolémicos presentan alteraciones seminales: reducción significativa del volumen del eyaculado y menor motilidad espermática. A nivel celular, detectamos altos niveles de colesterol en la región acrosomal y baja resistencia a un medio hipo-osmótico. Además, se presenta un número elevado de malformaciones que caracterizamos por microscopía electrónica. Encontramos deficiencias en funciones espermáticas reguladas por la pérdida de colesterol de membrana, capacitación y reacción acrosomal. La adición de activadores de la proteína kinasa A (db-cAMP e IBMX) al medio de cultivo restableció la capacitación espermática, sustentando la hipótesis de daño a nivel de membrana. La suplementación de la dieta con aceite de oliva mejoró parámetros como colesterolemia, volumen seminal y concentración celular. Además, disminuyó significativamente el colesterol de membrana y aumentó la motilidad y el índice de reacción acrosomal. En conclusión, la hipercolesterolemia afecta negativamente las características seminales de conejes. La modificación de los lípidos de membrana llevan a la alteración de funciones específicas del espermatozoide acopladas a la bicapa lipídica: motilidad, capacitación y reacción acrosomal. El enriquecimiento de la dieta con aceite de oliva mejora los parámetros seminales afectados por la ingesta de grasas saturadas.

266 (581) IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS TH17 EN EL TESTÍCULO DE RATAS CON ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE). Jacobo P.¹; Jarazo Dietrich S.²; Pérez C.³; Theas M.⁴; Guazzone V.⁵; Lustig L.⁶

Instituto de Investigaciones en Reproducción. Facultad de Medicina. UBA.^{1 2 3 4 5 6} <patriciavjacobo@yahoo.com.ar>

La OAE es un cuadro de inflamación crónica del testículo caracterizado por la presencia de un infiltrado intersticial linfomonocitario y un severo daño de los túbulos seminíferos. Previamente demostramos un aumento significativo en el número de linfocitos efectores CD4+ Th1 presentes en el testículo durante el desarrollo de la OAE. Dado que ha sido demostrada la importancia de los linfocitos Th17 en la patogenia de los procesos inflamatorios autoinmunes, el objetivo de este trabajo fue estudiar la existencia de dichas células en el testículo de las ratas con OAE. La OAE fue inducida por inmunización activa con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo experimental, E). Las ratas del grupo control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes y las del grupo normal (N) no recibieron ningún tratamiento. Los animales fueron sacrificados a los 50 (OAE focal) y 80 (OAE severa) días (d) posteriores a la primera inmunización. La expresión del factor de transcripción ROR-γt involucrado en la diferenciación Th17 y de la citoquina IL-17 fue analizada mediante Western blot en homogenados de testículo total (HTT) y en suspensiones de células intersticiales aisladas del testículo (SCI). Mientras que en las ratas con orquitis focal y severa se observó la expresión de ROR-γt e IL-17 en el HTT y en las SCI, dichas proteínas no se detectaron en el testículo de las ratas N y C (n: 5 ratas/grupo/tiempo). Se identificaron linfocitos T IL-17+ en cortes de testículo median-

te técnicas inmunohistoquímicas. Dichas células se observaron sólo en ratas con OAE focal y severa distribuidas principalmente en la región subalbugínea y alrededor de los túbulos seminíferos lesionados. Los resultados obtenidos demostraron por primera vez la existencia de linfocitos Th17 en el testículo de las ratas con OAE sugiriendo una activa participación de las mismas en la patogenia del cuadro autoinmune.

267 (168) ALTERACIONES EN LA REGULACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO EN RATONES MACHO TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA. Gonzalez B.¹; Di Giorgio N.²; Ratner L.³; Poutanen M.⁴; Huhtaniemi I.⁵; Calandra R.⁶; Lux Lantos V.⁷; Rulli S.⁸

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3} ; Departamento de Fisiología, Universidad de Turku, Finlandia⁴ ; London Imperial College, Londres, Reino Unido⁵ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental^{6 7 8} <gonzalez@dna.uba.ar>

Ratones macho transgénicos (TG) que sobreexpresan hCG presentan hiperplasia/hipertrofia de las células de Leydig, hiperandrogenismo e infertilidad. Previamente hemos demostrado que los niveles de FSH sérica en machos TG prepúberes y adultos son menores comparados con los de la cepa salvaje (wt), y no se modifican por el tratamiento con un antiandrógeno específico (González y col., SAIC 2007). El objetivo del presente estudio fue evaluar en machos TG y wt (4 sem de edad) la regulación del eje hipotálamo-hipofisario, analizando el efecto de 2 sem de castración (Cx). Se evaluaron: a) los niveles séricos de FSH (RIA), b) la expresión génica de FSH β , receptor de GnRH (Gnrhr) y receptor de estrógenos α (ER α) en hipófisis (PCR en tiempo real), c) la concentración y pulsatilidad de GnRH hipotalámico (RIA). Los niveles séricos de FSH fueron: wt: 48.5 \pm 1.4, wt Cx: 77.5 \pm 2*, TG: 5.4 \pm 0.4*, TG Cx: 7.4 \pm 0.4* ng/ml (* p<0.001 vs wt). La expresión de FSH β en TG mostró niveles bajos con respecto al wt (p<0.001), mientras que Cx aumentó los niveles en wt (p<0.001), sin efecto en TG. La expresión de Gnrhr y ER α mostró niveles menores de ambos transcritos en TG (p<0.01) comparados con wt, sin observarse efectos por Cx. La concentración de GnRH en el hipotálamo (μ g/mg prot) fue mayor en el grupo TG comparado con el wt (p<0.05), sin modificarse post-Cx. La pulsatilidad de GnRH mostró una mayor frecuencia de pulsos en el TG comparado con el wt, mientras que la Cx indujo un aumento en wt y una disminución en TG (p<0.05). Los resultados obtenidos indican que la hipersecreción de hCG en ratones macho produce una inhibición persistente sobre la síntesis y secreción de FSH, a través de alteraciones a nivel de la hipófisis e hipotálamo, que no se modifican luego de la Cx. Dado que en este modelo la sobreexpresión de hCG ocurre desde el estadio fetal, este efecto podría deberse a una mayor exposición a esteroides del sistema neuroendócrino durante etapas tempranas de la diferenciación sexual.

268 (83) ALTERACIÓN DE LA CAPACIDAD OVULATORIA Y EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS EN RATONES HIPERSECRETORES DE LA HORMONA GONADOTROFINA CORIÓNICA HUMANA. Ratner L.¹; Gonzalez B.²; Poutanen M.³; Huhtaniemi I.⁴; Calandra R.⁵; Rulli S.⁶

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Buenos Aires^{1 2} ; Departamento de Fisiología, Universidad de Turku, Finlandia³ ; London Imperial College, Londres, Reino Unido⁴ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET, Buenos Aires^{5 6} <ratner@dna.uba.ar>

La hipersecreción de gonadotropina coriónica humana (hCG) en ratones transgénicos produce una alteración en el ambiente hormonal ovárico, que desencadena fallas en el proceso de ovulación y afecta la fertilidad. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la capacidad ovulatoria y la expresión de distintos factores involucrados en este proceso, en hembras inmaduras que sobreexpresan niveles moderados (hCG β +) y elevados de hCG

(hCG $\alpha\beta$ +), y en la cepa salvaje (wt), sometidas a un protocolo de inducción de la ovulación (7.5 UI de PMSG i.p.; luego de 48 hs, 7.5 UI hCG i.p.). El número de ovocitos ovulados, recolectados de los oviductos 18 hs post-hCG fueron: wt= 21 \pm 3, hCG β + = 24 \pm 5. No se observaron ovocitos en oviductos de hCG $\alpha\beta$ +. Se estudió la expresión génica de los factores anfiregulina (areg), epiregulina (ereg), betacelulosa (bcn), ciclooxigenasa-2 (cox-2), receptor de progesterona (PR) y estrógeno sulfotransferasa (sult1) en ovario, por PCR en tiempo real. Se detectó un aumento significativo en todos los genes estudiados en wt y hCG β + sometidos a inducción de la ovulación 4 hs post-hCG (p< 0.05) respecto de los niveles basales de expresión, mientras que en hCG $\alpha\beta$ + no se observaron dichos cambios. Se corroboró la falta de expansión de las células del cumulus en folículos de hCG $\alpha\beta$ + 6 hs post-hCG en comparación con la correcta expansión vista en wt, analizados mediante histología clásica y por visualización bajo lupa. En conclusión: en ratones hCG β +, que producen niveles moderados de hCG, la capacidad ovulatoria y la inducción de genes relacionados con la ovulación se mantuvieron comparables a los wt, mientras que en hCG $\alpha\beta$ +, el mecanismo de la ovulación resultó significativamente afectado, indicando que niveles elevados de hCG estarían produciendo una alteración en la correcta expresión de los factores involucrados en el proceso de señalización intrafolicular, que conllevaría a la anovulación.

269 (143) EFECTOS DE UNA DOSIS ÚNICA DE PROGESTERONA EN LA FASE PERIOVULATORIA SOBRE LA OVULACIÓN Y LA EVOLUCIÓN DE LA FASE LÚTEA EN EL PRIMATE CEBUS (CEBUS APPELLA). Lahoz M.¹; Porta M.²; Manzur T.³; Farinati Z.⁴; Torres M.⁵; Castiñeira K.⁶; Nagle C.⁷

Centro de Reproducción Humana y Experimental - CEMIC^{1 2 3 4 5 6 7} <cirhe@cemic.edu.ar>

Progesterona (P) fue el primer esteroide usado como anticonceptivo. El mecanismo de la acción anticonceptiva y efectos en función del momento de administración no fueron analizados en profundidad debido al reemplazo por progestágenos sintéticos. El objetivo fue estudiar los efectos pro y contraceptivos de una dosis de P administrada en fase periovulatoria en monas Cebus. Con folículos de distintos diámetros seguidos ecográficamente y según la distancia probable al pico de estradiol (E₂), 18 monas con ciclos regulares fueron tratadas 10 mg/ml de P i.m. o su vehículo: controles (n=4), día -2 (n=2), día -1 (n=3), día 0 (n=3), día +1 (n=3) y día +2 (n=3) con respecto al pico de E₂ y con folículos entre 4 y 9 mm respectivamente. Se determinaron E₂ y P por ECLIA en muestras de sangre y se realizaron laparoscopías pre y 48 hs post-inyección. P causó un incremento de 145 \pm 30 ng/ml de P circulante 24 hs post tratamiento. En monas tratadas en día -2 pre pico de E₂, P inhibió el pico estrogénico, los folículos presentaron un aspecto quístico y hubo un acortamiento de la fase lútea. P administrada en día -1 luteinizó los folículos con desarrollo lúteo insuficiente. P en coincidencia o post-pico de E₂, con folículos entre 7 y 9 mm, no inhibió la ovulación y extendió la fase lútea. El área bajo la curva en las monas que recibieron P pre pico de E₂ fue significativamente menor: día -2: 167 \pm 7; día -1: 1531 \pm 39 vs controles: 2202 \pm 48 ng/ml. P en coincidencia o post-pico estrogénico incrementó la P circulante en fase lútea: día 0: 3006 \pm 103; día +1: 2657 \pm 125; día +2: 2543 \pm 108 ng/ml. Estos resultados revelan un comportamiento dual de P: previo al pico estrogénico inhibió la ovulación, provocó luteinización folicular y un desarrollo lúteo insuficiente. Durante el pico de E₂ o cuando la ruptura folicular está en curso potenció la función del cuerpo lúteo. Se sugiere que, a menos que se pretendan efectos anticonceptivos, P no debiera administrarse previa a la ruptura folicular.

270 (361) DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS BCL-2 Y BAX EN TEJIDO OVÁRICO HUMANO INFANTO-JUVENIL. Albamonte M.¹; Meilerman A.²; Albamonte M.³; Cameo P.⁴; Zuccardi L.⁵; Maglio S.⁶; Vitullo A.⁷

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambien-

tales y Diagnósticos - CEBBAD - Universidad Maimonides^{1 2 3 4}; Hospital de niños Ricardo Gutiérrez^{5 6}; Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnósticos - CEBBAD - Universidad Maimonides⁷ <albamonte.itati@maimonides.edu>

En el ovario fetal, infante-juvenil y adulto, el tejido germinal está sujeto a una eliminación masiva constitutiva intraovárica mediada por apoptosis, en la que desempeña un papel esencial el balance de la expresión de los genes proapoptótico *BAX* y antiapoptótico *BCL2*. Estudios previos de nuestro laboratorio y otros han mostrado la expresión sostenida de *BAX* a lo largo de toda la ontogenia del ovario y en todos los estadios de la foliculogénesis dando sustento a la eliminación masiva, en tanto que *BCL2* se manifiesta particularmente en la etapa proliferativa del ovario en desarrollo (8 a 16 semanas de gestación), y en los estadios más avanzados de la foliculogénesis. Con el objeto de profundizar el estudio de la expresión de estos genes en el ovario infante-juvenil, se analizó la detección molecular de las proteínas *BAX* y *BCL2*. Se estudiaron 5 muestras de ovario juvenil entre 11 y 15 años de edad provenientes de pacientes intervenidas con indicación quirúrgica por proceso ginecológico. Una fracción de cada muestra quirúrgica se congeló a -70 °C para extracción de proteínas y análisis por western blot (WT) en tanto que otra se fijó en paraformaldehído y procesó por histología estándar para detección de *BAX* y *BCL2* por inmunohistoquímica (IHQ). El análisis por WT permitió detectar tanto *BAX* como *BCL-2* en todas las muestras. No obstante, si bien fue factible detectar por IHQ la presencia de *BAX* en todos los estadios foliculares en todas las muestras, *BCL2* fue sólo detectable por IHQ en aquellas muestras que presentaban estadios avanzados de la foliculogénesis. Estos resultados corroboran la presencia de estas proteínas. *BCL2* se asocia particularmente a los folículos de mayor desarrollo que intervienen en los procesos de reclutamiento y selección. En consonancia con lo conocido para el ovario fetal y el ovario adulto, el gen proapoptótico *BAX* muestra una expresión sostenida durante el desarrollo gonadal.

271 (451) FACTORES LUTEALES INVOLUCRADOS EN EL ADELANTO DE LA LUTEOLISIS PRODUCIDO POR EL HIPERTIROIDISMO EN LA RATA. Navas P.¹; Hapon M.²; Jahn G.³

Lab. de Reproducción y Lactancia-IMBECU CONICET^{1 2 3} <pnavas@mendoza-conicet.gov.ar>

El hipertiroidismo experimental adelanta la luteólisis, evidenciada por la caída en P4 sérica en el día 20 de gestación (G20). Previamente encontramos que la causa de este adelanto sería el aumento de PGF2 α (luteolítica) sérica y disminución en PGE2 (luteotrófica) a nivel luteal en G21, acompañado de un aumento en la expresión de 20 α hidroxisteroide deshidrogenasa (20 α HSD) en G19. Para determinar los factores luteales involucrados en este fenómeno, determinamos por RT-PCR la expresión relativa a S16 de 20 α HSD, enzimas de la vía de síntesis de P4: 3 β HSD, proteína de regulación aguda de la estereoidogénesis (StaR) y citocromo oxidasa (P450scc); factores relacionados con la regulación de 20 β HSD: óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), ciclo-oxigenasa 2 (COX-2) receptores de estrógenos (ER) α y β , de PRL (PRLR), de PGF2 α (PGF2 α -R), en G19, G20 y G21. El hipertiroidismo se indujo por inyección s.c. de T4 (0.25 mg/kg/día), comenzando 8 días antes de aparear las ratas. Se extrajeron los cuerpos lúteos (CLs) y sangre troncal en G19, G20 y G21. Las determinaciones hormonales (PRL, P4, E2) se realizaron por RIA. La expresión de 20 α HSD aumentó ($p < 0,05$) en G20 en ratas hiper mientras que en los controles lo hizo en G21. No hubo cambios en la expresión de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de P4. Tampoco encontramos cambios en la expresión de factores involucrados en la regulación de 20 α HSD excepto PRL-R y ER β , cuya expresión disminuyó en G20 ($p < 0,01$) y G19 ($p < 0,05$) respectivamente mientras que en los controles la caída se produjo en G21. P4 y E2 séricos cayeron significativamente en G20 y G19 ($p < 0,01$) respectivamente, mientras que PRL aumentó en G21 ($p < 0,05$). El adelanto en la luteólisis y el parto observado en las

ratas hiper sería causado por el adelanto en la caída en la expresión luteal de PRLR y ER β y de E2 sérico, todos factores luteotróficos, lo que produce un adelanto en la inducción de 20 α HSD y en el catabolismo de P4.

272 (562) LA EXPOSICIÓN PRENATAL/NEONATAL A BISFENOL A (BPA) ALTERA EL DESARROLLO FOLICULAR EN LA VIDA ADULTA. Santamaría C.¹; Porro V.²; Jacob A.³; Bollati M.⁴; Kass L.⁵; Muñoz-de-toro M.⁶; Luque E.⁷; Rodríguez H.⁸

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral¹; Unidad de Biología Celular (UBC), Institut Pasteur de Montevideo (IPMont)²; Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral³; Unidad de Biología Celular (UBC), Institut Pasteur de Montevideo (IPMont)⁴; Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral^{5 6 7 8} <clarisa_santamaría@hotmail.com>

Previamente demostramos que el desarrollo folicular de la rata es un proceso sensible a la acción de los perturbadores endocrinos durante la etapa posnatal temprana. En el presente trabajo evaluamos los efectos en la adultez de la exposición prenatal y neonatal a dosis bajas de BPA. Ratas hembras Wistar preñadas fueron tratadas por vía oral desde el día 9 de gestación hasta el día posnatal 21 (DPN21), con BPA 50 μ g/kg.día (BPA50), BPA 0.5 μ g/kg.día (BPA0.5) o vehículo (aceite de maíz). Se obtuvieron los ovarios de las crías en DPN90 y se determinaron los pesos de los mismos. En cortes seriados de todo el órgano y teñidos con picrosirius-hematoxilina se evaluó la dinámica folicular: número de ovocitos totales, porcentaje de cada población folicular, presencia de folículos multiovocitarios (MOFs) e incidencia de cuerpos lúteos. Un grupo de animales fue asignado para la evaluación de la regularidad de los ciclos estrales y de parámetros de fertilidad. La metodología de cálculo del número de ovocitos totales fue validada por citometría de flujo (CyAn ADP, DAKO) empleando el software Summit 4.3. El patrón de ciclos estrales no fue modificado por ninguno de los tratamientos mientras que ambas dosis de BPA provocaron una disminución del peso de los ovarios (control: 50.1 \pm 3.5, BPA50: 40.2 \pm 3.3 y BPA0.5: 39.4 \pm 1.5g). En BPA0.5 observamos una menor población de folículos activados (control: 2.2 \pm 0.4, BPA50: 1.4 \pm 0.1 y BPA0.5: 1.0 \pm 0.1 fol/mm²), debido a un menor porcentaje de folículos primarios, evidenciando un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento inicial. En BPA50 detectamos un incremento en el número de reabsorciones (control: 0,2 \pm 0,1; BPA50: 1,1 \pm 0,3). Los resultados demuestran que la exposición perinatal a dosis de BPA definidas como seguras por los organismos de control altera el desarrollo folicular en la vida adulta y la sobrevivencia de los embriones implantados.

273 (623) NORADRENALINA EN GANGLIO MESENTÉRICO SUPERIOR Y OVARIO MODULA LA LIBERACIÓN DE GNRH, P4 Y LA EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS 3 β -HSD Y 20 α -HSD. Daneri C.¹; Mohn C.²; Bronzi D.³; Rastrilla A.⁴; Sosa Z.⁵

Universidad Nacional de San Luis¹; CEFyBO-CONICET/UBA²; Universidad Nacional de San Luis^{3 4 5} <bedanti@hotmail.com>

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido que juega un rol endocrino en la regulación de los procesos reproductivos en el ovario. Dos formas de receptor de GnRH, se expresan en diferentes compartimientos ováricos y están regulados por sus propios ligandos, hormonas esteroideas y gonadotropina, es un regulador autocrino y paracrino en el ovario. El Objetivo fue evaluar: a) si noradrenalina (NA) en ganglio mesentérico superior (GMS) y ovario(O) influyen en el contenido de GnRH en el compartimento ovárico. b) la liberación de P₄ y la expresión de sus enzimas 3 β -HSD y 20 α -HSD y c) la posible re-

lación entre GnRH y la liberación de P_4 . Se utiliza un sistema *ex vivo* GMS-PNO-O e incubaciones de ovario solo. Para ambas incubaciones se utiliza una cubeta diseñada para tal fin, en baño metabólico a 37° con solución Krebs Ringer pH 7,4 y se adiciona NA (10^{-6} M) en el compartimento ganglionar y en incubaciones de ovario solo. Se extraen muestras a los 60 y 120 min. Las determinaciones se realizaron por RIA para P_4 y GnRH y la expresión de las enzimas por RT-PCR. Un $p < 0,05$ es de significado estadístico. Cuando se adicionó NA en el GMS aumentó GnRH (60 min; $p < 0,01$ y 120 min $p < 0,001$) y 20 α -HSD y disminuyó P_4 ($p < 0,001$) y 3 β -HSD en ovario. En las incubaciones de ovario disminuyó GnRH ($p < 0,001$), aumentó la P_4 ($p < 0,05$) y la expresión de 3 β -HSD (* $p < 0,01$) mientras 20- α -HSD- no mostró cambios con respecto al control. Con lo que se concluye que el sistema nervioso periférico desde el GMS a través del PNO regula la presencia de GnRH y el efecto antagonodotrófico de GnRH en ovario, participando en la regulación de las enzimas de síntesis y degradación de P_4 .

274 (732) EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDEAS EN HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL AL FINAL LA GESTACIÓN Y EL POSPARTO TEMPRANO DE LA RATA. Pennacchio G.¹; Hapon M.²; Navas P.³; Carreño N.⁴; Jahn G.⁵; Valdez S.⁶

IMBECU¹; IMBECU; ICB UNCuyo²; IMBECU^{3 4 5}; IMBECU; ICB UNCuyo⁶ <gpennacchio@lab.cricyt.edu.ar>

Los desórdenes tiroideos son muy frecuentes en la mujer en edad reproductiva, aumentando el riesgo de infertilidad, parto prematuro y falla en la lactancia. En la rata el hipertiroidismo experimental bloquea la eyeción láctea y altera la secreción de PRL. Las hormonas tiroideas a través de sus receptores (RT) podrían afectar la regulación de PRL a nivel hipotalámico. Se desconoce el patrón de expresión de los RT a nivel hipotalámico en la gestación normal. Se determinará la expresión en hipotálamo medio basal (HMB) al final de la de las isoformas del RT α y β gestación y el posparto temprano y su correlación con la secreción de PRL y expresión de tirosina hidroxilasa (TOH, enzima limitante de la síntesis de dopamina, principal inhibidor de la secreción de PRL) en ratas normales e hipertiroides. Ratas Wistar fueron tratadas con T_4 0,25 mg/kg/día s.c. (HiperT) o con vehículo (Co), desde 8 días antes de poner a preñar a las ratas hasta el sacrificio en los días 19, 20, 21 de gestación (G19, G20 y G21) y 2 de lactancia (L2) a las 12 hs. Se determinó la expresión de los RT y de TOH relativa a α -tubulina en HMB por Western blot y las concentraciones de PRL, TSH, T_3 y T_4 por RIA. Se detectaron ambas isoformas incrementó con el avance de la del RT en HMB. La expresión de RT α y RT β gestación en ratas Co (RT α : G21 0,71 \pm 0,09 vs G19 0,39 \pm 0,07 $p < 0,001$; RT β : G21 1,29 \pm 0,06 vs G19 0,56 \pm 0,05 $p < 0,001$) y cayó en el posparto (RT α : L2 0,30 \pm 0,05 $p < 0,001$ vs G21; RT β : L2 0,46 \pm 0,08 $p < 0,01$ vs G21). El HiperT no afectó estos cambios. La expresión de TOH disminuyó en G21 en las Co (G21 0,71 \pm 0,08 vs G19 1,22 \pm 0,07 $p < 0,01$). El HiperT adelantó la caída de TOH a G20 (HiperT: 0,59 \pm 0,04 vs Co: 0,99 \pm 0,08 $p < 0,001$) y aumentó PRL sérica en G21 (Co 11,2 \pm 1,7 vs HiperT 22,4 \pm 3,4, $p < 0,001$). Al final de la gestación la caída de TOH en HMB se acompaña con aumento de los RT que caen en el posparto. El hiperT adelanta la caída de TOH y el aumento de PRL sérica sin afectar la expresión de los RT.

275 (765) OCITOCINA (OT) PARTICIPA EN LA ACCIÓN ESTIMULADORA DE MIFEPRISTONE Y NALOXONA SOBRE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) EN LA PREÑEZ TARDÍA. Villegas Gabutti C.¹; Jahn G.²; Soaje M.³

IMBECU^{1 2 3} <cvillegas@lab.cricyt.edu.ar>

Introducción: La liberación de PRL inducida por mifepristone (Mp, antagonista de P_4) y naloxona (NAL, antagonista opioide) al final de la preñez involucra otro mecanismo además del dopaminérgico. En la preñez tardía, P_4 y opioides modulan las neuronas ocitocinérgicas hipotalámicas y OT ha sido propuesta como factor liberador de PRL. Hipótesis: OT mediaría la acción

estimuladora de Mp y NAL sobre PRL al final de la preñez. Objetivos: a) determinar OT sérica por RIA luego de la administración de NAL, b) medir la expresión del receptor de OT en hipófisis anterior (HA), c) evaluar si la administración icv de OT induce secreción de PRL en ratas tratadas con Mp Metodología: a diferentes grupos de ratas preñadas (día 19) se les administró Mp (5 mg/kg, sc, 8.00 h) o aceite y de acuerdo al objetivo se trataron con: a) NAL (2 mg/kg, ip, 17.30 h) o salina (SAL); se obtuvo sangre troncal 10, 20 y 30 min después para determinar OT sérica, b) SAL, (ip, 17.30 h); 30 min después se obtuvieron las AH para medir por RT-PCR la expresión relativa a β -actina del receptor OT (R-OT), c) OT (1 ug/5 ul, icv, 17.30 h); se obtuvo sangre troncal a los 20, 40, 60 min para medir PRL sérica. Resultados: NAL administrada a las 17.30 h aumentó PRL sérica 30 min después del tratamiento con Mp, a) OT sérica aumentó 10 min después de la administración de NAL en los grupos tratados con V (basal: 6.8 \pm 2,0 pg/ml n:7 vs 10 min: 16.0 \pm 2.6 pg/ml n:7, $p < 0,05$ y Mp (basal: 5.9 \pm 0.8 pg/ml n:7 vs 10 min: 15.5 \pm 3.4 pg/ml n:7, $p < 0,01$); no hubo cambios a los 20 min, b) Se obtuvo una mayor expresión del receptor OT en HA en animales tratados con Mp (V: 0.50 \pm 0.09 n:7 vs Mp: 0.81 \pm 0.05 n:7 $p < 0,02$). c) OT icv no modificó los niveles de PRL sérica en animales tratados con V y/o Mp. Conclusiones: El aumento de OT sérica inducido por bloqueo del tono opioide con NAL y la mayor expresión del R-OT en HA inducida por tratamiento con Mp sugieren la participación de OT como factor liberador de PRL en la preñez tardía.

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 3

276 (117) MECANISMO DE RESPUESTA A DAÑO EN EL ADN EN AUSENCIA DE UN CORRECTO PROCESO DE TRANSLESIÓN. Belluscio L.¹; Soria G.²; Speroni J.³; Gottifredi V.⁴

Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica, Fundación Instituto Leloir^{1 2 3 4} <lbelluscio@yahoo.com.ar>

La irradiación Ultravioleta es un tipo de estrés genotóxico que genera aductos entre bases adyacentes. Los mismos representan un obstáculo para la replicación del ADN, debido a que las polimerasas replicativas normales no son capaces de polimerizar a través de estas estructuras. Existe un familia de Polimerasas, entre las cuales se encuentra Pol ζ , que son capaces de sintetizar a través de este tipo de daño, permitiendo así, el avance de la horquilla de replicación. A este mecanismo se lo denomina síntesis por translesión (TLS). En estrecha relación con esto, células con defectos en la expresión de Pol ζ muestran un aumento en la sensibilidad celular a luz UV, presumiblemente como consecuencia de la acumulación de horquillas de replicación atascadas. Nuestro objetivo es el de establecer las bases moleculares de la respuesta a estrés por irradiación UVC (UV de onda corta) en ausencia de Pol ζ . Nuestros datos iniciales indican que en ausencia de dicha polimerasa se observa una activación incrementada y sostenida de la proteína Fancd2, un adaptador del complejo de Fanconi, con conocidas funciones en la vía del chequeo de daño a ADN y la activación del proceso de recombinación homóloga. Las implicaciones de nuestras observaciones en lo que respecta a la elección celular de los mecanismos de procesamiento de horquillas de replicación serán discutidos durante la presentación.

277 (145) PARTICIPACIÓN DE NF- κ B Y P38 MAPK EN LA INHIBICIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA CARDIACA POR 15-DEOXY- Δ 12,14 PGJ2. Hovsepian E.¹; Penas F.²; Goren N.³

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYBO-CONICET)^{1 2 3} <eugehovsepian@yahoo.com.ar>

La endotoxemia o shock séptico producido por lipopolisacárido (LPS) genera hipotensión y disfunción multiorgánica provocando importantes daños cardíacos. Se ha propuesto que la respuesta

inflamatoria sería modulada por 15dPGJ2 (15d) a través de vías alternativas además de PPAR γ . Por lo cual nos hemos propuesto analizar la participación de NF- κ B y p38 MAPK, junto a PPAR γ , en los efectos ejercidos por 15d en miocardiocitos neonatales estimulados con LPS. Para ello, se cultivaron células cardíacas de ratones CF-1 neonatos y se estimularon con LPS 10 μ g/ml o pre-incubaron con 15d 2iM. En trabajos anteriores hemos demostrado que 15d inhibe la expresión de óxido nítrico sintasa 2 (NOS-2) y metaloproteasa 9 (MMP-9) en nuestro modelo. También, inhibió la liberación de óxido nítrico (NO) en un 82 \pm 2% (p<0,01) que fue revertida por el antagonista de PPAR γ , GW9662 10iM. Además, mediante zimografía observamos que 15d disminuye la actividad de MMP-9 (Control (C): 0,2 \pm 0,02; LPS: 1,1 \pm 0,03; LPS+15d: 0,3 \pm 0,02; D.O./mm², p<0,01). A fin de estudiar vías alternativas a PPAR γ , NF- κ B y p38 MAPK fueron analizadas mediante Western blot y observamos que 15d inhibe la translocación nuclear de la subunidad p65 de NF- κ B en un 80 \pm 2% (p<0,01) respecto a LPS. Igualmente, extractos citosólicos de células preincubadas con 15d presentaron un retardo de 66 \pm 2% (p<0,01) en la fosforilación de p38 MAPK comparado con LPS. Además, valoramos el efecto de inhibidores de NF- κ B: MG132 (MG) 20 μ M y de p38 MAPK: SB203580 (SB) 10iM sobre la liberación de NO. El tratamiento con SB y 15d previo al estímulo de LPS, inhibió aun mas la liberación de NO (C: 10 \pm 0,9; LPS: 58 \pm 4,7; LPS+SB: 40 \pm 3,5; LPS+SB+15d: 22 \pm 1,8; NO iM, p<0,01). Como era de esperar, el tratamiento con MG y 15d previo a LPS mantuvo los niveles de NO tan bajos como con MG solo (LPS+MG: 13 \pm 0,8; LPS+MG+15d: 15 \pm 1,0; NO μ M, p<0,01). Estos resultados sugieren que 15d regula la respuesta inflamatoria a través de PPAR γ y de las vías de NF- κ B y p38 MAPK.

278 (154) CDM INHIBE LA TRANSCRIPCIÓN DE VEGF Y LA SÍNTESIS DE IL-6 SIN AFECTAR LAS VÍAS DE NF- κ B Y MAPK Bueno C.¹; Barquero A.²; Maier M.³; Alché L.⁴

Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{1, 2}; UMYMFOR (CONICET-UBA) y Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires³; Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁴ <cbueno@qb.fcen.uba.ar>

El 1-cinamoil-3,11-dihidroximeliacarpina (CDM) es un antiviral obtenido a partir de las hojas del árbol *Melia azedarach* L., que modula la producción de citoquinas inducida por LPS, como la Interleuquina 6 (IL-6), sin afectar la translocación del factor nuclear kappaB (NF- κ B). En consecuencia, nos preguntamos si CDM podría estar ejerciendo un efecto sobre el NF- κ B a nivel de su unión al ADN, o si presenta como blanco otras vías de señalización involucradas en la síntesis de citoquinas. Dado que la IL-6 estimula la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), resulta probable que también sea capaz de afectar la expresión de este potente agente angiogénico. Células J774A.1 (línea celular de macrófagos murinos), NHC (línea celular de conjuntiva humana), y HCLE (línea celular de córnea humana), se transfectaron con un plásmido reportero de NF- κ B - luciferasa o de VEGF- luciferasa, con el fin de investigar si CDM modula la transcripción de ambos genes. Por otro lado, se estudió el efecto de CDM sobre la activación de p38 MAPK mediante western blot. Los resultados obtenidos mostraron que el CDM no inhibió la interacción del NF- κ B con el ADN en las células transfectadas y estimuladas con TNF- α o LPS, ni inhibió la fosforilación de p38. Por otra parte, en las células J774A.1 y HCLE transfectadas con el plásmido reportero de VEGF-luc estimuladas con LPS o infectadas con HSV-1 y tratadas con CDM, se observó una disminución de la transcripción de VEGF. En conclusión, CDM modula la producción de citoquinas actuando sobre una vía de señalización intracelular diferente a NF- κ B y p38 MAPK. Además, CDM inhibe la transcripción de VEGF frente a estímulos virales y no virales, comportándose como un potencial agente antiangiogénico.

279 (259) NRF2 REGULA LA EXPRESIÓN DE HO-1 DISPARADA POR VGPCR. Sapochnik D.¹; Martin M.²; Marinissen M.³; Tanos T.⁴; Coso O.⁵

LFBM IFByNE CONICET¹; Universidad Autónoma de Madrid^{2, 3}; LFBM IFByNE CONICET^{4, 5} <dsapochnik@fbmc.fcen.uba.ar>

La Hemooxigenasa 1 (HO-1) es una enzima inducible altamente expresada en lesiones causadas por el Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi. Unos de los genes clave involucrado en el desarrollo de las lesiones es un receptor acoplado a proteína G oncogénico (vGPCR). vGPCR induce la expresión de HO-1, la cual contribuye a la tumorigénesis y a la expresión de VEGF. Recientemente hemos caracterizado que vGPCR induce la expresión de HO-1 y la transformación de las células infectadas a través de la subunidad Galfa12,13 de las proteínas G heterotriméricas y de RhoA. En el promotor de HO-1 hay sitios ARE que responden al factor de transcripción Nrf2. Nos enfocamos en el rol de Nrf2 en la vía disparada por vGPCR. Nos propusimos identificar los elementos respondedores a vGPCR en el promotor de HO-1 y los caminos de señalización involucrados mediante ensayos de genes reporteros. Mediante inmunofluorescencia vimos el efecto que tienen vGPCR, G13, RhoA y diferentes quinasas en la localización de Nrf2. vGPCR aumenta la expresión de Luciferasa fusionado a un promotor que responde a Gal4 cuando es co-transfectado con Gal4-Nrf2TAD (Ctrl 115RLU; vGPCR 28714RLU). Observamos también que vGPCR dispara la expresión de Luciferasa cuando éste está regulado por un promotor que contiene 3 sitios ARE (Ctrl 524 \pm 71RLU, vGPCR 795 \pm 117RLU, Nrf2 11270 \pm 8273RLU y vGPCR-Nrf2 17409 \pm 4096 RLU). Además, vimos que el efecto de vGPCR disminuye al deletar la región comprendida entre -4,9 y -3,8Kb (1979 RLU; 838 RLU) y entre -1,4 y -0,3Kb (836 RLU; 431 RLU). Respecto a la localización de Nrf2, vGPCR produce su traslocación al núcleo. Nuestros estudios demuestran que vGPCR induce la expresión de HO-1 a través de G13, RhoA y Nrf2. Además, el mecanismo a través del cual actúa vGPCR involucra la traslocación de Nrf2 al núcleo. Estos resultados abren el rango de potenciales blancos moleculares en el tratamiento terapéutico de tumores inducidos por vGPCR o con alta actividad de HO-1.

280 (268) ACTIVACION DE STAT5 POR LA HORMONA DE CRECIMIENTO DURANTE LA ETAPA DE CRECIMIENTO EN RATONES. Martinez C.¹; Miquet J.²; González L.³; Turyñ D.⁴; Sotelo A.⁵

IQUIFIB (UBA-CONICET)^{1, 2, 3, 4, 5} <carolinasmartinez@gmail.com>

La hormona de crecimiento (GH) es el principal regulador del crecimiento corporal postnatal. Ejerce su efecto de manera directa e indirecta a través del factor de crecimiento similar insulina de tipo I (IGF-I). El hígado, el principal órgano blanco de la GH, es un regulador endócrino de los niveles circulantes de IGF-I. STAT5 es un factor de transcripción que por estímulo hormonal trasloca a núcleo donde activa diversos genes, entre otros, el de IGF-I. El receptor de glucocorticoides (GR) regula la expresión de IGF-I coactivando a STAT5. A su vez, el factor nuclear de hepatocitos-1 α (HNF-1 α) modula la expresión del GR. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el grado de activación de STAT5 por GH durante la etapa de crecimiento en ratones en ambos sexos, ya que tanto el crecimiento como la respuesta a GH presentan dimorfismo sexual. Ratones Swiss hembra y macho de distintas edades recibieron 1 μ g/g de peso corporal de GH, luego de 30 minutos fueron sacrificados y se obtuvo la fracción nuclear hepática. Se determinó la activación de STAT5a/b y la expresión de los moduladores GR y HNF-1 α en hígado por inmuno-blotting. La hormona de crecimiento induce la fosforilación de STAT5a/b en el residuo de activación (Tyr694/699). Ésta resulta baja en ratones de una semana de edad (20% del valor del adulto; n=6, p<0,001), pero a las dos semanas y media los valores son seme-

jantes a los del adulto. El contenido hepático nuclear del GR y del HNF-1 α no varía por el estímulo exógeno ni por el sexo pero sí con la edad; los niveles son mucho menores en el ratón de una semana y menores en ratones de dos semanas y media de edad con respecto al adulto (15% y 50% respectivamente para GR, y 10% y 60% para HNF-1 α ; n=6, p <0,05 para ambas proteínas). Este perfil de activación y expresión de mediadores intracelulares coincide con que el efecto de la GH sobre el crecimiento corporal comienza a manifestarse recién a partir del destete en ratones (a las tres semanas).

- 281 (271) PROPAGACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS MURINAS EN CULTIVO EN UN MEDIO CONDICIONADO NOVEDOSO.** Losino N.¹; Boffi J.²; Luzzani C.³; Louis Tisserand M.⁴; Fernández D.⁶; Scassa M.⁷; Miriuka S.⁸; Barañao L.⁹; Guberman A.⁵

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales¹ ; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{2 3 4 5} ; Laboratorio de Biología del desarrollo Celular, FLENI^{6 7 8} ; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁹ <nlosino@qb.fcen.uba.ar>

Las células madre presentan un gran potencial para la medicina regenerativa, pero para su aplicación clínica aún hay que superar múltiples obstáculos, entre los que se encuentran su amplificación eficiente en estado indiferenciado y su diferenciación dirigida hacia el linaje deseado. Nuestros objetivos son estudiar el cultivo de diferentes líneas de células madre embrionarias murinas (mESC) en un medio condicionado (MC) novedoso que permite su propagación manteniendo sus propiedades esenciales, la identificación de los factores presentes en el mismo responsables de su actividad y los mecanismos moleculares involucrados. En mESC, la citoquina LIF activa al factor STAT3, implicado en la proliferación en estado indiferenciado. El MC permite la proliferación de la línea de mESC CGR8, sin el agregado de LIF. Las mESC cultivadas en MC presentaron morfología típica de colonia indiferenciada y expresaron marcadores específicos determinados por RT-PCR y/o inmunofluorescencia (Oct4, Nanog, Ssea-1, Ecat1, Rex1 y Klf4). Al inducir su diferenciación, formaron cuerpos embrioides que expresaron marcadores de diferentes linajes (Brachyury, a-fetoproteína, Mesp1 y 2, Isl1 y Miocardina). Estudiamos el efecto del MC en otras líneas mESC y detectamos la expresión de marcadores específicos. Por otra parte, mediante inmunofluorescencia, detectamos que las mESC CGR8 propagadas en MC presentaron a STAT3 desfosforilado, evidenciando un posible mecanismo alternativo. Asimismo, estudiamos el MC sobre las líneas embrionarias humanas (hESC) HUES-9, HUES-16 y S531. Estas mostraron morfología de colonias indiferenciadas y expresión de Oct4, detectado por inmunofluorescencia. Por otra parte, en la línea condicionadora detectamos por RT-PCR, la expresión de los factores IGF2 y FGF2, necesarios en el mantenimiento de las hESC pluripotentes. Los resultados sugieren que podría utilizarse el MC para propagar distintas líneas ESC, probablemente mediante mecanismos novedosos.

- 282 (274) REGULACIÓN POR PROTEÍNAS SHROOM DEL CANAL DE SODIO EPITELIAL SENSIBLE AL AMILORIDE (ENAC) EXPRESADO EN OVOCITOS DE XENOPUS LAEVIS.** Ozu M.¹; Marino G.²; Kotsias B.³; Assef Y.⁴

Laboratorio de Biomembranas, Dpto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, UBA¹ ; Laboratorio de Canales Iónicos, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA, IDIM- CONICET.^{2 3 4} <mozu@fmed.uba.ar>

El ENaC es un canal esencial para el movimiento del sodio en diversos epitelios y participa además en la migración celular, un fenómeno asociado al citoesqueleto celular. Para estudiar este fenómeno investigamos la regulación del ENaC por proteínas Shroom relacionadas al citoesqueleto, esenciales en el desarrollo embrionario, una de cuyas formas, Shroom1 (APX) se expre-

sa en forma endógena en los ovocitos. Se inyectó el mRNA de las tres subunidades del ENaC en ovocitos de *Xenopus laevis* y luego de 24-48 horas se midieron las corrientes sensibles a amiloride (INa (amil)) en un sistema de control de potencial. Se aplicaron pulsos de -100 a 60 mV en pasos de 20 mV y de 500 ms de duración desde un potencial de base de 0 mV. La INa (amil) fue definida como la diferencia entre las corrientes antes y después de 3-5 minutos de exposición a 2-10 μ M amiloride. El potencial de membrana de los ovocitos inyectados con ENaC fue de -3 ± 2 mV, menor que en los controles con agua (-39 ± 11 mV), despolarización debida a un aumento en la concentración intracelular de sodio producto de la actividad de ENaC. Los ovocitos inyectados con ENaC generaron corrientes que fueron bloqueadas en forma reversible por el amiloride, con disminución de la magnitud de la INa (amil) en las sucesivas corridas (*run down*). La coinyección de oligonucleótidos antisentido para Shroom1 con las subunidades del ENaC redujo la INa (amil) comparadas con la coinyección de oligonucleótidos sentido para Shroom1 (pulso -100 mV: oligonucleótidos antisentido: -1.20 ± 0.24 μ A y oligonucleótidos sentido: -9.50 ± 1.58 μ A (n=17, p <0.001). Las corrientes en ovocitos inyectados con agua tenían un rango de nA (n=0.074 \pm 0.024 μ A, n=13). Dos posibilidades pueden explicar la reducción de la INa (amil) por el bloqueo en la síntesis de Shroom1: un mayor número de canales insertados en membrana o un aumento en la actividad de los canales por cambios en su conductancia o probabilidad de apertura.

- 283 (287) ATP ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS OSTEBLÁSTICAS Y TUMORALES MAMARIAS A TRAVÉS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT.** Katz S.¹; Scodelaro Bilbao P.²; Boland R.³; Santillán G.⁴

Universidad Nacional del Sur-Dpto. de Biología, Bioquímica y Farmacia-Lab. de Química Biológica^{1 2 3 4} <sebakatz@criba.edu.ar>

La vía de señalización de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K)/Akt ha sido implicada en la regulación de la proliferación celular y oncogénesis. Previamente, demostramos que la estimulación de receptores P2Y_{2/4} por ATP induce la fosforilación de Akt en serina 473 en forma dependiente de PI3K en células osteoblásticas ROS 17/2.8 y tumorales mamarias MCF-7. En estas últimas, la activación de Akt por ATP fue, además, dependiente de Src y PKC e independiente del influjo de Ca²⁺. En este trabajo se estudió la modulación de la vía PI3K/Akt por ATP en células ROS 17/2.8 y su contribución a la proliferación celular en ambas líneas celulares. Mediante análisis de Western blot se observó que el uso de PP1, un inhibidor de Src, disminuyó la activación de Akt inducida por ATP en células ROS 17/2.8. La incubación de las células en un medio libre de Ca²⁺ (+EGTA 0,5 mM) inhibió el efecto del ATP sobre la activación de Akt, mientras que no se observaron cambios en presencia de nifedipina y verapamil, inhibidores de canales VDCC ó Ro318220, un inhibidor de PKC. El empleo de Ly294002 y wortmanina, inhibidores de PI3K, sugiere que la fosforilación de las MAPKs ERK1/2, p38 y p46 JNK por ATP es independiente de PI3K. Mediante ensayos de MTS se demostró que ATP y UTP ~10 mM incrementan la viabilidad celular luego de 24 y 72 hs en ambas líneas celulares, respectivamente. Efecto que fue inhibido por Ly294002 y wortmanina. Estos resultados sugieren que, similarmente a lo observado en células MCF-7, la activación de Akt es dependiente de Src. Sin embargo, en las células osteoblásticas, la activación de Akt evidenció ser independiente de PKC y dependiente del influjo de Ca²⁺ a través de canales distintos a VDCC. En ambos tipos celulares, la vía PI3K/Akt participa en los efectos mitogénicos inducidos por ATP. Estos datos podrían ser de potencial relevancia en fisiología ósea y en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas frente a transformaciones tumorales.

- 284 (310) ANTICUERPOS ANTIMUSCARÍNICOS COMO MODULADORES DE LA NA+K+ATPASA EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO.** Passafaro D.¹; Reina S.²; Sterin-borda L.³; Borda E.⁴

*Cátedra de Farmacología; Facultad de Odontología; UBA¹;
Catedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA;
CONICET^{2,3,4} <danielapassafaro@yahoo.com.ar>*

Los pacientes con síndrome de Sjögren primario (SSp) producen autoanticuerpos (Ac) que interactúan con los receptores colinérgicos muscarínicos M3 (mAChR M3) de las glándulas salivales. El objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación de estos anticuerpos sobre la actividad de la Na⁺-K⁺-ATPasa (NKA) y los segundos mensajeros que participan en la alteración de la secreción salival. Se utilizaron glándulas submaxilares de rata y se determinó la actividad de la NKA [a través del fosfato inorgánico liberado], la producción de PGE2 [ELISA], la acumulación de AMPc [RIA] y el flujo neto de K⁺ [fotómetro de llama], en presencia de los Ac anti mAChR M3 purificados del suero de pacientes con SSp. Los Ac del SSp aumentaron la generación de PGE2 [%X±ES] (315±32, n=6) y la producción de AMPc (292±27, n=6), observándose una correlación positiva (alfa=0.05) entre ambos. Los Ac anti mAChR M3 indujeron un incremento en el eflujo de K⁺(130±14, n=5). La pilocarpina produjo un incremento mayor (510±52, n=5), el cual fue impedido en presencia del Ac anti mAChR M3 (205±19, n=5). El 4-DAMP 1x10⁻⁷M (bloqueante mAChR M3) bloqueó la acción de los Ac anti mAChR M3. El péptido sintético M3 10 microg/ml bloqueó la acción de dichos Ac sobre la NKA, PGE2 y AMPc. La inhibición de fosfolipasa A2 (OBAA), COX-1 (FR 122047) y COX-2 (DuP 697) también impidió el efecto de los Ac sobre la NKA, PGE2 y AMPc. Se concluye que los Ac del SSp actúan sobre el mAChR M3 como agonistas parciales: -aumentando la producción de sustancias pro-inflamatorias e -inhibiendo la acción del agonista auténtico de los mAChR M3 pilocarpina. De este modo los Ac participarían en el proceso inflamatorio de la glándula y en el desarrollo de la xerostomía a través de la modulación del flujo iónico.

285 (317) MEDICIÓN DE LA PROGRESIÓN DE LA HORQUILLA DE REPLICACIÓN MEDIANTE ANÁLISIS DE MOLÉCULAS ÚNICAS DE ADN POR MICROSCOPIA CONFOCAL. Mansilla S.¹; Soria G.²; Speroni J.³; Gottifredi V.⁴

*Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica,
Fundación Instituto Leloir^{1,2,3,4} <smansilla@leloir.org.ar>*

El proceso de replicación debe lidiar con un alto número de lesiones al ADN provocadas por el metabolismo celular o por agentes externos. Esto ocasionó que el proceso de replicación del ADN evolucione generando mecanismos de regulación de fidelidad de síntesis y de tolerancia al daño. Normalmente las técnicas utilizadas para medir procesos de síntesis involucran la incorporación de nucleótidos radioactivos o de análogos de bases. La restricción de estos métodos es que solo permiten medir síntesis de ADN a nivel cuantitativo de manera limitada. Resulta muy complejo por ejemplo medir variaciones sutiles en la progresión de la horquilla de replicación que involucran síntesis de pocas bases de ADN, como es el caso de procesos acoplados a fase S. Es por esto que recientemente se desarrollaron métodos de análisis de moléculas únicas de ADN que permiten visualizar cambios en la velocidad de avance de la horquilla de replicación. En nuestro laboratorio logramos poner a punto una técnica novedosa conocida como "Fiber Assay". Este ensayo consiste en la incorporación secuencial de dos análogos de bases (Cldu e IdU) que son detectados diferencialmente por anticuerpos específicos. Luego mediante un proceso de extensión se separan moléculas únicas de ADN desplegadas donde la incorporación de cada análogo se puede "medir" separadamente por microscopía de alta resolución. Estas incorporaciones se realizan en manera sucesiva en procesos de replicación normal o separadas por un evento de daño al ADN (por ej. irradiación UV). De esta manera es posible estimar en manera sensible variaciones en la progresión de la horquilla de replicación no solo en respuesta a un determinado agente genotóxico sino también en el estudio del efecto de una proteína particular (ej. un inhibidor de actividad polimerasa).

286 (330) DELIMITANDO EL ROL REGULADOR DE P21 EN LA TOLERANCIA AL ADN DAÑADO ACOPLADA A FASE S. Mansilla S.¹; Soria G.²; Speroni J.³; Gottifredi V.⁴

*Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica,
Fundación Instituto Leloir^{1,2,3,4} <smansilla@leloir.org.ar>*

Durante la replicación del ADN la célula debe evitar bloqueos en la horquilla de replicación ocasionados por el encuentro con ADN dañado. La síntesis a través de lesiones (TLS-translesion DNA synthesis) involucra el intercambio de la polimerasa replicativa por una polimerasa permisiva capaz de sintetizar usando como molde ADN dañado. Esto garantiza la continuidad de la replicación aunque con la potencialidad de aumentar la mutagenesis. El motivo es que las polimerasas de TLS tienen sitios activos más amplios y no poseen actividad de lectura de prueba. Se han identificado diversas polimerasas permisivas con especificidad diferencial para distintos tipos de ADN dañado (ej. Polη es específica para síntesis a través de dímeros de timina generados por la irradiación UV). A pesar de que estas polimerasas fueron caracterizadas en profundidad a nivel bioquímico, poco se sabe de la regulación de su actividad. Nuestro grupo identificó a p21 como el primer regulador negativo de TLS. p21 actúa tanto modulando modificaciones post-traduccionales en PCNA (proteína que sirve como plataforma para el cargado de polimerasas) relevantes para TLS, como así también bloqueando directamente el cargado de Polη sobre PCNA. Nuestro objetivo es determinar si el efecto de p21 se extiende a todas las polimerasas de TLS o si esta restringido a Polη. En este trabajo utilizando mutantes de p21 estables (no degradables después de irradiación UV) logramos demostrar que todas las polimerasas de TLS se ven afectadas por la presencia de esta proteína. Esto se evidencia a través del bloqueo del reclutamiento de estas polimerasas a la zona de daño y como una disminución en el porcentaje de células que logran reclutamiento a ADN dañado en respuesta a UV. Por último, para estudiar de manera global el efecto de p21 sobre TLS, utilizamos un método de análisis de moléculas únicas de ADN por imágenes de alta resolución que permite detectar cambios sutiles en el avance de la horquilla de replicación.

287 (337) LA HISTAMINA A TRAVÉS DEL RECEPTOR H1 INDUCE INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR VIA PLC, RAC Y JNK. Notcovich C.¹; Diez F.²; Tubio M.³; Baldi A.⁴; Kazanietz M.⁵; Davio C.⁶; Shayo C.⁷

*Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME;
Laboratorio de Farmacología de Receptores, FFyB, UBA^{1,2,3};
Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME⁴;
Department of Pharmacology, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA⁵;
Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, FFyB - UBA⁶;
Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IByME⁷ <cintianotcovich@hotmail.com>*

La señalización clásica descrita para el receptor H1 a histamina (H1R) involucra la activación de la PLC vía Gq. Hemos descrito en células CHO transfectadas con H1R, la activación de Rac1 y RhoA, miembros de la familia de Rho-GTPasas. Estas proteínas han sido asociadas a procesos como secreción, migración, control del ciclo celular y apoptosis. Dado que la histamina modula la proliferación celular a través de H1R, nos planteamos como objetivo, estudiar la asociación entre la activación de Rac1 y RhoA y la modulación de la proliferación celular así como distintas vías de señalización involucradas. Los ensayos fueron realizados en células CHO transfectadas establemente con H1R. La activación por histamina de Rac1 y RhoA (ensayos de pulldown con proteínas que unen Rac y RhoA activas) fue suprimida por U73122, inhibidor de PLC. La histamina vía H1R indujo activación del factor de respuesta a suero determinado por ensayos de gen reportero (SRE-LUC), inhibida en presencia de toxina C3, inhibidor de RhoA. Además detectamos activación de JNK (western blot de proteína fosforilada) inhibida por la construcción

β 2-chimaerin (inhibidor de Rac) y activación de ERK1/2 no inhibida por toxina C3 ni por β 2-chimaerin. La histamina no moduló las vías de Akt y p38. La proliferación fue evaluada por incorporación de 3H timidina. Histamina y agonista H1 provocaron una inhibición de la misma en forma dosis dependiente. Este efecto resultó dependiente de la activación de Rac y no de RhoA, dado que fue revertido por inhibidores de Rac (β 2-chimaerin e inhibidor farmacológico NSC23766) y no por toxina C3. Asimismo la inhibición de la proliferación fue revertida por U73122 y por el inhibidor de JNK SP600125. Los inhibidores de ERK, U0126 y PD98059 no mostraron ningún efecto. Nuestros resultados revelan un efecto inhibitorio de la histamina sobre la proliferación en células CHO-H1, dependiente de PLC, Rac1 y JNK y sugieren que RhoA y ERK regularían otros procesos río abajo del H1R.

288 (350) EL DOMINIO HOMÓLOGO A RGS PRESENTE EN GRK2 ES RESPONSABLE DE LA DESENSIBILIZACIÓN DEL RECEPTOR H2 CAUSADA POR AMTHAMINA. Alonso N.¹; Gottardo F.²; Davio C.³; Fernández N.⁴; Shayo C.⁵

Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular. IBYME - CONICET¹ ; Cátedra de Química Medicinal, FFyB-UBA² ^{3 4} ; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular. IBYME - CONICET⁵ <nati_alonso05@hotmail.com>

El receptor H2 a histamina (rH2) pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y su activación conduce a un incremento en los niveles de AMPc. Luego de ser fosforilado y desensibilizado por GRK2 es internalizado y reciclado a la membrana celular. Estudios realizados con una construcción dominante negativa de GRK2 (GRK2K220R) que carece de actividad quinasa, muestran que GRK2K220R desensibiliza al rH2 al igual que la proteína salvaje y bloquea su internalización, sugiriendo que la fosforilación del rH2 por GRK2 no es necesaria para su desensibilización pero es indispensable para su internalización. El objetivo del presente trabajo es discriminar si la desensibilización del rH2 observada con GRK2K220R se debe al impedimento estérico que causa dicha quinasa evitando el acople del rH2 a la proteína G o a la acción del dominio homólogo al regulador de la señalización por proteína G (RGS) presente en GRK2. Para ello realizamos tres construcciones conteniendo los distintos dominios presentes en GRK2K220R: el dominio RH (homólogo a RGS), los dominios KIN-PH (quinasa y de homología a plekstrin) o RH-PH. Ensayos de concentración-respuesta realizados en células HEK293 cotransfectadas con el rH2 y las diferentes construcciones, muestran que en presencia de RH y RH-PH la respuesta máxima de AMPc del rH2 a su agonista amthamina, disminuye en un 39,6% y 46,5% respectivamente, mientras que KIN-PH no modifica la respuesta. Por otro lado, resultados obtenidos en cinéticas de desensibilización indican que la construcción RH-PH causa una mayor atenuación en la respuesta del receptor, disminuyendo el T1/2 de desensibilización de 0,45 min a 0,22 min. Resultados similares fueron obtenidos en células COS7. En base a los resultados obtenidos, concluimos que la desensibilización en la respuesta del rH2, producida por amthamina se encuentra mediada por el dominio RH presente en GRK2 y no por un impedimento estérico causado por dicha quinasa.

289 (360) AGONISTAS INVERSOS DEL RECEPTOR H2 A HISTAMINA PUEDEN ACTIVAR MECANISMOS AUTOREGULATORIOS DE CORTE DE SEÑAL EN FORMA SIMILAR A LOS DESENCADENADOS POR UN AGONISTA. Gottardo F.¹; Alonso N.²; Shayo C.³; Davio C.⁴; Fernández N.⁵

Cátedra de Química Medicinal. FFyB-UBA¹ ; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular. IBYME-CONICET^{2 3} ; Cátedra de Química Medicinal. FFyB-UBA^{4 5} <natyfernandez@hotmail.com>

Los ligandos de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) fueron originalmente clasificados en agonistas, antagonistas y agonistas inversos de acuerdo a su eficacia en la modulación de segundos mensajeros. Actualmente se sabe que los GPCRs también pueden modular una amplia variedad de procesos autore-

gulatorios de corte de señal como fosforilación, desacople de la proteína G, internalización y downregulación de receptores. En base a esto, el objetivo del presente trabajo es evaluar si aquellos ligandos clasificados como agonistas inversos del receptor H2 a histamina (rH2) en base a la modulación de AMPc desencadenan mecanismos regulatorios de corte de señal. Para ello realizamos ensayos en células HEK293 transfectadas en forma transitoria con el rH2. Mediante ensayos de concentración-respuesta observamos que los ligandos: famotidina, tiotidina y ranitidina disminuyen los niveles basales de AMPc, comportándose efectivamente como agonistas inversos. A continuación evaluamos la pérdida en la capacidad de respuesta de AMPc al agonista amthamina luego del pretratamiento con los agonistas inversos. En dichas cinéticas observamos que el pretratamiento con famotidina provoca la desensibilización del rH2. Por otro lado, ensayos de unión mostraron una disminución en la cantidad de sitios receptores en la membrana plasmática luego de una hora de tratamiento con tiotidina o ranitidina en forma similar a lo observado con amthamina. Sin embargo, el agonista inverso famotidina a pesar de causar la desensibilización del rH2 no condujo a la internalización de mismo. En base a estos resultados podemos concluir que los agonistas inversos estudiados, a pesar de disminuir los niveles intracelulares de AMPc desencadenan distintos mecanismos de corte de señal como el desacople del receptor de la proteína G y la internalización de receptores. Estos mecanismos podrían a su vez, iniciar nuevas vías de señalización independientes de la modulación de proteínas G, descriptas para otros GPCRs.

290 (384) EFECTO DE LA ALDOSTERONA Y LA TRIPSINA SOBRE LA ACTIVIDAD DEL CANAL EPITELIAL DE SODIO (ENAC) EN CÉLULAS BEWO. Del Mónaco S.¹; Marino G.²; Assef Y.³; Kotsias B.⁴

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari - IDIM - CONICET^{1 2 3 4} <silmdm@yahoo.com>

La línea celular BeWo deriva de trofoblasto humano y ha sido utilizada para la investigación del transporte placentario. Hemos demostrado que estas células expresan el Canal Epitelial de Sodio (ENaC), molecular y funcionalmente. El objetivo de este trabajo es determinar la participación del canal en la migración de las células BeWo y estudiar el efecto de la tripsina sobre la actividad del mismo. Evaluamos la capacidad migratoria de las células realizando una herida en las monocapas y midiendo el porcentaje cicatrizado a las 6 h. Las células BeWo estimuladas con aldosterona (100 nM, 12 h) cubren una mayor superficie de las heridas (38,0 \pm 5,4 %), que las cultivadas sin estímulo (20,6 \pm 7,0%) o expuestas a amiloride 10 μ M (13,7 \pm 3,6 %), (p < 0,05, n = 16). El aumento de la cicatrización depende de la migración celular y no de la proliferación de las mismas. Mediante inmunocitoquímica observamos que las subunidades del canal se expresaron en mayor medida en las células del borde de la herida. Oligonucleótidos antisentido dirigidos contra α -ENaC redujeron la capacidad de desplazamiento de las células (p < 0,001, n = 16). Se comprobó que los mismos disminuyen la síntesis de la proteína α -ENaC (n = 3), y las corrientes de sodio activadas por aldosterona (p < 0,05, n = 4), (*patch clamp*, célula entera). Por último evaluamos el efecto de la tripsina sobre las corrientes de células BeWo tratadas con aldosterona. Observamos un aumento de las corrientes en todos los voltajes analizados estimulando con tripsina 10 μ g/mL (p < 0,05, n = 7), que se inhibieron luego con amiloride 10 μ M (p < 0,05, n = 4). Nuestros resultados suman evidencias sobre la presencia del ENaC en placenta y en células BeWo, y su participación en la migración celular. En preeclampsia, una expresión reducida del ENaC dados los niveles más bajos de aldosterona circulante generaría complicaciones en la normal actividad placentaria, tanto a nivel de transporte como en la capacidad invasiva del trofoblasto.

291 (466) CONTRIBUCIÓN DE LOS MECANISMOS DE CHEQUEO DE FASE S A LA SÍNTESIS POR TRANSLESIÓN DESPUÉS DE UV. Speroni J.¹; Soria G.²; Belluscio L.³; Mansilla S.⁴; Gottifredi V.⁵

Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica, Fundación Instituto Leloir^{1 2 3 4 5} <jsperoni@leloir.org.ar>

Diversos mecanismos celulares están encargados de proveer tolerancia al daño genómico al momento de la replicación de ADN. Entre éstos se destacan la vía de chequeo y la síntesis de ADN por Translesión (TLS). La vía de chequeo se activa por acumulación de ADN simple cadena que resulta de la acumulación de horquillas asimétricas asociadas a problemas de replicación. La TLS evita la acumulación de horquillas de replicación atascadas mediante el intercambio de polimerasas replicativas por polimerasas permisivas menos fieles con sitios activos laxos que aceptan bases dañadas como molde. Existe evidencia experimental que sugiere interconexión entre ambas redes. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la modulación negativa de los mecanismos de chequeo sobre las señales moleculares asociadas a la TLS y sobre la eficiencia del proceso de TLS en sí. Para esto, se utilizó como estrategia experimental la modulación negativa de diversas proteínas de chequeo (RPA, ATR, Rad17, Claspin y Chk1) mediante siRNAs, expresión de mutantes enzimáticamente inactivos e inhibidores químicos, y se estudió el efecto de la activación fallida de mecanismos de chequeo después de irradiación UVC sobre marcadores conocidos de TLS como la modificación post-traducciona (ubiquitinación) de la plataforma de cargado de polimerasas PCNA y la organización de una polimerasa permisiva, Polh, en estructuras focales después de UV. Por otro lado, se analizó la mutagénesis asociada a TLS deficiente en ausencia de mecanismos de chequeo mediante un ensayo de supervivencia en medio selectivo después de UV. Nuestros datos sugieren que el correcto funcionamiento de los mecanismos de chequeo es necesario para la eficaz activación de la Síntesis por Translesión y para mantener controlada la mutagénesis después de daño genómico.

292 (654) EL ESTRÉS MECÁNICO INDUCE LA SECRECIÓN DE LIF Y LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN CELULAS EPITELIALES MAMARIA EN CULTIVO. Quagliano A.¹; Rubinstein N.²; Romarowski A.³; Kordon E.⁴

IFIBYNE - CONICET; Departamento de Química Biológica, FCEyN - UBA^{1 2 3 4} <quagliano@qb.fcen.uba.ar>

Al destete, en la glándula mamaria se desencadena un proceso que llevará a la apoptosis masiva del epitelio secretorio. Se ha demostrado que son factores locales, como el Factor Inhibidor de Leucemias (LIF), los responsables de iniciar este proceso a través de la activación de factores de transcripción como STAT3. Aún se desconocen las señales específicas que desencadenan la liberación de estos factores, pero se hipotetiza que el estrés mecánico inducido por la acumulación de leche podría jugar ese rol. Utilizando un dispositivo diseñado y validado en nuestro laboratorio habíamos reportado que el estiramiento radial (ERa) de células epiteliales mamarias (HC11) creciendo sobre una membrana de silicona induce el ARNm de LIF y la fosforilación de STAT3. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el estiramiento de estas células puede inducir la secreción de LIF y éste a su vez provocar la fosforilación de STAT3 (pSTAT3) en células en reposo. Para ello, cuantificamos por ELISA los niveles de LIF en los medios condicionados (MCs) de HC11 a las cuales se les aplicó un ERa del 20% por distintos tiempos. Los niveles de LIF se incrementaron a las 8h, y fueron significativamente mayores al control (0,22±0,02ng/ml) a 15h (0,78±0,12ng/ml) y 24h (0,86±0,05ng/ml). Por Western blot, analizamos el efecto de MCs de células estiradas por 8, 15 y 24h sobre los niveles de pSTAT3 en HC11 en reposo. Observamos que los MCs colectados luego de 15 y 24h aumentaron significativamente los niveles de pSTAT3 en las células receptoras. Además esta inducción fue inhibida por el co-tratamiento con un anticuerpo bloqueante de LIF. Estos resultados indican que el estiramiento es capaz de activar factores involucrados en la involución mamaria no sólo en las células sometidas a este estrés sino también en células vecinas en reposo. De esta manera la falta de succión iniciaría un "efecto dominó" que permitiría el rápido involucramiento de todo el tejido en el proceso de involución mamaria.

293 (661) PROTEÍNAS CON DOMINIOS TPR REGULAN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y FUNCIÓN DE FACTORES NUCLEARES. Erlejman A.¹; Lagadari M.²; Mazaira G.³; Molinari A.⁴; Piwien Pilipuk G.⁵; Galigniana M.⁶

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA¹; IIBBA-CONICET²; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA³; IIBBA-CONICET⁵; IIBBA-CONICET; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA⁶ <erlejman@qb.fcen.uba.ar>

Los dominios TPR son secuencias de 34 aa repetidas en tandem y que participan en interacciones proteína-proteína. Sólo 5 aa están conservados, por lo que no es posible realizar predicciones certeras respecto del tipo de proteínas con las que se asocian. Una asociación relevante ocurre con hsp90, a través de la que podrían modular a las múltiples cascadas de señales asociadas tales como las de receptores esteroidales, NFκB, tirosina-kinasas, STATs, p53, etc. Entre las proteínas TPR mejor estudiadas están las inmunofilinas de alto PM (IMMs) y varias co-chaperonas, entre ellas FKBP5, CyPs, Hop, XAP2, PP5, 14-3-3, SGT1, etc. En nuestro laboratorio hemos descrito un nuevo modelo de acción para receptores esteroidales según el cual el complejo hsp90-factor TPR regula su relocalización subcelular y la actividad transcripcional. En este trabajo analizamos la funcionalidad de distintos factores TPR tales como FKBP51, FKBP52, SGT1á, Hop y 14-3-3. Encontramos que FKBP52 favorece el retrotransporte, el anclado nuclear y la actividad transcripcional de GR, en tanto que FKBP51, 14-3-3, Hop y SGT1á lo antagonizan. GR es fácilmente extraído de sus sitios de anclado nuclear si la expresión de FKBP52 es abolida con un iRNA o por KO del gen. Los otros factores TPR arriba mencionados antagonizan a FKBP52 y aceleran la exportación de GR. La unión de ligando favorece el recambio de FKBP51 y Hop por FKBP52 y PP5, los que a su vez unen proteínas motoras. Estudios similares con otros factores nucleares tales como p53 y NFκB también mostraron regulación por proteínas TPR. La subunidad RelA/p65 y la kinasa IKK del inhibidor IκB se unen a FKBP51, la que se disocia cuando las células se estimulan con ésteres de forbol. De manera análoga a GR, FKBP51 también inhibe la actividad transcripcional de NFκB. Tomados en su conjunto, estas observaciones describen un nuevo mecanismo regulatorio de las cascadas de señales a partir de proteínas TPR.

294 (424) DESARROLLO DE UN NANO-MANIPULADOR MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DEL ESTRÉS MECÁNICO EN LA INVOLUCIÓN MAMARIA. Toscani A.¹; Jares-erijman E.²; Coluccio Leskow F.³

Laboratorio de Biofísica Molecular, Centro Multidisciplinario 1, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{1 2 3} <amtoscani@fbmc.fcen.uba.ar>

Sensar estímulos mecánicos es esencial para el desarrollo, diferenciación y funcionalidad de varios tipos celulares. Luego del periodo de lactancia, la glándula mamaria sufre un proceso de involución por apoptosis que se propone es gatillado por el estiramiento del epitelio mamario producido por la acumulación de leche posterior al destete. La subunidad beta1-integrina cumple un papel fundamental en la morfogénesis de la glándula mamaria y es un componente de los focos de adhesión, estructuras de anclaje de las células a la matriz extracelular. Con el objetivo de estudiar el proceso de mecanotransducción a escala molecular, nos proponemos desarrollar un nano-manipulador molecular para el estudio en células epiteliales mamarias en cultivo. Para esto, se amplificó por PCR la región codificante de beta1-integrina y se insertó en la región extracelular una secuencia consenso de reconocimiento para la fosfopanteteinil-transferasa ACP. Esta proteína transfiere residuos 4'-phosphopanteteinilo desde la coenzima-A a una serina en la secuencia consenso, lo que permite el marcaje específico in vivo de la porción extracelular de beta1-integrina. Utilizando biotina-CoA como sustrato se obtiene biotina-beta1-integrina lo que permite la aplicación de fuerzas mediante la unión a sustratos unidos a estreptavidina como Q-dots, microesferas de magnetita o la micro-aguja de un microscopio de

fuerza atómica. Esta metodología permite el estudio del proceso de mecanotransducción a nivel de focos de adhesión individuales. Al aplicar de fuerzas sobre una molécula en particular, se podrá seguir por microscopia de fluorescencia la activación de cascadas de señalización utilizando distintos biosensores basados en FRET.

- 295 (794) CLONADO Y CARACTERIZACIÓN DE β 3-CHIMAERIN: UN NUEVO GAP CON ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA RAC, REGULADO POR DAG.** Zubeldia Brenner L.¹; Coso O.²; Jares-erijman E.³; Coluccio-leskow F.⁴

Laboratorio de Biofísica Molecular, Centro Multidisciplinario 1, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA¹; IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA²; Laboratorio de Biofísica Molecular, Centro Multidisciplinario 1, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA³; ⁴ <lautaro@fbmc.fcen.uba.ar>

Las chimaerinas o quimerinas son una familia de receptores para diacilglicerol (DAG) y ésteres de forbol con actividad de GAP específica para Rac. Existen cuatro isoformas descritas hasta el momento (α 1, α 2, β 1 y β 2). Todas las quimerinas poseen un dominio GAP responsable de su actividad y un dominio C1, como el de las PKCs, capaz de pegar DAG y ésteres de forbol. Por otro lado, α 2 y β 2-chimaerin presentan un dominio SH2 en su porción N-terminal involucrado en funciones autoinhibitorias según el modelo de activación alostérica recientemente propuesto. En ensayos de Western blot de lisados de distintos tejidos, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-quimerina, se detectaron bandas de un peso molecular ligeramente mayor a β 2-chimaerin. En la base de datos del NCBI se encontraron varios ESTs que codifican para una isoforma con un extremo N-terminal desconocido. Esta isoforma que denominamos β 3-chimaerin, tiene su origen de transcripción 48 Kb río arriba del de β 2-chimaerin y se expresa en riñón, glándula adrenal, corazón y cerebro. Se llevó a cabo el clonado molecular de β 3-chimaerin utilizando como molde cDNAs humanos comerciales de riñón y de encéfalo. La región codificante para β 3-chimaerin se subclonó en distintos vectores de expresión. Células transfectadas con estas construcciones se estimularon con PMA, en presencia de inhibidores de PKCs, observándose la translocación de β 3-chimaerin desde el citoplasma hacia la membrana plasmática y el perinúcleo, afectando los niveles de activación de Rac. Estos resultados confirman el modelo de activación por DAG y sugieren que el dominio N-terminal de β 3-chimaerin le confiere una regulación diferencial.

ENDOCRINOLOGIA 4

- 296 (280) EXPRESIÓN ATÍPICA DE RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA Y DE RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN LA HIPERPLASIA DE CÉLULAS DE LEYDIG EN TESTÍCULOS DISGENÉTICOS Y EN TUMORES DE CÉLULAS DE LEYDIG.** Berensztein E.¹; Costanzo M.²; Warman M.³; Guercio G.⁴; Ciaccio M.⁵; Marino R.⁶; Bailez M.⁷; Davila M.⁸; Ponzio R.⁹; Rivarola M.¹⁰; Belgorosky A.¹¹

Hospital de Pediatría Garrahan; IDIR Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires¹; Hospital de Pediatría Garrahan^{2 3 4 5 6 7 8}; IDIR Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires⁹; Hospital de Pediatría Garrahan¹⁰ ¹¹ <esperanzabb2004@yahoo.com.ar>

Altos niveles de aromatasa (ARO) y receptor de estrógenos alfa (ER α) están asociados con proliferación de células de Leydig (CL) y tumorigenesis. Si bien en CL fetal el receptor de andrógenos (AR) está ausente, es necesario en CL adulta para su normal diferenciación. Previamente postulamos que el pool de CL está modulado por IGFs, estrógenos y andrógenos durante la prepubertad (PP) normal, así como alta expresión de ER β y ARO y ausencia de ER α en CLPP (Berensztein et al, 2006). Hipótesis: la falta de acción androgénica y/o el aumento de acción estrogénica estarán involucradas en la hiperplasia de CL obser-

vada en la disgenesia testicular. El objetivo fue analizar la inmunoexpresión de ER α , ER β , ARO y AR en CL de testículos disgenéticos y de tumores de CL (TCL). Material clínico: Grupo (Gr)1: dos pacientes 46, XY DSD, uno PP y otro puberal (PU) de 18 y 148 meses (m), con mutación heterocigota del gen SF1 (W279X y Y183X). Gr2: tres pacientes 46, XY de 15, 53 y 75 m, con síndrome de insensibilidad a los andrógenos completa (R831X, c1550-1569del y L821P). Gr3: tres pacientes 46, XY de 19, 46 y 80 m con TCL. Los tejidos fueron obtenidos por biopsia u orquidectomía. Controles de testículos PP (CPP) de necropsia (n=15) y PU (CPU) de biopsias por varicocele (n=5) fueron utilizados. En GR1, la histología reveló disgenesia gonadal con hiperplasia de CL. Las CL presentaron expresión citoplasmática de ARO, ER α y ER β y ausencia de AR. CL de CPP no expresaron ER α mientras que CL de CPU si expresaron ER α . Expresión nuclear de AR del 7 a 13% en CL CPP y de 52% en CL CPU fue observada. Hiperplasia de CL, con expresión citoplasmática de ER α , ER β y ARO y ausencia de AR también se encontró en todos los pacientes del Gr2 y Gr3. Se postula que elevados niveles de estrógenos locales vía ER α podrían participar en el crecimiento, proliferación y transformación neoplásica de CL. La falta de AR podría alterar la diferenciación de CL en el testículo disgenético durante el desarrollo puberal

- 297 (128) EFECTO DE FRAGMENTOS PROTEOLÍTICOS DE PROLACTINA, VASOINHIBINAS, SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS.** Ferraris M.¹; Radl D.²; Zarate S.³; Jaita G.⁴; Boti V.⁵; Eijo G.⁶; Magri L.⁷; Zaldivar V.⁸; Seilicovich A.⁹; Clapp C.¹⁰; Pisera D.¹¹

IDIR, Facultad de Medicina, UBA^{1 2 3 4 5 6 7 8 9}; Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)¹⁰; IDIR, Facultad de Medicina, UBA¹¹ <mferraris@fmed.uba.ar>

La adenohipofisis está sometida a un proceso de renovación celular que, en la rata hembra, parece estar coordinado por los niveles circulantes de esteroides gonadales. Durante el proestro, cuando la tasa de apoptosis es máxima, se produce un pico de prolactina. La prolactina puede ser clivada y dar origen a fragmentos denominados vasoINHIBINAS (Vi) que poseen un efecto anti-angiogénico al inhibir la proliferación e inducir apoptosis de células endoteliales. Su producción varía a lo largo del ciclo estral en otros tejidos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción de las Vi sobre los procesos de apoptosis y proliferación de células adenohipofisarias. Observamos por western blot la presencia de Vi tanto en proteínas extraídas de células adenohipofisarias como en medios provenientes de células adenohipofisarias en cultivo. Una preparación recombinante de Vi (10 y 100 nM) indujo apoptosis (determinada por FACS) de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembras ovariectomizadas. (% de células apoptóticas, media \pm ES. Control (C): 16.7% \pm 2.0; Vi 10 nM 24.1 \pm 1.5, p<0.01; Vi 100 nM 23.4% \pm 0.3, p<0.05, Dunnet). Este efecto no fue observado en presencia de estradiol (E2). Las Vi (10 nM) disminuyeron la proliferación inducida por forskolina (evaluada por incorporación de BrdU) de células adenohipofisarias totales y lactotropos (% de células BrdU positivas) incubadas en presencia de vehículo (Totales: C: 5.0%; Vi 2.2%; Lactotropos: C: 8.1%; Vi 2.9%, p<0.01, \pm) o de E2 (totales: C: 5.4%; Vi 0.8%, p<0.01. Lactotropos: C: 8.3%; Vi 1.3%, p<0.01; \pm). Estos resultados sugieren que las Vi están presentes en la adenohipofisis y que podrían estar involucradas en el control de la población de células adenohipofisarias a través de efectos proapoptóticos y antiproliferativos.

- 298 (213) TESTOSTERONA Y ENDOTELIO VASCULAR: SÍNTESIS DE VASOACTIVOS Y PROLIFERACIÓN CELULAR.** Campelo A.¹; Cutini P.²; Massheimer V.³

Universidad Nacional del Sur^{1 2 3} <acampelo@criba.edu.ar>

Previamente demostramos que la Testosterona (T) estimula en forma no genómica, la síntesis de vasoactivos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el mecanismo por el cual T regula la producción de óxido nítrico (NO) y la proliferación celular en

anillos de aorta torácica (AAT) o en cultivos primarios de células endoteliales (CE) de origen murino. Siendo la óxido nítrico sintasa (NOS) una enzima regulable por calcio y fosforilación, se evaluó la contribución del calcio y del sistema PKC en la acción del esteroide sobre la síntesis NO (medido por Griess). En presencia de Chelerythrine 0.5 μ M (inhibidor PKC), se suprime el estímulo inducido por 5 min. de tratamiento con T (4.25 ± 1.10 vs 7.84 ± 2.27 ; 4.84 vs ± 4.98 nmolNO/mg prot, C vs T; C+Chel vs T+Chel, $p < 0.001$). En un medio libre de calcio (EGTA) o en presencia de antagonistas de canales de calcio (Verapamil), el estímulo del esteroide sobre la producción de NO se atenuó significativamente (82.6 ; 29.6 ; 23.2 % s/control, T; T+EGTA; T+Verapamil), evidenciando que la regulación por T de la producción de NO requiere de calcio extracelular y de la vía PKC. Dado que el NO es un inhibidor de la agregación plaquetaria (AP), se estudió el rol de T sobre la AP dependiente de endotelio. AAT se incubaron en un plasma rico en plaquetas en presencia de T y se midió la AP inducida por ADP. El tratamiento con T (1-5 min) inhibió significativamente la AP y se demostró que este efecto antiagregante es dependiente de NO, ya que la preincubación con L-NAME (inhibidor de la NOS), anuló la acción del esteroide. Se estudió la proliferación celular (mediante la técnica de incorporación de 3 [H]-timidina) en CE tratadas 12-48h con T (0.01-1nM). El tratamiento con T estimuló la proliferación (17.25 ± 1.4 vs 25.4 ± 4.4 , C vs T, $p < 0.05$). Este efecto mitogénico fue atenuado en presencia de L-NAME. Los resultados presentados muestran una interacción entre acciones genómicas (síntesis de ADN) y no genómicas (producción de NO) de T a nivel vascular.

299 (338) CRONOLOGÍA DE APARICIÓN DE CÉLULAS INGAP POSITIVAS Y SU RELACIÓN CON EL AUMENTO DE LA MASA CELULAR B DURANTE EL PERÍODO INTRAUTERINO Y POSTNATAL. Madrid V.¹; Maiztegui B.²; Raschia M.³; Flores L.⁴; Borelli M.⁵; Gagliardino J.⁶; Del Zotto H.⁷

CENEXA^{1 2 3 4 5 6 7} <vivianamadrid@hotmail.com>

Estudios previos mostraron que el INGAP (Proteína Asociada a la Neogénesis Insular) participa en el control del crecimiento de la masa β en el animal adulto, pero se desconoce su papel durante la embriogénesis; para responder a este interrogante estudiamos la cronología de aparición de células INGAP-positivas durante el desarrollo intrauterino y la evolución de su masa en relación a la masa de células β . Utilizamos fetos de 11(E11), 17(E17) y 19(E19) días de gestación y crías de una semana (P7) provenientes de ratas Wistar normales. Medimos glucemia (G), pesos corporales (P) y del páncreas (PP) y en este último realizamos estudios morfométricos. La G fue mayor en P7 ($61,8 \pm 3,08$ vs. $56,6 \pm 2,4$ vs. $88,13 \pm 0,9$). Los valores de P y PP aumentaron con la edad (P $0,85 \pm 0,03$ vs. $1,84 \pm 0,04$ vs. $12,31 \pm 0,22$ g), PP ($1,70 \pm 0,07$ vs. $3,68 \pm 0,08$ vs. $24,07 \pm 1,05$ mg). La masa celular β también fue mayor en P7 ($0,00586 \pm 0,0013$ vs. $0,0241 \pm 0,076$ vs. $0,33 \pm 0,092$); este aumento se debió en parte a un aumento significativo del número de células β por islote ($55,1 \pm 5,3$ vs. $36,5 \pm 8,6$ vs. $147,1 \pm 66,7$ células/islote). El aumento progresivo de la masa de células CK19-positivas ($0,01 \pm 0,001$ vs. $0,02 \pm 0,002$ vs. $0,25 \pm 0,09$ mg; $p < 0,05$) y la disminución progresiva de la tasa de apoptosis ($3,4 \pm 2,3$ vs. $1,6 \pm 0,1\%$; $p < 0,05$) en función de la edad, sugiere que la neogénesis extrainsular y la apoptosis también contribuyeron al crecimiento de la masa celular β . Las células INGAP-positivas se observaron recién a partir de E17 con un incremento significativo de su masa en P7 ($0,044 \pm 0,02$ vs. $0,01 \pm 0,002$ vs. $0,15 \pm 0,06$ mg). La aparición de células INGAP-positivas en el momento de diferenciación masiva de las células endócrinas (E17), sugieren que durante el período fetal normal el INGAP promueve el aumento de la masa celular β .

300 (370) IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MUTACIONES NATURALES EN EL GEN DE LA TIROGLOBULINA. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS INACTIVANTES SOBRE LOS DOMINIOS FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA. Citterio C.¹; Teimoy X.²; Machiavelli G.³; Belforte F.⁴; Olcese M.⁵; González-sarmiento R.⁶; Rivolta C.⁷; Targovnik H.⁸

Cátedra de Genética y Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires¹; Departamento de Medicina Facultad de Medicina Universidad de Salamanca²; Cátedra de Genética y Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires^{3 4 5}; Departamento de Medicina Facultad de Medicina Universidad de Salamanca⁶; Cátedra de Genética y Biología Molecular Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires; Departamento de Medicina Facultad de Medicina Universidad de Salamanca^{7 8} <ccitterio@ffyb.uba.ar>

La tiroglobulina (TG) es la proteína más abundante expresada por la glándula tiroidea. La biosíntesis de las hormonas tiroideas es dependiente de la estructura tridimensional de la TG. En humanos la TG es codificada por un único gen de 270 Kb que comprende 48 exones. El monómero preproteico contiene 2768 residuos. El objetivo del presente trabajo es identificar y caracterizar a nivel estructural y funcional nuevas mutaciones naturales del gen de TG y estudiar sus efectos inactivantes en los diversos dominios proteicos. Se secuenciaron los 48 exones del gen de la TG en pacientes con bocio, hipotiroidismo y bajos niveles de TG sérica. Se identificaron 10 nuevas mutaciones: 1) un error de splicing en la secuencia dadora de splicing del intrón 6 (g.IVS6+1G>A); 2) dos sustituciones, en el exón 17 (c.3842 G>A [p.C1262Y]) y en el exón 33 (c.6000C>G [p.C1981W]) que originan la eliminación de las respectivas cisteínas; 3) una sustitución en el exón 17 que crea una cisteína que puede intervenir en la formación de un nuevo puente disulfuro (c.3808C>T [p.R1251C]); 4) un cambio de la serina por leucina en el exón 17 (c.3665C>T [p.S1203L] que se encuentra en un sitio de glicosilación; 5) una delección de una adenina en el exón 28 (c.5466delA [p.K1803fsX1832]); 6) dos codones de terminación prematuros en los exones 27 (c.5386C>T [p.Q1777X]) y 40 (c.7006C>T [p.R2317X]); 7) una delección completa del exón 48 con pérdida de los sitios hormonogénicos carboxilo-terminal y 8) una sustitución en el exón 38 con cambio de prolina por arginina (c.6605C>G [p.P2183R]). Se realizaron estudios poblacionales, funcionales y bioinformáticos para validar las mutaciones. Se identificaron también 4 mutaciones conocidas (p.R277X, p.R1511X, p.A2215D y p.R2223H). En conclusión, los efectos más importantes de las mutaciones en el gen de TG originan proteínas truncadas, afectan las cisteínas y como consecuencia se producen cambios conformacionales y se eliminan sitios hormonogénicos.

301 (713) IDENTIFICACIÓN, PAPEL Y MECANISMO DE ACCIÓN DE TRANSCRIPTOS ANTISENTIDO NATURALES DE LA PROTEÍNA STAR (STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY) SOBRE EL TRANSPORTE DE COLESTEROL EN LA ESTEROIDOGÉNESIS. Castillo A.¹; Smith E.²; Neuman I.³; Castilla R.⁴; Podestá E.⁵

Departamento de Bioquímica, IIMHNO, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5} <castillofernanda@yahoo.com>

En la esteroidogénesis, la proteína StAR es una mediadora obligatoria en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, paso limitante de este proceso. Los transcritos antisentido naturales (*Natural antisense transcripts* o NATs) son ARNs endógenos complementarios a los ARNm sentido. Numerosos NATs regulan la expresión génica de sus contrapartes sentido a diferentes niveles (transcripción, maduración, transporte, estabilidad y traducción). Dado que la proteína StAR tiene tres transcritos regulados temporalmente en forma diferente ante el mismo estímulo hormonal, el objetivo de este estudio es evaluar la existencia de NATs como mecanismo de regulación diferencial en la expresión de StAR. A partir de ARN total de células murinas de Leydig MA-10 se identificó la presencia de NATs de StAR utilizando el método de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Se identificó y secuenció un transcripto antisentido totalmente complementario al ARNm de mayor tamaño de StAR. Su existencia fue verificada por RT-PCR específica de secuencia y por ensayo de protección de ARNasas (RPA). La expresión de este transcripto fue

corroborada en tejidos esteroideogénicos de ratón (testículo, ovario, adrenal y cerebro). hCG u 8Br-AMPC incrementan la expresión de este transcrito, determinada por RT-PCR y RPA, alcanzando un máximo a las 2-3 hs de estimulación (expresión relativa en unidades arbitrarias: control $0,46 \pm 0,02$ vs hCG $0,94 \pm 0,12$ $p < 0,01$; control $0,61 \pm 0,02$ vs 8Br-AMP $1,52 \pm 0,07$ $p < 0,05$). Se observó que la expresión del NAT de StAR regula la expresión de los diferentes transcritos de StAR, lo que se ve reflejado en la esteroideogénesis. Así, la velocidad de síntesis de esteroides podría estar regulada por la expresión de este NAT. El mecanismo de acción de los NATs está descrito sólo en algunos procesos fisiológicos eucariotas. Estos resultados contribuirán a la comprensión del rol de los NATs en los mecanismos moleculares de la expresión génica y la síntesis proteica.

NEUROCIENCIAS 3

302 (626) LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL INVOLUCRA EL YING-YANG DE INMUNOFILINAS DE ALTO PESO MOLECULAR. Quinta H.¹; Galigniana M.²

IIBBA-CONICET¹; IIBBA-CONICET²; Departamento de Química biológica - FCEN-UBA² <hquinta@leloir.org.ar>

Las inmunofilinas (IMMs) existen en complejos con hsp90 y p23, siendo además receptores intracelulares de drogas inmunosupresoras tales como FK506. Observamos que la activación de la IMM FKBP52 con FK506 favorece la diferenciación de células N2a hacia un fenotipo neuronal. Ensayos comparativos entre dBcAMP (un agente diferenciador estándar), IBMX (inhibidor de fosfodiesterasas), ciclosporina A (ligando de la otra familia de IMMs, las ciclofilinas) y radicicol (inhibidor de hsp90), demostraron que FK506 tuvo el máximo efecto sobre el largo promedio de las neuritas generadas por el tratamiento ($e \geq 120 \mu\text{m}$), aún por sobre el de dBcAMP ($\sim 80 \mu\text{m}$). Ciclosporina A mostró efectos tóxicos y radicicol un efecto subóptimo ($\sim 50 \mu\text{m}$). Western blots evidenciaron la inducción de marcadores de diferenciación neuronal típicos (Map-2, Tau y BIII-Tubulina) así como de hsp90, FKBP52 y p23, mientras que los niveles de la IMM FKBP51 no se modificaron. Por microscopía confocal observamos que, tanto en células N2a indiferenciadas como en cultivos primarios de embrión de rata, hsp90, FKBP52 y p23 co-localizan en forma de anillo perinuclear. Al inducirse la diferenciación, tal anillo se desensambló, siendo hsp90 y FKBP52 las que migraron en primer lugar al citoplasma, concentrándose FKBP52 en los conos de ramificación y crecimiento rodeada por hsp90. Simultáneamente, FKBP51 tomó el lugar de FKBP52 en el anillo perinuclear. FKBP52 colocalizó mayoritariamente con Tau en los axones, los que fueron más largos que los de neuronas no tratadas con FK506. Cuando se sobreexpresó a FKBP52 o se hizo el *knock-down* de FKBP51, la cinética de diferenciación fue mayor. El *knock-down* de FKBP52 desfavoreció la formación del anillo y la diferenciación, la que también se inhibió por sobre-expresión de FKBP51. Concluimos que durante la diferenciación neuronal se produce un *ying-yang* entre FKBP52 y FKBP51, IMMs que parecen ser esenciales para dicho fenómeno.

303 (70) EXPRESIÓN DE AROMATASA BASAL Y POS-TRATAMIENTO CON ESTRADIOL EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS (SHR). Pietranera L.¹; Bellini M.²; García Segura L.³; De Nicola A.⁴

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET¹; Instituto Cajal-CSIC. Madrid, España^{2,3}; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁴ <lpetra@dna.uba.ar>

En trabajos anteriores describimos en un modelo de hipertensión experimental, la rata SHR, numerosos cambios hipocámpales, tales como disminución de la proliferación en el giro dentado, astrogliosis y menor número de células en el hilio. Estos cambios revierten luego del tratamiento con estradiol. En este tra-

bajo investigamos la expresión de aromatasa, enzima responsable de la síntesis endógena de estradiol. La enzima se expresa en el SNC particularmente en el hipocampo, está involucrada en la regulación de la plasticidad neuronal, se le reconoce un efecto neuroprotector y su expresión aumenta en respuesta a la injuria. Se utilizaron ratas macho SHR (PA: 180 mmHg) y WKY de 16 semanas de vida los cuales fueron implantados con un pellet de 12 mg de benzoato de estradiol o colesterol durante dos semanas. En un grupo de animales se extrajeron los hipocampos y se procesaron para extracción de ARN y posterior cuantificación de la expresión del ARNm de aromatasa por PCR en tiempo real. Otro grupo de animales fue anestesiado y profundido con paraformaldehído y los cerebros procesados para inmunohistoquímica para aromatasa. Los resultados de la PCR mostraron que el ARNm de aromatasa aumenta en los animales SHR y SHR+E₂: $3,36 \pm 0,46$, unidades arbitrarias. $p < 0,05$). La inmunohistoquímica mostró intensa expresión de aromatasa en procesos neuronales en el hilio del GD. Se cuantificó la longitud de la red neurítica y los resultados mostraron un aumento en la longitud de la red en los animales hipertensos y en los hipertensos tratados con estradiol (WKY: $742,60 \pm 66,97$; SHR: $1576,54 \pm 231,20$; SHR+E₂: $2110,17 \pm 220,45$, μm . $p < 0,01$). Conclusiones: La hipertensión arterial induce un aumento en la expresión de aromatasa del hipocampo. Los estrógenos exógenos y los localmente producidos por la aromatasa actuarían en conjunto ejerciendo efectos neuroprotectores sobre la encefalopatía hipertensiva.

304 (95) EL ESTEROIDE NEUROACTIVO PROGESTERONA EJERCE UN EFECTO RETARDADOR DIFERENCIAL EN LA APARICIÓN DE LOS SIGNOS DE NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA POR 6 OH-DOPAMINA. Casas S.¹; Giuliani F.²; Escudero C.³; Laconi M.⁴; Yunes R.⁵; Cabrera R.⁶

Area de Farmacología Facultad de Ciencias Médicas UNCuyo Centro de Investigación Superior Universidad de Mendoza LINCE IMBECU CONICET^{1,2,3,4,5,6} <casas_sebastian@hotmail.com>

La acción de progesterona (P) sobre fenómenos reproductivos es ampliamente conocida. Sin embargo se han descrito funciones no reproductivas tales como, la modulación de la cognición, la inflamación, la neuroprotección y la neurogénesis. La enfermedad de Parkinson (EP), es una condición neurodegenerativa de los ganglios basales. Nuestro objetivo fue estudiar si P ejerce un efecto neuroprotector en EP. Para inducir neurodegeneración se utilizó el modelo de 6-hidroxi-dopamina, inyectada en el cuerpo estriado izquierdo (CEI). Se evaluó la actividad motora rotacional contralateral al lado lesionado (rotaciones a la derecha D), inducida con amfetamina y apomorfina semanalmente durante 8 semanas pos-lesión. Se diseñaron 4 grupos experimentales: 1) SHAM, 2) lesionados; 3) lesionados y tratados a los 7 días pos-lesión con P 4 mg/kg s.c. durante 3 días, y 4) lesionados y tratados a las 24 horas pos-lesión con P 4 mg/kg s.c. durante 3 días. Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y se analizaron por "t" Test entre los grupos ($p < 0,05$ fue significativo) ($n = 10$ /grupo). El grupo 1 mostró un patrón rotatorio similar hacia ambos lados (derecha (D) = $111,5 \pm 19,2$, izquierda (I) $117,6 \pm 16,3$). El grupo 2, presentó una significativa actividad rotacional contralateral al lado lesionado, a partir de la 4ª semana (D = $235,9 \pm 36,4$, I = $51,9 \pm 10,5$, $p < 0,05$) manteniéndose hasta la 8ª semana (D = $134,6 \pm 28,9$, I = $20 \pm 6,2$, $p < 0,05$). No se observó la aparición de contralateralidad significativa en el grupo 3 durante las 8 semanas evaluadas (D = $7,6 \pm 5,1$, I = $114,5 \pm 16,2$). En contraposición, el grupo 4, presentó un patrón rotatorio contralateral a partir de la 5ª semana manteniéndose hasta la 8ª, (D = $144,6 \pm 25,6$; I = $42,0 \pm 10,5$ $p < 0,05$) (D = $138,2 \pm 15,9$; I = $38,4 \pm 14,4$ $p < 0,05$). Concluimos que la Progesterona ejerce un efecto retardador diferencial en la neurodegeneración, dependiendo del momento de su administración, proponiendo a esta hormona como un efectivo neuroprotector en esta patología experimental.

305 (161) MODULACIÓN A LARGO PLAZO DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA TIROSINA HIDROXILASA (TH) POR LAS ENDOTELINAS 1 Y 3 EN BULBO OLFATORIO (BO) DE RATA. Nabhen S.¹; Battistone A.²; Guil J.³; Bianciotti L.⁴; Vatta M.⁵

Cátedra de fisiología; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2 3}; Cátedra de fisiopatología; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA⁴; Cátedra de fisiología; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA⁵ <snabhen@yahoo.com.ar>

Los bulbos olfatorios (BOs) se relacionan con áreas del SNC que regulan la función cardiovascular (NTS, sistema límbico e hipotálamo) y expresan la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) que está regulada a corto y a largo plazo por complejos mecanismos. Las Endotelinas (ETs) y sus receptores también se encuentran en esta región del SNC, sugiriendo su posible participación en la regulación en dicha función biológica. El objetivo del presente trabajo es estudiar los efectos de las ETs a largo plazo sobre la actividad y expresión de la TH y los mecanismos intracelulares involucrados. Los BOs se incubaron durante 240 min en ausencia o presencia de ETs, de los antagonistas de los receptores de ETs (ET_A y ET_B) y de inhibidores de vías intracelulares. Se determinó la actividad de TH por método radioenzimático y los niveles de proteína TH total y de los sitios fosforilados por Western Blot. Los resultados se expresan como % vs control (ANOVA y test de Student-Newman-Keuls, p<0.05; n: 5-8). Los resultados muestran que ET-1 y ET-3 10 pM, incrementan la actividad de TH (44% y 52% vs. control, respectivamente), en presencia de BQ-610 (antagonista del receptor ET_A), la respuesta a ambas ETs disminuyó (ET₁+BQ-610:53% y ET₃+BQ-610:65% vs. ET-1 y ET-3, respectivamente). En presencia de antagonista de las vías intracelulares: PKA, CAMK-II y PKC, la actividad de la TH decreció vs. ET-1 y ET-3: H-89 500nM (ET₁:39% y ET₃:54%), KN-62 1 uM (ET₁:64% y ET₃:72%), GF-109203x 100 nM (ET₃:36%). Ambas ETs aumentaron los niveles de proteína TH total (ET₁:154% y ET₃:104% vs. control), pSer19(ET₁:42% y ET₃:54% vs. control), pSer31(ET₁:44% y ET₃:33% vs. control) y pSer40(ET₁: 80% y ET₃: 85% vs. control). Estos resultados nos permitieron concluir que las ETs incrementan la actividad de TH a través del receptor ET_A activando la vía de la PKA, CAMK-II y PKC (sólo en el caso de la ET-3) mediante un aumento de los niveles de proteína TH total y de sus formas fosforiladas: pSer19, pSer31 y pSer40.

306 (534) ASIMETRÍA DE LA MODULACIÓN DE LA TRANSMISIÓN NORADRENERGICA POR ENDOTELINAS EN EL BULBO OLFATORIO DE RATAS DOCA-SAL. Abramoff T.¹; Guil M.²; Nabhen S.³; Hope S.⁴; Bianciotti L.⁵; Vatta M.⁶

Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco^{1 2 3 4}; Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, U⁵; Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco⁶ <tami@awj.com.ar>

En trabajos previos demostramos que las endotelinas (ETs) modulan la actividad y cantidad de tirosina hidroxilasa (TH) en el bulbo olfatorio (BO) derecho e izquierdo (BOD y BOI) de ratas DOCA-Sal. Sobre esta base, el objetivo del presente trabajo fue dilucidar los efectos de las ETs aplicadas exógenamente sobre la captación y liberación neuronal de noradrenalina (NA) en ratas hipertensas DOCA-Sal. 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. Se observó una disminución de la actividad del transportador de noradrenalina (NET) en ambos BO de animales DOCA-Sal del 30%. Sorprendentemente y sólo en BOD de animales DOCA-Sal, ET-1 y ET-3 aumentaron la captación neuronal de NA en un 50 y 100% respectivamente con respecto a animales normotensos. Cuando analizamos la liberación neuronal encontramos que sólo en BOD de ratas DOCA-Sal hay un incremento del 200%. Además, las ETs

inhiben la liberación neuronal en este tejido en un 50%, mientras que en BOI no tienen ningún efecto. Los resultados nos permiten demostrar la existencia de una asimetría en la modulación de la transmisión noradrenergica mediada por ETs en el BO de animales DOCA-Sal. El significado fisiopatológico de esta asimetría se desconoce. Además, estos resultados sugieren que el BO de los animales DOCA-sal tendría un efecto simpatoexcitatorio. Sin embargo, las ETs en el BO de los animales hipertensos presentan efectos diferentes a los que se observan en normotensos.

307 (827) GALECTINA-1 PARTICIPA EN LOS PROCESOS DE DESMIELINIZACIÓN Y REMIELINIZACIÓN A TRAVÉS DE SU CAPACIDAD DE ACTIVAR ASTROCITOS E INDUCIR LA EXPRESIÓN BDNF. Millet V.¹; Rabinovich G.²; Pasquini J.³; Pasquini L.⁴

Depto de Química Biológica IQUIFIB Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA¹; IBYME-CONICET²; Depto de Química Biológica IQUIFIB Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{3 4} <viomillett@gmail.com>

Gal-1 se ha asociado con funciones extra e intracelulares. Nuestros resultados y los reportados por otros autores han demostrado que Gal-1 se expresa en SNC predominantemente en astrocitos e induce la diferenciación astrogliar que lleva a la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). La expresión de BDNF aumenta en lesiones agudas y disminuye en las crónicas de MS, como en el modelo animal de EAE. La administración exógena de BDNF reduce la severidad de la EAE y se sugirió que el BDNF mejora la remielinización en SNC y SNP. Basados en estos antecedentes evaluamos la participación de Gal-1 en procesos de desmielinización y remielinización en el modelo de intoxicación con cuprizona (CPZ), en ratones 129sv Gal1^{-/-} y Gal1^{+/+} y en ratones C57BL-6 transgénicos que expresan EGFP bajo el promotor de 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), característica de células oligodendrogliales, a las 3 y 5 semanas de inicio de la dieta. Observamos una clara desmielinización en ratones CNP-EGFP alimentados con 0.2% de CPZ en función del tiempo de dieta. Además obtuvimos una disminución en la expresión de BDNF en la zona subventricular y un cambio en el patrón de expresión en la corteza en animales 129sv y C57BL-6. Los animales 129sv resultaron menos susceptibles a la desmielinización inducida por CPZ en cuerpo calloso y corteza a las 5 semanas de intoxicación (inmunoquímica de MBP). Se observaron menores niveles de mielinización corticales basales en animales Gal1^{-/-} y mayor desmielinización en respuesta a CPZ. Los niveles de activación astrocitaria fueron inferiores en los animales Gal1^{-/-} con respecto a los Gal1^{+/+} en respuesta a CPZ y obtuvimos niveles disminuidos en la expresión de BDNF en los Gal1^{-/-} en respuesta al tratamiento en relación a los Gal^{+/+}. Los resultados indican que Gal-1 actuaría en procesos de desmielinización y remielinización a través de su capacidad de activar a los astrocitos e inducir la expresión BDNF.

308 (586) PARTICIPACIÓN DEL GLUTAMATO EN LA PROTECCIÓN DEL DAÑO ISQUÉMICO EN LA RETINA DE RATA INDUCIDO POR POSTCONDICIONAMIENTO. Fernández D.¹; Chianelli M.²; Rosenstein R.³

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CEFyBO-CONICET^{1 2 3} <diegofil@yahoo.com.ar>

El daño isquémico es un componente central de diversas enfermedades retinianas severas que pueden provocar ceguera. En trabajos previos hemos demostrado que el postcondicionamiento isquémico (PostC) provee una protección funcional e histológica significativa frente al daño isquémico retiniano. Múltiples evidencias indican que el aumento en las concentraciones sinápticas de glutamato (Glu) es un factor causal del daño isquémico retiniano. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación del sistema glutamatérgico en el mecanismo protector inducido por PostC.

La isquemia se indujo por aumento de la presión intraocular a 120 mm Hg por 40 min, y 5 min después de la isquemia en un ojo de cada animal se aplicaron 7 pulsos de isquemia/reperusión (I/R) de 1min/1min. La protección funcional (por electroretinografía) e histológica inducida por el PostC fue significativa sólo a partir de 7 días post-isquemia. La inmunomarcación para GFAP en células de Müller disminuyó a los 3 días de reperusión en retinas postcondicionadas, comparado con retinas isquémicas. Asimismo, se analizó el uptake de [³H]-Glu en sinaptosomas y la actividad de la glutamina sintetasa (por espectrofotometría) en homogenatos retinianos a los 3 días post-isquemia. En retinas isquémicas se observó una disminución ($P<0,001$ vs control) de ambos parámetros, que fueron significativamente revertidos por el PostC. No se observaron cambios en la liberación de Glu o glutamina, y en la actividad de la glutaminasa entre los grupos experimentales. La inyección intravítrea de Glu indujo una disminución ($P<0,001$ vs Control) electroretinográfica y alteraciones histológicas en la retina interna, en tanto que la aplicación de 7 pulsos de I/R a los 5 min revirtió completamente el daño causado por la inyección de Glu. En suma, estos resultados sugieren que el PostC protege la retina al revertir el aumento en las concentraciones de Glu, a través de un mecanismo que involucra probablemente a las células de Müller.

ONCOLOGIA 4

309 (195) LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS ARÍLICOS (AHR) MEDIA EL EFECTO ANTITUMORAL DE LA DROGA AMINOFLAVONA EN CÁNCER DE RIÑÓN. Suárez G.¹; Itkin B.²; Loaliza Perez A.³

Área Investigación, Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", Universidad de Buenos Aires^{1 2 3}
<suarez_guadalupe@hotmail.com>

Aminoflavona (AF), una nueva droga antitumoral actualmente en ensayos clínicos de Fase I, presenta actividad antitumoral sobre células de cáncer de mama y renal. El efecto de AF es mediado por el Receptor de hidrocarburos Arílicos (Ahr) en células mamarias donde AF induce la translocación nuclear y la activación del mismo, lo cual aumenta los niveles de los citocromos CYP1A1/CYP1A2 que convierten a AF en una serie de metabolitos conduciendo a la apoptosis celular. En células renales la inducción de los genes de CYP1A1/CYP1B1 demostró ser un marcador de sensibilidad a AF, entre otros. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rol de la activación de Ahr en el efecto antiproliferativo de AF sobre células de cáncer renal humanas. La incubación con AF (100nM-1µM) inhibió el crecimiento celular evaluado por MTS en las líneas celulares de cáncer renal humanas TK10, SN12-c y A498 (47±5, 47±6 y 62±16% del control respectivamente, $p<0,05$) pero no en células ACHN del mismo tipo (96±4%). En células TK10 y SN12-c la preincubación con un inhibidor de Ahr, la α -naftoflavona (ánF, 1µM), revirtió parcialmente el efecto de AF (80±16, 63±6%, $p<0,01$); esto no se observó en células A498 (60±19%). La incubación con AF (1µM) provocó la inducción de la apoptosis evaluada por morfología nuclear en células TK10 y SN12-c pero no en células ACHN. En células TK10 y SN12-c el tratamiento con AF (1µM) indujo la translocación nuclear de Ahr evaluada por Western blot e inmunofluorescencia lo cual no se observó en células ACHN. En células TK10, AF incrementó la actividad transcripcional de Ahr medida como un aumento de la actividad XRE/luciferasa ($p<0,05$) lo cual fue inhibido por la preincubación con ánF. Esta actividad no se modificó en células ACHN. Los resultados sugieren que el efecto de AF es mediado por la activación de Ahr en células de cáncer renal humanas lo cual constituye un blanco terapéutico diferente y por lo tanto una alternativa probable para el tratamiento de estos tumores.

310 (132) PARTICIPACIÓN DE ROS EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR TERAPIA FOTODINÁMICA CON ALA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN. Teijo M.¹; Diez B.²; Batlle A.³; Fukuda H.⁴

Centro de Investigación sobre Porfirias y Porfirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA¹; Centro de Investigación sobre Porfirias y Porfirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA²; Centro de Investigación sobre Porfirias y Porfirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA³; Centro de Investigación sobre Porfirias y Porfirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA⁴
<julieta_teijo@yahoo.com.ar>

La terapia fotodinámica del cáncer (TFD) consiste en la incorporación selectiva de un fotosensibilizante (FS) en las células tumorales y la posterior irradiación lumínica. Las porfirinas son los únicos FS sintetizados endógenamente mediante la incubación con ácido aminolevulínico (ALA). A fin de evidenciar la participación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la inducción temprana de la muerte celular, se determinó el grado de protección (GP) de distintos secuestrantes (GSH, Manitol, Triptofano y Ascorbato) en la TFD de células A549 (GP:relación supervivencia post-TFD en presencia del secuestrante y supervivencia post-TFD en ausencia del secuestrante). Se analizó también el efecto de los secuestrantes con naranja de acridina/bromuro de etidio y Annexina/Ioduro de propidio. Las células se preincubaron 1h con distintas concentraciones de secuestrantes a fin de determinar citotoxicidad y fotoactividad *per se*. Luego, se incubaron 3hs con ALA 1mM, y se irradiaron a distintos tiempos para determinar supervivencia post-TFD y GP. A las 2hs se realizó el ensayo de MTT. Los estudios de apoptosis se realizaron con la concentración de secuestrante no tóxica que presentó mayor GP (GSH: 1mM, GP: 2,1±0,3; Manitol: 10mM, GP: 1,1±0,1; Triptofano: 1mM, GP: 1,7±0,1; Ascorbato: 1mM, GP: 2,6±0,1). A esas concentraciones se observó un aumento en la viabilidad post-TFD con la tinción: El ascorbato mostró el mayor GP (%Apoptosis post-TFD 10 min: 16,3±1,3% vs. 65,8±23,7%; %Apoptosis post-TFD 10 min: 48,3±2,7% vs. 98,4±3,5%; con y sin ascorbato respectivamente) Con el resto de los compuestos se observó efectividad a los 10 min de iluminación pero no a los 7 min. (% Apoptosis post-TFD 10 min con secuestrantes: Triptofano: 74,6±2,6%; Manitol: 64,3±1,6%; GSH: 74,9±3,1%). Estos datos se corroboraron por citometría de flujo. Los resultados revelan la participación de las ROS en la muerte celular post-TFD y proveen una herramienta para minimizar el fotodaño en los tejidos no tumorales.

311 (169) EL HEXACLOROBENCENO INDUCE MIGRACIÓN CELULAR A TRAVÉS DE LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES C-SRC/HER1/ERK1-2 EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HUMANO MDA-MB-231. Pontillo C.¹; García M.²; Peña D.³; Cocca C.⁴; Alvarez L.⁵; Kleiman D.⁶; Randi A.⁷

Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA.^{1 2 3}; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA⁴; Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. UBA.^{5 6 7} <caroponti@hotmail.com>

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado deletéreo para la salud humana. Previamente observamos que el HCB aumenta el número y malignidad de tumores mamarios inducidos por NMU en ratas. En cáncer de mama, la interacción c-Src/HER1 contribuye a la progresión tumoral al inducir procesos como migración e invasión. Nuestro objetivo fue estudiar los efectos del HCB sobre la vía de señalización c-Src/HER1/ERK1-2 y AKT y sobre la migración celular en la línea MDA-MB-231 (-REa, +HER1,+c-Src). Para analizar la vía de señalización, las células fueron crecidas en RPMI 10% SFB, hambreadas por 24 h y tratadas con HCB (0,05 µM) por 5, 15, 30 min, 2 y 24 h (curva de tiempo); y con HCB (0,005, 0,05, 0,5 y 5 µM) por 15 min (curva de dosis), analizándose los lisados celulares por inmunoblot. Para

estudiar migración, las células fueron expuestas por 24 o 48 h al HCB en presencia o ausencia de inhibidores específicos de esta vía y luego se realizaron los ensayos de la herida y del transwell usando un quimioattractante. Los resultados mostraron que el HCB (0,05 μ M), induce fosforilación en Y416-c-Src, Y845-HER1 y ERK1-2 a los 5, 15 y 30 min de tratamiento, sin alterar la T308-AKT; mientras que en curva de dosis, el HCB (0,05, 0,5 y 5 μ M) estimula la fosforilación en Y416-c-Src, Y845-HER1 y ERK1-2, sin cambios en la T308-AKT. El HCB (0,05, 0,5 y 5 μ M) aumenta la migración celular evaluada por su capacidad de cerrar la herida, en [28% ($p < 0,01$); 38% ($p < 0,001$) y 25%, ($p < 0,05$)], respectivamente. La migración evaluada en el ensayo del transwell, sólo aumentó con 5 μ M de HCB (47%, $p < 0,01$) en forma dependiente de c-Src, HER1 y ERK1-2 ($p < 0,001$). En conclusión, el HCB incrementa los niveles de migración a través de la vía de señalización c-Src/HER1/ERK1-2 en la línea celular MDA-MB-231. Estos ensayos podrían explicar en parte, los eventos moleculares involucrados en el efecto co-carcinogénico del tóxico observado previamente en tumores mamarios en rata.

312 (185) METABOLISMO DE GLICEROL EN PRENEOPLASIA HEPÁTICA. ROL DE PPAR ALFA. Alvarez M.¹; Parody J.²; Ceballos M.³; Quiroga A.⁴; Ronco M.⁵; Carnovale C.⁶; Carrillo M.⁷

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET); Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario)^{1 2 3 4 5 6 7} <alvarez@ifise-conicet.gov.ar>

Los cambios en el metabolismo energético son, en parte, regulados por la acción recíproca de insulina y glucagon. Este concepto se ha ampliado con el descubrimiento de receptores hormonales nucleares y su acción como reguladores de la expresión génica. Se ha demostrado que el receptor activado por proliferadores peroxisomales PPAR α gobierna el metabolismo de glicerol (gly). PPAR α está implicado en procesos de diferenciación y proliferación celular en tejidos normales y neoplásicos. La relación entre PPAR α y cáncer no está aclarada; puede presentar propiedades carcinogénicas como también anti-neoplásicas. Objetivo: analizar las vías intracelulares que dirigen el metabolismo de gly en etapas tempranas del desarrollo tumoral y la modulación de las mismas por PPAR α . Utilizamos ratas Wistar macho adultas controles (C) y con preneoplasia hepática (IP). Animales de ambos grupos fueron sometidos a ayuno: CA e IPA. Los estudios de administración oral de gly mostraron aumento significativo de la gluconeogénesis a partir de dicho sustrato en los animales IP. Por RT-PCR semicuantitativa se observó un aumento significativo de los mensajeros de genes blanco de PPAR α , gly 3P deshidrogenasa citosólica (G3PdHc) y mitocondrial (G3PdHm) en los animales ayunados (+35%* G3PdHc; +45%* G3PdHm) y en el grupo IP (+50%*). Este incremento se correspondió con un aumento de la actividad enzimática (+40%*) en dichos grupos. Por otra parte, sólo CA mostró aumentos en la actividad de la gly quinasa (+40*) y los niveles de su mensajero (+20%*). Los grupos IP e IPA mostraron un incremento en los niveles del mensajero de PPAR α (+70%*) como también en los niveles proteicos (* $p < 0,05$). Los resultados obtenidos nos permiten concluir que en etapas tempranas del desarrollo tumoral hepático hay alteraciones en el manejo hepático del gly. Las mismas estarían vinculadas a la sobre-expresión de PPAR α en preneoplasia, convirtiendo a este receptor nuclear en un blanco terapéutico de interés.

313 (208) INTERACCIÓN ENTRE FGFR2, EL RECEPTOR DE PROGESTERONA Y STAT5 EN MODELOS DE CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL. Cerliani J.¹; Guillardoy T.²; Lanari C.³

IBYME^{1 2 3} <cerliani@dna.uba.ar>

Carcinomas mamarios murinos hormono-dependientes (HD) por presión selectiva dan origen a variantes hormono-independien-

tes (HI), sin embargo, ambos tumores expresan altos niveles de receptores de estrógenos y progesterona (RP). Sugerimos que fibroblastos estromales de tumores HI producen mayor cantidad de FGF2 que el estroma del tumor HD, participando en el crecimiento HI y activando RP del parénquima tumoral. Demostramos además, que el FGFR2 interacciona físicamente con el RP en nuestro modelo y en células de mama humanas T47D. El objetivo de este trabajo fue estudiar el mecanismo por el cual el FGF2 estimula el crecimiento HI, evaluando la interacción y activación del RP-FGFR2 y STAT5. Imágenes de confocal demuestran una íntima interacción nuclear entre el RP y STAT5 en las células tratadas con FGF2 50 ng/ml o MPA 10⁻⁸M, ($p < 0,05$), no así cuando se las incubaba con FGF1. Este resultado se confirmó por inmunoprecipitación en muestras de tumores HI y en T47D. En ensayos de transcripción de gen reportero observamos una activación del RP (2,2 vs. control $p < 0,05$) y de STAT5 (2,3 vs. control $p < 0,05$) con FGF2 50 ng/ml en células HI. En células T47D estimuladas con FGF2 la activación del RP fue de 2,6 ($p < 0,05$) y 3.1 ($p < 0,01$) veces el control para el RP y STAT5, respectivamente. Validamos la actividad transcripcional del RP y STAT5 con ensayos de expresión de genes endógenos que poseen en sus promotores secuencias regulatorias para los dos factores. Observamos que el FGF2 y el MPA, inducen la expresión de Bcl-XI ($p < 0,05$), CD1 ($p < 0,05$), Tissue Factor ($p < 0,05$) y el propio STAT5 ($p < 0,05$) en ambas células tumorales. Demostramos por primera vez una interacción entre el RP, FGFR2 y STAT5 en núcleos de células tumorales de mama, lo cual refuerza la hipótesis en la que el FGF2 liberado por el estroma activa al FGFR2 en las células epiteliales e impulsa la activación del RP y STAT5 como un mecanismo HI.

314 (267) LA PROTEÍNA CITOPROTECTORA HEMOXIGENASA-1 REGULA LA EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSA), MARCADOR CLÍNICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA. Elguero M.¹; Gueron G.²; Ferrando M.³; Zalazar F.⁴; Cotignola J.⁵; De Siervi A.⁶; Vazquez E.⁷

Laboratorio de Apoptosis y cáncer, Facultad de Ciencias exactas y naturales, UBA¹; Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA^{2 3 4 5 6 7} <belenelguero@gmail.com>

La inflamación es un agente etiológico del cáncer de próstata. Durante la inflamación aguda y crónica se generan especies reactivas de oxígeno que provocan daño en las estructuras celulares. Hemo-oxigenasa 1 (HO-1) se induce en respuesta al estrés oxidativo y ejerce funciones citoprotectora y antiinflamatoria. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que HO-1 está involucrada en la progresión del cáncer de próstata, sin embargo el mecanismo por el cual modula estos procesos celulares es aun desconocido. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de HO-1 en la regulación de la expresión de PSA, un marcador molecular de diagnóstico y monitoreo del cáncer de próstata. Para ello se co-transfectaron células de cáncer de próstata (LNCaP y PC3) con el plásmido que contiene al promotor de PSA clonado río arriba del gen de la luciferasa y los plásmidos de expresión de HO-1 y AR, y se analizó la actividad de dicho promotor. El tratamiento de las células con andrógenos produjo la esperada estimulación del promotor de PSA, efecto que resultó significativamente disminuido por la expresión ectópica de HO-1 tanto en la línea celular sensible a andrógenos como en la línea insensible. Además, mediante retrotranscripción seguida de PCR en tiempo real (RT-qPCR) observamos que la misma inhibición era ejercida por HO-1 a nivel de ARNm. Estos resultados ponen en evidencia una nueva función de HO-1 en el cáncer de próstata asociada a la regulación de la expresión de PSA. La comprensión de los mecanismos por los cuales HO-1 modula la expresión de genes relevantes en la carcinogénesis prostática podría permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

315 (288) BACILO CALMETTE GUERIN (BCG) INDUCE LA ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS A TRAVÉS DE ERK Y AKT. Lodillinsky C.¹; Langle Y.²; Sandes E.³; Casabé A.⁴; Eiján A.⁵

Instituto de Oncología Angel H Roffo^{1 2 3 4 5}
<catylodi@hotmail.com>

Observamos que la inhibición del crecimiento in vivo del tumor de vejiga murino MB49 por BCG va acompañada del depósito de fibras colágenas y que el efecto es más importante en presencia de L-NAME, inhibidor de la producción de óxido nítrico (NO). El objetivo es estudiar a través de qué mecanismos BCG induce la proliferación de la línea de fibroblastos NIH-3T3. Fibroblastos NIH-3T3 fueron tratados con BCG (1mg/ml), el estado de activación (fosforilación) de ERK y AKT se estudió por WB. La funcionalidad de las vías MAPK y PI3K se evaluó midiendo la actividad metabólica por MTS en células tratadas con BCG en presencia de los inhibidores PD 98059 (ERK) y LY 294002 (AKT). La expresión de colágeno I y de alfa actina de músculo liso (alfa-SMA) se estudió por Inmunofluorescencia y WB utilizando anticuerpos específicos. Estadística ANOVA, Tukey. BCG induce fosforilación de ERK 1/2 a los 5 min con un máximo a los 10 min ($p < 0.001$) descendiendo a partir de los 30 min. AKT también es fosforilada a los 5 min ($p < 0.001$) para disminuir luego de los 10 min postratamiento. Los inhibidores de ERK y AKT bloquean la inducción de la proliferación que provoca BCG ($p < 0.01$). El tratamiento combinado de BCG con L-NAME induce mayor proliferación sobre los fibroblastos que BCG sola ($p < 0.01$) BCG induce en estas células a las 12 h de tratamiento con expresión de alfa-SMA y posterior expresión de colágeno I a las 24h. BCG estimula la proliferación de fibroblastos a través de la activación de las vías de MAPK y PI3K. Inducir a tiempos más largos la diferenciación a miofibroblastos. La activación que ejerce BCG sobre los fibroblastos es mejorada en presencia L-NAME sugiriendo que el NO inhibiría este proceso. Concluimos que el efecto benéfico del tratamiento con BCG en tumores de vejiga estaría dado, además de por la capacidad de inducir la muerte de las células tumorales, por la estimulación los fibroblastos, dando como resultado la regresión del tumor con la aparición de tejido cicatrizal.

REPRODUCCION 4

316 (533) LA TRANSCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA REGULADORA DE LA ESTEROIDOGÉNESIS AGUDA (STAR), LA 20ÁHIDROXIESTEROIDEDEHIDROGENASA (20Á-HSD) Y EL CITOCROMO P450AROMATASA (P450 AROM) MEDIAN EL EFECTO DEL HIPERANDROGENISMO EN EL CUERPO LÚTEO. EFECTO DE METFORMINA. Sander V.¹; Motta A.²

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Universidad de Buenos Aires (UBA)/CONICET^{1 2}
<valeriasander@yahoo.com.ar>

El Síndrome del Ovario Poliquístico está asociado con hiperandrogenismo, oligo/anovulación y disfuncionalidad lútea. La metformina (M) se utiliza como tratamiento pero se desconoce su mecanismo de acción. Previamente demostramos que el hiperandrogenismo (HA: inducido por inyección de dehidroepiandrosterona; D:60mg/kg peso sc) en la fase lútea disminuye progesterona (P) y estradiol (E) en suero y que la M(50mg/kg peso oral) restaura E sin modificar el estrés oxidativo. Dado que el cuerpo lúteo (CL) se regula por factores endócrinos e inmunes, el objetivo fue estudiar el efecto del HA y la M en: 1) la presentación antigénica en el CL mediante las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHCII) y las moléculas B7.1y B7.2 y 2) la transcripción de StAR y las enzimas 3β-HSD, 20á-HSD y P450 arom. Se indujo la formación de CLs en ratas prepúberes Wistar por inyección i.p. de 10 UI de gonadotropina coriónica equina y 10 UI de gonadotropina coriónica humana. A las 48 y 24 h antes del sacrificio (pico P en suero), los animales se tratan

en los grupos: i) HA con D, ii) D+M iii) M y iv) C: vehículo (n=9/ grupo/ensayo). Concentraciones de D y M como en estudios previos. Vimos que MHCII, B7.1 y B7.2 no se modificaron en D, D+M o M respecto de C (ni el ARNm evaluado por RT-PCR ni la expresión en membrana evaluada por citometría de flujo). Sin embargo D disminuyó ARNm de StAR (D:0.76±0.07 vs C:1.21±0.07 unidades ópticas arbitrarias: uoa) y P450 arom (D:0.39±0.09 vs C:0.87±0.01 uoa), aumentó 20α-HSD (D:0.97±0.2 vs C:0.54±0.04 uoa) y no modificó 3β-HSD. D+M pudo restablecer StAR y P450 arom, no así 20α-HSD (D+M:0.89±0.04 vs C:0.54±0.04 uoa). Concluimos que el HA provoca fallas en la fase lútea funcional por mecanismos que involucran regulación transcripcional de StAR, 20á-HSD y P450 arom y no la presentación antigénica ni el estrés oxidativo. La M modula la transcripción de StAR y P450 arom y no la de 20á-HSD, por ello en estudios previos reestablecía los niveles de E y no de P

317 (604) EXPRESIÓN DEL SISTEMA DLL4-NOTCH EN CUERPO LÚTEO DE RATAS PREÑADAS LUEGO DE LA INDUCCIÓN DE LA LUTEÓLISIS POR PGF2-ALFA. Hernández F.¹; Peluffo M.²; Sttoufer R.³; Irusta G.⁴; Tesone M.⁵

*Instituto de Biología y Medicina Experimental; Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University*¹; *Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University*^{2 3}; *Instituto de Biología y Medicina Experimental*^{4 5} <girusta@yahoo.com>

Introducción: El ovario es uno de los pocos sitios donde ocurre el desarrollo y la regresión no patológica de vasos sanguíneos. Las proteínas de la familia de Notch, particularmente el ligando Delta-like 4 (DLL4) y sus receptores Notch1 y 4 han sido descriptos recientemente como factores involucrados en la regulación de la angiogénesis. Objetivo: Evaluar la expresión del ligando DLL4 y de los receptores Notch1 y 4 en el cuerpo lúteo (CL) de ratas preñadas luego de la administración del agente luteolítico fisiológico PGF2α. Metodología: Se utilizaron ratas preñadas inyectadas con PGF2α (400ml/rata) o su solución vehículo (control) en el día 19 de preñez (n=6 en cada grupo), las mismas fueron sacrificadas a las 4 y 24 horas post administración de PGF2α. Los CLs se aislaron por microdissección y se midieron los niveles del ARNm y las proteínas del sistema Notch por PCR en tiempo real y por Western blot respectivamente. Resultados: La expresión del ARNm del ligando DLL4 y los receptores Notch1 y 4 disminuyeron significativamente a las 4 hs luego de la administración de PGF2α (DLL4 control: 1,62± 0,18; DLL4 PGF2α: 0,45 ± 0,11 $p < 0.01$; Notch1 control: 0,64 ± 0,11; Notch1 PGF2α 0,15 ± 0,06 $p < 0.01$; Notch4 control: 0,87± 0,06; Notch4 PGF2α: 0,63 ± 0,07 $p < 0.001$). En forma paralela, los niveles proteicos de los receptores también disminuyeron a las 4hs luego de la administración de PGF2α: Notch4 control: 0,09 ± 0,01; Notch4 PGF2α 0,06 ± 0,005 ($p < 0.05$), mientras que no se detectaron diferencias significativas para el ligando DLL4 entre el grupo control y tratado. A las 24 hs luego de la administración con PGF2α, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ninguno de los mensajeros analizados. Conclusión: Estos resultados sugieren que la expresión de miembros de la familia Notch en el CL de ratas preñadas disminuye durante la luteólisis inducida por PGF2α

318 (172) EFECTO PROTECTOR DE LA PROGESTERONA (P) SOBRE LA REABSORCIÓN EMBRIONARIA (RE) INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO (LPS). PARTICIPACIÓN DEL LIF ENDÓGENO. Aisemberg J.¹; Vercelli C.²; Billi S.³; Cella M.⁴; Wolfson M.⁵; Franchi A.⁶

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO), CONICET-UBA^{1 2 3 4 5 6} <jaisemberg@yahoo.com.ar>

El éxito gestacional requiere el reconocimiento inmunológico de la unidad feto-placentaria semi-alogénica. La P participa en los mecanismos de tolerancia materno-fetal vía el factor inhibidor de leucemia (LIF) entre otros, el cual cumple un rol esencial en el cambio local de la respuesta Th1 a Th2. Por otro lado, varios

estudios sugieren la participación del LIF en la respuesta inflamatoria inducida por endotoxemia. Hemos desarrollado un modelo murino en el cual la administración de LPS en el día 7 de gestación produce 100% de RE a las 24h, sin afectar la supervivencia materna. Nuestro objetivo fue evaluar la participación de la P en el mecanismo de RE y al LIF como posible mediador de los efectos hormonales. Hembras BALB/c de día 7 de preñez se trataron con LPS (11g/g) por 6h. Se determinaron los niveles de P sérica por RIA y se extrajeron los úteros para determinar los niveles de ARNm de LIF *in vivo* por RT-PCR. En cultivo se evaluó la expresión uterina del ARNm de LIF, los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂) por RIA y de óxido nítrico (NO) por Griess en presencia/ausencia de LPS, P, LIF y anticuerpo anti-LIF. La P sérica está disminuida ($p < 0.05$) en las hembras tratadas con LPS y el suplemento con P previene la reabsorción ($p < 0.05$). La expresión del ARNm de LIF en las hembras tratadas es significativamente mayor que en los controles ($p < 0.01$) y la misma regulación positiva se observa al incubar los úteros *in vitro* con P ($p < 0.05$). La presencia de P o LIF en el cultivo disminuyen los niveles de los mediadores pro-inflamatorios inducidos por la endotoxina, NO y PGE₂ ($p < 0.001$, $p < 0.05$). La incubación con el anticuerpo anti-LIF bloquea el efecto anti-inflamatorio de la P, aumentando los niveles de NO, lo que indicaría la participación del LIF endógeno uterino. Nuestros resultados sugieren que parte de la contribución hormonal clave para el éxito gestacional, pueda producirse mediante la regulación de proteínas inmunomoduladoras como el LIF.

319 (699) ALTERACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS TEMPRANA POR EXCESO DE ANDRÓGENOS. ROL DE LOS RECEPTORES NUCLEARES ACTIVADOS POR PEROXISOMAS (PPAR γ). Faut M.¹; Belgorosky D.²; Motta A.³

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, Universidad de Buenos Aires (UBA)-CONICET^{1 2 3}
<monicafaut@gmail.com>

Se desconoce el mecanismo por el cual los folículos de mujeres con Síndrome del Ovario Poliquístico (PCOS) tienen un deficiente desarrollo temprano. Los PPAR γ regulan la producción de progesterona (P) lútea pero se desconoce completamente su rol en la foliculogénesis. El objetivo fue investigar la esteroidogénesis durante la foliculogénesis temprana en condiciones de hiperandrogenismo (HA). Ratas Sprague Dawley (n=4/grupo) se inyectaron con 25 UI ip gonadotropina coriónica equina (eCG) para inducir foliculogénesis, con eCG+dehidroepiandrosterona; 60 mg/kg de peso (HA) o vehículo (C). Los animales se sacrificaron 2, 4, 8, 12 y 24 h post-tratamiento. La P sérica, evaluada por radioinmunoensayo, fue máxima a las 8 h en eCG y disminuyó por HA (eCG=80 \pm 4; HA=63 \pm 6 pg/ml). A las 8h post-tratamiento, eCG aumentó la expresión de PPAR γ (Western Blotting: 0,67 \pm 0,28 ; C=0,43 \pm 0,06 en unidades arbitrarias, ua) y los ARNm de: StAR (proteína estimuladora de la esteroidogénesis aguda, 0,16 \pm 0,07 ua; C=0,04 \pm 0,01 ua) y 3 β HSD (3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, 0,52 \pm 0,03 ua; C=0,39 \pm 0,01 ua). HA disminuyó PPAR γ (0,40 \pm 0,17 ua) y aumentó la expresión de StAR (0,55 \pm 0,01 ua) y 3 β HSD (1,10 \pm 0,04 ua). Concluimos que durante la foliculogénesis aumenta la P, se estimula la transcripción de StAR y 3 β HSD y la expresión de PPAR γ . El HA disminuye P, exagera la transcripción de StAR y 3 β HSD pero disminuye la expresión de PPAR α . Sugerimos que estos receptores nucleares modulan los niveles de P, tal como se observó en la función lútea.

320 (792) ALLOPREGNANOLONA ADMINISTRADA I.C.V. MODIFICA LA LIBERACIÓN DE PROGESTERONA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE 3-BETA- HIDROXIESTEROIDE DESHIDROGENASA OVÁRICA DE MODO DIFERENCIAL DE ACUERDO AL ESTADIO DEL CICLO ESTRAL. Vega Orozco A.¹; Giuliani F.²; Nanfaro F.³; Bazzocchini V.⁴; Laconi M.⁵; Yúñez R.⁶; Cabrera R.⁷

IMBECU-LINCE-CONICET^{1 2}; IMBECU-LINCE-CONICET; Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas,

Universidad Nacional de Cuyo³; IMBECU-LINCE-CONICET; Centro de Investigaciones Superiores, Universidad de Mendoza⁴ ; IMBECU-LINCE-CONICET⁵ ; IMBECU-LINCE-CONICET; Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo; Centro de Investigaciones Superiores, Universidad de Mendoza⁶; IMBECU-LINCE-CONICET; Centro de Investigaciones Superiores, Universidad de Mendoza⁷
<asvega@unsl.edu.ar>

Allopregnanolona (Allo) es un neuroesteroide involucrado en la modulación del eje neuroendocrino reproductivo. Estudios previos demostraron que la adición "in vitro" de Allo en ganglio mesentérico superior, aumenta la liberación de progesterona (P) ovárica y la actividad de la enzima 3- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3- β -HSD) de ratas en proestro (PE) y diestro I (DI). Objetivo: estudiar si la administración "in vivo" de Allo i.c.v modifica la liberación de P y la actividad de 3- β -HSD ovárica. Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Sprague-Dawley en PE y DI. Se las dividió en 3 grupos experimentales: 1) Sham (n=6); 2) Inyectadas con Allo (6 mm) (n=6); 3) Inyectadas con Allo+Bic (n=6). Luego del tratamiento a los animales de cada grupo se les extrajo el sistema ganglio mesentérico superior-plexo nervioso ovárico-ovario (GMS-PNO-O). El sistema fue incubado en buffer-KRBG durante 120 min. El líquido de incubación ovárico se colectó a los 15, 30, 60 y 120 min para la determinación de P por RIA. A los 120 min de incubación los ovarios fueron separados del sistema y se determinó la actividad de 3- β -HSD por espectrofotometría. Los resultados se expresaron como la media + SEM en mU/mg (3- β -HSD), ng/mg de ovario (P) y analizadas estadísticamente por ANOVA 1 y post Hoc test, con respecto al control. En PE Allo aumentó P a los 60 (0,070 \pm 0,002 vs 0,12 \pm 0,01) y 120 min (0,014 \pm 0,003 vs 0,0069 \pm 0,0001) ($p < 0,001$). En DI P aumentó a los 15 (0,04 \pm 0,003 vs 0,14 \pm 0,001), 30 (0,02 \pm 0,002 vs 0,15 \pm 0,02) y 120 min (0,075 \pm 0,003 vs 0,16 \pm 0,01) ($p < 0,001$). La actividad de 3- β -HSD aumentó significativamente en PE (3,2 \pm 0,9 vs 7,1 \pm 1,2) y DI (5,6 \pm 0,9 vs 9,7 \pm 1,5) ($p < 0,05$ respectivamente). No se observaron cambios posterior a la inyección de Allo+Bic. Concluimos que Allo administrada a nivel central modula el eje neuroendocrino a nivel periférico modificando la respuesta ovárica esteroidogénica de manera tiempo dependiente y no ciclo dependiente. En este efecto central no estaría involucrado el sistema GABAérgico.

321 (492) LAS ANGIOPOYETINAS 1 Y 2 (ANGPT1 Y 2) SON CRUCIALES PARA LA FOLICULOGÉNESIS NORMAL EN EL OVARIO DE RATA PREPÚBER ESTIMULADA CON GONADOTROFINAS. Abramovich D.¹; Irusta G.²; Parborell F.³; Tesone M.⁴

lbyrne^{1 2 3 4} <abramovich@dna.uba.ar>

El sistema ANGPT/Tek interviene en la maduración de los vasos sanguíneos siendo la ANGPT1 esencial para su estabilidad. En nuestro laboratorio demostramos que la inhibición de ANGPT1 causa un aumento en el número de folículos atrésicos y una disminución en el número de folículos antrales y preovulatorios en ovarios de ratas tratadas con gonadotropinas. Objetivos: Evaluar el efecto de las ANGPTs sobre la esteroidogénesis, la apoptosis, la proliferación celular y la estabilidad vascular en ovario de rata. Determinar el efecto directo de estos factores sobre las células ováricas. Ratas prepúberes tratadas con eCG fueron inyectadas con un anticuerpo anti ANGPT1 (Ac ANGPT1) en un ovario y el contralateral fue inyectado con suero normal de cabra (control). Los ovarios fueron extraídos a las 48 hs y procesados para inmunohistoquímica de α -actina, PCNA y caspasa-3 y para medición de esteroides. Se realizaron western blots de proteínas extraídas de folículos antrales aislados. Para los experimentos in vitro, se administró a ratas prepúberes dietilestilbestrol (DES) durante 3 días y se aislaron folículos antrales que fueron cultivados por 12 hs en medio libre de suero (basal) o en presencia de ANGPT1 y/o ANGPT2. Se midieron esteroides en medio condicionado y se aisló ADN de los folículos para medir apoptosis por fragmentación de ADN en geles de agarosa. La inhibición de ANGPT1 disminuyó los niveles de PCNA, aumentó los niveles del

fragmento activo de caspasa-3 y disminuyó el área de pericitos. Además, produjo un aumento de androsterona y una disminución de estradiol. *In vitro*, ANGPT1 disminuyó la fragmentación apoptótica de ADN lo cual fue revertido mediante la co-incubación con ambas ANGPTs. También se observó un aumento en los niveles de progesterona y de androsterona con ANGPT2 que fue revertido en presencia de ANGPT1. Conclusión: La alteración en las ANGPTs produce una desregulación en la proliferación y/o apoptosis de células foliculares, afectando la foliologénesis.

TRANSDUCCION DE SEÑALES 4

- 322 (760) LA TIROSINA FOSFATASA SHP2 DE ZONA FASCICULATA DE ADRENAL DE RATA SE ACTIVA POR FOSFORILACIÓN *IN VITRO* CON PKA Y SE IDENTIFICA CON UNA FOSFATASA ACTIVABLE *IN VIVO* POR ACTH.** Gorostizaga A.¹; Brion L.²; Cooke M.³; Mele P.⁴; Podestá E.⁵; Cornejo Maciel F.⁶; Paz C.⁷

IIHNO-Departamento de Bioquímica Humana- Facultad de Medicina-UBA^{1 2 3 4 5 6 7} <agorostizaga@hotmail.com>

En estudios previos describimos que en zona fasciculata (ZF) de adrenal de rata, ACTH promueve la activación de tirosina fosfatasas (PTPs) de 115, 80 y 50 kDa. Dado que las características de la PTP de 80 kDa de ZF (PTP80) son compatibles con las descriptas para SHP2, el objetivo de este trabajo fue analizar si PTP80 es SHP2. Para ello, se obtuvieron las proteínas citosólicas de ZF de ratas controles y tratadas con ACTH (200 μ g/kg peso, 15 minutos) y se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-SHP2. Los inmunoprecipitados (IPs) se analizaron por Western blot con el anticuerpo específico y mediante SDS-PAGE en geles de actividad de PTPs. El ensayo de Western blot reveló una única banda de 80 kDa de igual intensidad en ambas muestras. El análisis en geles de actividad también mostró una única banda de actividad (80 kDa) en ambas muestras, siendo de mayor actividad (3 veces) la fosfatasa proveniente de animales tratados con ACTH. Esto sugiere que SHP2 es activada por ACTH en ZF de adrenal de rata. Dado que nuestros trabajos previos sugerían que la activación de PTPs por ACTH involucra la fosforilación de estas enzimas por PKA, analizamos el efecto de la fosforilación *in vitro* con PKA sobre la actividad de la SHP2 presente en ZF. Se realizó la fosforilación de las proteínas citosólicas con PKA y ATP, en ausencia o presencia de [γ -³²P] ATP. El análisis de los IPs de SHP2 en geles de actividad mostró una banda de actividad correspondiente a una proteína de 80 kDa cuya intensidad es mayor en las muestras fosforiladas con PKA respecto a las fosforiladas en ausencia de esta quinasa. El análisis por SDS-PAGE y autorradiografía de los IPs de SHP2 de muestras fosforiladas en presencia [γ -³²P] ATP reveló que la SHP2 de ZF es sustrato de PKA. En conjunto, los resultados indican que la PTP de 80 kDa de ZF de adrenal de rata que se activa por ACTH es SHP2 y sugieren que su activación *in vivo* por ACTH puede ser el resultado de su fosforilación por PKA.

- 323 (415) LA REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL EN FQ LLEVA A UN AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).** Valdivieso A.¹; Santa Coloma T.²

Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), Buenos Aires, Argentina.^{1 2} <angelvaldi@hotmail.com>

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad autosómica recesiva más común, producida por mutaciones en el canal de Cl⁻ CFTR. En estudios previos demostramos la regulación negativa del ARN mensajero del gen mitocondrial *MTND4* en FQ. Este gen codifica la subunidad *MTND4* del Complejo I mitocondrial (C1m), un componente fundamental para su actividad. Mediante la medición de la actividad del C1m por la técnica de

Blue Native-PAGE confirmamos que la misma se encontraba significativamente reducida en mitocondrias aisladas a partir de distintos modelos celulares para FQ. Debido a que las fallas en la actividad del C1m pueden conducir a una alteración en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular, decidimos probar si esto también ocurría en FQ. Con este fin utilizamos como modelo células Caco-2, provenientes de carcinoma de colon, tratadas con inhibidores farmacológicos de la actividad del CFTR (glibenclamida y CFTR(inh)-172) para imitar la condición FQ. La medición de ROS intracelular fue medida por espectrofluorometría utilizando la sonda fluorescente DA-DCFH. La medición de ROS fue realizada a distintos tiempos de inhibición del CFTR para determinar, en caso de que existiese alguna alteración, si esta ocurría antes o después de la disminución de la actividad del C1m. En resultados preliminares observamos un aumento significativo en la producción de ROS a las 48 hs, tiempo en el que ocurre una disminución en la actividad del C1m. Estos resultados sugieren que el aumento en la producción de ROS podría deberse a la disminución en la actividad del C1m en FQ, provocada por la reducción de la expresión del gen *MTND4*. La inducción del aumento en ROS en FQ podría explicar, al menos en parte, algunos de los síntomas característicos de esta enfermedad. Agradecimientos: subsidios ANPCyT (PICT 2007-00628), CONICET (PIP 11220080102551), UCA y beca posdoctoral del CONICET (AGB).

- 324 (316) RSUME REGULA LA RESPUESTA A HIPOXIA MEDIADA POR HIF-1.** Gerez J.¹; Fuertes M.²; Druker J.³; Haedo M.⁴; Paez-pereda M.⁵; Holsboer F.⁶; Silberstein S.⁷; Arzt E.⁸

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEyN, U.B.A., IFIBYNE-CONICET, Argentina.^{1 2 3 4}; Affectis Pharmaceuticals, Martinsried, Alemania⁵; Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania⁶; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEyN, U.B.A., IFIBYNE-CONICET, Argentina.^{7 8} <juangerez@fbmc.fcen.uba.ar>

RSUME, una proteína cuyo gen fue clonado en nuestro laboratorio, estimula la SUMOilación. La expresión de HIF-1 α , 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-1 α se estabiliza y HIF-1 aumenta su actividad transcripcional. En este trabajo estudiamos la función de RSUME sobre HIF-1 α 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-1 α . Empleando genes reporteros con la zona promotora del gen de RSUME confirmamos que esta regulación es a nivel transcripcional (p<0.05). La delección de los sitios HRE en estas construcciones suprimen tanto los efectos de hipoxia como de la sobreexpresión de HIF-1 α , indicando que estos efectos estan mediados por HIF-1. A su vez, RSUME aumenta la estabilidad de HIF-1 α en hipoxia y en normoxia, sin modificar sus niveles de ARNm. En ensayos de Western Blot demostramos que RSUME aumenta la estabilidad de HIF-1 α a pesar de la sobreexpresión de VHL. Estos resultados fueron reconfirmados empleando una construcción reportera que posee el dominio sensible a Oxígeno de HIF-1 α fusionado a Luciferasa. RSUME aumenta la actividad transcripcional de HIF-1 un 200% (p<0.05). Al emplear siRNAs específicos para RSUME tanto el aumento de HIF-1 α inducido por hipoxia como la actividad transcripcional de HIF-1 disminuyen 53% y 59% respectivamente. Mediante ensayos de inmunoprecipitación demostramos que RSUME interacciona físicamente con HIF-1 α y aumenta su SUMOilación. Concluimos que RSUME es inducido en hipoxia para aumentar la estabilidad de HIF-1 α , cumpliendo un rol muy importante en la respuesta adaptativa a hipoxia.

325 (749) INCREMENTO DE LA EXPRESIÓN DE LA MAP QUINASA FOSFATASA-2 (MKP-2) POR HCG/AMPC EN CÉLULAS DE LEYDIG DE LA LÍNEA MA-10: EFECTO SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS. N V Gómez 1, L Brion 1, M M Mori Sequeiros García 1, A Acquier 1, C F Méndez 1, C Paz 1

11IMHNO, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA <nataliavgr@hotmail.com>

Las MAP quinazas fosfatasa (MKPs) son enzimas que in vivo desfosforilan específicamente a las MAP quinazas (MAPKs). MKP-2 es una isoforma que desfosforila a ERK1/2 y que se induce generalmente por los mismos estímulos que activan a las MAPKs. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la estimulación hormonal (LH/hCG) sobre la expresión de MKP-2 en células de Leydig de la línea MA-10, dado que en este sistema hCG y AMPc promueven la activación de MAPKs como ERK1/2. Mediante RT-PCR determinamos que hCG y AMPc producen un incremento transitorio del ARNm de MKP-2 que alcanza un máximo (2,5 veces respecto del control) a las 3 hs. de estimulación. El análisis por Western blot e inmunocitoquímica también revela la inducción de MKP-2 por AMPc. En células transfectadas con un vector que permite la expresión de la proteína recombinante Flag-MKP-2 bajo un promotor constitutivo, MKP-2 se acumula en respuesta a la estimulación con hCG o AMPc. Basados en el hecho que MKP-2 inactiva a las MAPKs, propusimos que su expresión en células de Leydig podría afectar la transcripción de genes que se activan por acción hormonal vía ERK1/2, como CYP11A1 (que codifica para la enzima P450scc). Demostramos, mediante la co-transfección de un plásmido conteniendo el ADNc de MKP-2 bajo el control de un promotor constitutivo (pRc/CMV-MKP-2) y de un vector conteniendo un gen reportero (luciferasa) bajo el control del promotor de CYP11A1, que AMPc aumenta la actividad del promotor (expresada como actividad relativa de luciferasa): pRc/CMVi =5,04±0,14; pRc/CMVi +AMPc=12,26±0,97 (P<0,001) y que la sobreexpresión de MKP-2 disminuye este efecto: pRc/CMVi-MKP-2+AMPc=6,43±0,13 (P < 0,001). Colectivamente, estos resultados demuestran que la expresión de MKP-2 en células de Leydig MA-10 es regulada por acción hormonal a través de mecanismos transcripcionales y post-traduccionales y que la actividad de MKP-2 puede modular la expresión de proteínas necesarias para la síntesis de esteroides.

326. (68) IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS FUNCIONAL DE LOS COMPONENTES MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR CRH EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. Bonfiglio J.¹; Senin S.²; Maccarrone G.³; Rewerts C.⁴; Refojo D.⁵; Turck C.⁶; Holsboer F.⁷; Arzt E.⁸; Silberstein S.⁹

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires e IFIBYNE-CONICET^{1 2}; Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich^{3 4 5 6 7}; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento Fisiología y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad de Buenos Aires e IFIBYNE-CONICET^{8 9} <jjbonfiglio@fbmc.fcen.uba.ar>

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) juega un rol clave en la respuesta del organismo frente al estrés. La desregulación de la función del receptor de CRH de tipo 1 (CRHR1) en estructuras límbicas se asocia a patologías como depresión/ansiedad. Decidimos caracterizar las vías de señalización de CRH en líneas celulares hipocámpales, y desarrollar estudios orientados a la identificación de blancos fisiológicos de su acción que podrían ser explotados en el desarrollo de tratamientos farmacológicos para disfunciones de CRH/CRHR1 en el sistema nervioso central (SNC). Para estos estudios, generamos líneas celulares hipocámpales (HT22) que expresan CRHR1. En estos clones, CRH activa pERK1/2 mediante Rap1 y PKA (dosis CRH:

50-500 nM; tiempo: 1-60 min). Iniciamos la caracterización del interactoma de B-Raf, la MAPKKK de la cascada B-Raf-MEK1/2-ERK1/2. Coimmunoprecipitados obtenidos con anticuerpos anti-B-Raf se resolvieron por SDS/PAGE. El gel se fraccionó en bandas y las proteínas se analizaron por espectrometría de masa. Obtuvimos un amplio panorama del interactoma de la quinasa en estado basal. Entre las proteínas identificadas al momento se incluyen numerosos componentes del citoesqueleto, cuya función en señalización ha sido recientemente reconocida. Algunas de las interacciones detectadas se confirmaron mediante ensayos de coimmunoprecipitación y Western Blot. Examinamos el efecto de un dominante negativo de 14-3-3s, proteínas adaptadoras muy abundantes en SNC cuya interacción con B-Raf hemos demostrado en este sistema. Nuestros Resultados demuestran que las 14-3-3s son necesarias para la activación de ERK1/2 mediada por CRH en los clones de HT22. Detectamos una activación de tipo bifásica con CRH 100 nM (temprana: 3-5 min, tardía: >20 min) predominantemente extranuclear de esta MAPK. El conjunto de estos estudios aportan a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la activación de ERK1/2 mediada por CRH en células hipocámpales.

327 (357) PARTICIPACIÓN DE LA TIROSINA FOSFATASA SHP2 EN LA INDUCCIÓN DE ACSL4 Y ACTIVACIÓN DEL TRANSPORTE DE COLESTEROL ESTIMULADOS POR AMPC EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10. Cooke M.¹; Di Cónsoli H.²; Scazzina B.³; Maloberti P.⁴; Podestá E.⁵; Cornejo Maciel F.⁶

11IMHNO- Dept. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5 6} <mcooke@fmed.uba.ar>

Previamente demostramos que la activación de tirosina fosfatasa (TPs) es necesaria para la regulación de la esteroidogénesis estimulada por ACTH y LH/CG en células adrenocorticales y de Leydig testiculares. La defosforilación de proteínas en residuos de tirosina se requiere luego de la producción de AMPc para la inducción de una proteína clave de la cascada de transducción de la señal hormonal: la acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4). Esta enzima junto con una acil-CoA tioesterasa mitocondrial determinan la producción compartimentalizada del ácido araquidónico necesario para la inducción de otra proteína regulatoria denominada StAR (steroidogenic acute regulatory protein) de localización mitocondrial y transportadora de colesterol. El objetivo del presente trabajo fue identificar la TP involucrada en este mecanismo. Para ello se realizó la sobreexpresión de la TP SHP2 o PTP1D en células de Leydig de la línea MA-10, utilizada ampliamente como modelo esteroidogénico. Resultados previos obtenidos por medición de actividad en geles sugerían que la enzima SHP2 podría ser una de las TPs involucrada en este mecanismo. La sobreexpresión de SHP2 produjo un incremento significativo en la producción de progesterona (P4) estimulada por concentraciones submáximas (0,5 mM) de 8Br-AMPc (concentración P4 en el medio de cultivo, en ng/ml: pRc/CMV = 53 ± 3 vs. SHP2-pRc/CMV 78 ± 16; p < 0,01). Este efecto no se produce cuando en las células se sobreexpresa una forma catalíticamente inactiva de la enzima. La sobreexpresión de SHP2 también incrementó los niveles de ACSL4 analizadas por Western Blot. Estos resultados nos permiten sugerir que la SHP2 es al menos una de las TPs involucradas en la regulación por acción hormonal de los niveles de ACSL4 y de la esteroidogénesis y confirma la necesidad de defosforilación de sustratos en tirosina mediada por PKA como paso obligatorio en la regulación del transporte de colesterol.

CARDIOVASCULAR 2

328 (826) IMPORTANCIA DE LOS BIOMARCADORES ASOCIADOS A ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SÍNDROME METABÓLICO. Taran M.¹; Baez M.²; Llorenz M.³; Binci M.⁴; Campana V.⁵; Moya M.⁶

Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. UNCórdoba¹; Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. UNCórdoba; IICSHUM-UNLAR²; Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. UNCórdoba³; Laboratorio LABAC, Córdoba⁴; Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas. UNCórdoba⁵ <maritaran@hotmail.com>

El Síndrome Metabólico (SM) asociado a factores de riesgos cardiovasculares y a estados proinflamatorios vasculares, generan una situación de impacto cardiovascular. Además, genera un incremento del riesgo cardiovascular para patologías de sustrato isquémico como aterosclerosis. Se estudio en modelo experimental de SM la relación entre hiperfibrinogenemia (HF), óxido nítrico (NO) y superóxido dismutasa (SOD) para establecer la importancia de estos biomarcadores de incrementar riesgo aterogénico. SM se indujo por administración de fructuosa al 10% en agua de bebida por 6 semanas. Se usaron ratas Wistar: control (I), HF por 30 días (II) y SM experimental (III). Se determinó: glucemia(mg/dl) y triglicéridos(mg/dl) por método enzimático, insulinemia(μU/ml) por RIA, HF (mg/dL), NO (μM) y SOD (U/mL) por espectrofo-tometría. Estadística: ANOVA (p<0.05). Insulinemia en (III) (29,5±4,52) fue estadísticamente significativa respecto a (II) (7,52±1,72) y (I) (4±0,82) (p<0.001), asociado a una disminución significativa de NO entre los mismos grupos, (III) (8,7±1,2) vs (II)(13,73±1,7) y (I) (22,8±1,4) (p<0.001). Grupo (III) (292±11,7) mostró HF significativa respecto a (II) (266±13) y a (I) (202±9,5) (p<0.001), SOD (U/ml) aumentó al comparar (I) (138,05±3,68) vs (III) (180,15±6,23) (p<0.0001). En este modelo de insulinorresistencia; la inflamación vascular y el estrés oxidativo son componentes de mecanismos fisiopatológicos involucrados en alteraciones vasculares asociadas al SM. La hiperinsulinemia, hiperglucemia y dislipemia son inhibidores de la acción de la óxido nítrico sintasa (ONS), disminuyendo la biodisponibilidad de NO. El incremento de las especies reactivas de oxígeno provocó un aumento de la actividad de la enzima SOD con su consiguiente elevación en el plasma.

329 (822) PARTICIPACIÓN DE LAS INCRETINAS EN EL REMODELADO VASCULAR ASOCIADO AL SÍNDROME METABÓLICO. Renna N.¹; Lembo C.²; Gil A.³; Lama C.⁴; Gonzalez S.⁵; Miatello R.⁶

IMBECU-CONICET. Area de Fisiología Patológica. FCM.UNCuyo¹; IMBECU-CONICET^{2 3 4}; IMBECU-CONICET. Area de Fisiología Patológica. FCM.UNCuyo⁵ <nicolasfederico@hotmail.com>

El objetivo fue examinar la participación de las incretinas 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. FFHR: SHR+fructosa 10%v/v durante 12 sem; 3. W+V: vidagliptina 5 mg/kg vía oral últimas 4 sem; IV. FFHR+V: ídem 2+3. Los datos (media±sem) se procesaron por ANOVA y post-test de Bonferroni. (*) indica p<0,001. En comparación con sus controles, los animales FFHR desarrollaron SM: presión sistólica (PAS-mmHg): 118±0,05 v 180±1*; índice HOMA (μU/mL/mmol/L) 4,02±0,1 v 16±0,35*; Triglicéridos (TG-mg/dL) 90±2 v 270±30*; HDL-col (HL-mg/dL) 18±2 v 10±3* < NADPH oxidasa arterial (cpm/mg). Estos cambios revirtieron por la administración de V (PAS 165±0,9*; HOMA 4,08±0,5*; TG 135±3,9*; HL 17±2*). Remodelado vascular fue evaluado a partir de la relación L/M 12,02±2,5 v 8,5±3,5*. El grupo FFHR+V aumento su relación L/M a 13,6±0,01*. Se evaluó el remodelado cardíaco por peso relativo (RHW- g/100 g) 2,5±0,01 v 4,1±0,02*). El grupo FFHR+V disminuyó su RHW a 3,6±0,01(ns). En síntesis, los datos confirman el desarrollo del modelo experimental patológico y sugieren que el estrés oxidativo, por distintas vías probables de producción, y el sistema de las incretinas intervienen activamente en el daño de órgano blanco a nivel vascular en esta patología.

330 (640) EFECTO IN VITRO DE FLAVONOIDES SOBRE LA FUNCIÓN Y PRODUCCIÓN DE NO MITOCONDRIAL DE CORAZÓN DE RATA. Iglesias D.¹; Bombicino S.²; Zaoborny T.³; Boveris A.⁴; Valdez L.⁵

Laboratorio de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Cátedra de Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5} <diario_igl@yahoo.com.ar>

Los flavonoides son compuestos que se encuentran en plantas, principalmente en frutas y semillas. Se ha mostrado que ejercen un efecto antioxidante debido a su propiedad de atrapar anión superóxido, radical hidroxilo, óxido nítrico (NO) y peroxinitrito. Dado que las mitocondrias son la fuente principal de dichas especies, se comenzó a estudiar el efecto *in vitro* de concentraciones de flavonoides 1-100 nM (miricetina y catequina) sobre la función mitocondrial de corazón de rata, haciendo hincapié en la producción de NO por la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS). Los efectos descriptos, hasta la fecha, son consecuencia del uso de concentraciones iM de flavonoides, las que no se alcanzarían *in vivo*. Las ratas fueron sacrificadas, se les extrajo el corazón y se aislaron mitocondrias. Se midió consumo de O₂ mediante un electrodo tipo Clark, utilizando malato-glutamato y succinato como sustratos en ausencia o presencia de ADP. La producción de NO se midió en membranas mitocondriales, obtenidas por 3 ciclos de congelamiento-descongelamiento, siguiendo espectrofotométricamente la oxidación de la oxihemoglobina. Resultados preliminares muestran que la miricetina (20 nM) no modifica la respiración en estado 4 medida con malato-glutamato como sustratos (26±0,6 ng-atO/min.mg prot), mientras que disminuye (35%) la respiración mitocondrial en estado 3, en comparación con el control sin flavonoides (80±2,6 ng-atO/min.mg prot), llevando a una disminución del control respiratorio (3,0 a 2,0). La actividad de mtNOS (1,2±0,1 nmol/min.mg prot) se redujo 40% como consecuencia de la incubación *in vitro* de las membranas mitocondriales con miricetina y catequina. Estos resultados sugieren que concentraciones nM de miricetina y catequina inducen un desacople parcial de la fosforilación oxidativa en mitocondrias cardíacas. Asimismo, la reducción de la actividad de mtNOS observada *in vitro* es compatible con una interacción química directa entre dichos flavonoides y la mtNOS.

331 (614) PREVENCIÓN DEL INCREMENTO EN LA PRESIÓN ARTERIAL (PA) EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN (HT) EN RATAS POR ADMINISTRACIÓN DIETARIA DE (-)-EPICATEQUINA (EC). Galleano M.¹; Litterio M.²; Sagdicoglu Celep G.³; Jaggars G.⁴; Omata Y.⁵; Fraga C.⁶

Físicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET.^{1 2}; Food and Nutrition Technology, Gazi University, Ankara, Turquía.³; Department of Nutrition, University of California, Davis, USA^{4 5}; Físicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET.⁶ <mgallean@ffyba.uba.ar>

HT es un factor de riesgo cardiovascular de alta prevalencia. Se han propuesto estrategias, como modificaciones en la dieta, para reducir la PA en pacientes hipertensos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la administración dietaria de EC para prevenir el incremento de PA en un modelo de HT inducida por L-NAME en ratas. L-NAME (inhibidor de la Oxido Nítrico Sintasa - NOSintasa) fue administrado en agua de bebida (360 mg/l) y EC fue co-administrada adicionada a la dieta sólida (1 mg/g dieta-EC1 o 4 mg/g dieta- EC4). Ratas macho Sprague-Dawley (150 g) se dividieron en cuatro grupos: Control (C); L-NAME (L); L-NAME + EC1 (LEC1); y L-NAME + EC4 (LEC4) y se mantuvieron bajo tratamiento durante cuatro días. PA fue medida diariamente mediante un pletismógrafo. Los animales fueron sacrificados al

quinto día, se obtuvieron muestras de sangre y se aisló plasma para determinar los niveles de TBARS (método espectrofluorométrico) y nitratos y nitritos (NOx) (determinados por la reacción de Griess, previa reducción enzimática) como indicadores de estrés oxidativo (EO) y producción de NO, respectivamente. Al día 4 de tratamiento, los valores de PA (en mm Hg) fueron: C= 102±3; L=143±6^a; LEC1=128±6^b y LEC4=110±8^b (^ap<0,05 respecto de C; ^bp<0,05 respecto de L). Los niveles de TBARS en plasma fueron: 0,24±0,01; 0,28±0,02^a; 0,21±0,03^b y 0,15±0,01^b uM para los grupos C, L, LEC1 y LEC4 respectivamente. (^ap<0,05 respecto de C; ^bp<0,05 respecto de L). El contenido de NOx en plasma fue de: 21±4; 11±1^a; 21±2^b y 20±2^b uM para los grupos C, L, LEC1 y LEC4 respectivamente. (^ap<0,05 respecto de C; ^bp<0,05 respecto de L). La prevención en el incremento de PA producida por EC se asoció a la disminución del indicador de EO y al incremento en la producción de NO, sugiriendo que un aumento en la biodisponibilidad de NO como consecuencia de la disminución del EO es un mecanismo posible de acción de la EC sobre la HT. Financiado por UBACyT (801 y 802) y ANPCyT 00994.

332 (234) PROSTANOIDES VASCULARES EN LA ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL EN RATAS CON SOBRECARGA ORAL DE FRUCTOSA. Puyó A.¹; Galleano M.²; Carranza A.³; Azich A.⁴; Mayer M.⁵; Peredo H.⁶

Cátedra de Anatomía e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA²; INFIBIOC³; Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA⁴; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. INFIBIOC⁵; Cátedra de Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, INFIBIOC, CONICET⁶ <anapuyo@gmail.com>

El objetivo de este trabajo fue estudiar la producción vascular de prostanoïdes (PR), durante la endotoxemia por administración de lipopolisacárido (LPS) en animales control (C) y con sobrecarga oral de fructosa (F) considerado un modelo de síndrome metabólico. Se usaron ratas Sprague-Dawley macho: Grupos C (agua para beber, n=16) y F (solución de F 10% P/V, n=16) tratadas por 14 semanas. Seis horas antes del sacrificio, 8 animales de cada grupo recibieron LPS (4 mg/kg, ip; grupos C-LPS y F-LPS) y el resto solución fisiológica (C y F). Se midió la producción vascular de PR en la aorta y el lecho mesentérico (LM) por HPLC. El LPS incrementó la liberación de todos los PR medidos en aorta (C-LPS vs. C, ng PR/mg tejido: prostaglandina (PG) 6-ceto F₂alfa, metabolito estable de la prostaciclina 375±38 vs. 178±21; PG E₂ 142±16 vs. 70±12; PG F₂alfa 164±19 vs. 66±12 y tromboxano (TX) B₂, metabolito estable del TXA₂, 197±22 vs. 82±10, p<0.05); y en LM (C-LPS vs. C: PG 6-ceto F₂alfa 235±21 vs. 95±9; PG E₂ 248±27 vs. 87±6; PG F₂alfa 159±17 vs. 82±7 y TXB₂ 122±11 vs. 60±6, p<0.05) en los animales control, mientras que no hubo diferencias en los tratados con F. Los resultados muestran que el incremento de la producción vascular de PR provocado por la endotoxemia en ratas C no se manifiesta en los animales con sobrecarga oral de F, lo cual podría atribuirse en parte a la disfunción endotelial presente en este modelo.

333 (73) ÓXIDO NÍTRICO CARDIOVASCULAR: EFECTO DE LA RESTRICCIÓN DE AGUA CON EL AVANCE DE LA EDAD. Arza P.¹; Netti V.²; Fellet A.³; Balaszczuk A.⁴

Cátedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.^{1 2 3 4} <arzapatricia@yahoo.com.ar>

Objetivo: Estudiar el efecto de la restricción de agua sobre el óxido nítrico (NO) cardiovascular en ratas de 2 (2M) y 12 (12M) meses. Métodos: Grupos de animales (ratas SD): restricción de agua durante 24 horas (R24) y 72 horas (R72). Al inicio y fin de cada período se determinaron los parámetros expuestos en la tabla. Finalmente, los animales se sacrificaron para evaluar actividad (NADPH-diaforasa) y expresión de las 3 isoformas de la NO sintasa (NOS) (Western Blot) en aorta (Ao), aurícula (A) y ventrículo (V). Resultados:

Grupo	Basal	R24		R72		
Edad (meses)	2M	12M	2M	12M	2M	12M
PAS (mmHg)	110±3	114±3	113±1	104±2*	132±3*	100±3*
FC (lpm)	371±7	382±5	402±5*	424±6*	480±4*	532±6*
Na ⁺ plasm(mmol/l)	136±1	137±2	137±1	140±4	144±1*	148±1*
OsM						
Plasm (mOsm)	293±3	294±1	294±2	292±1	323±1*	320±1*
Peso (g)	281±2	550±4	270±4*	514±4*	216±4*	440±3*
Hematocrito(%)	43±1	44±1	47±1*	50±1*	47±1*	49±1*
NO _x urinarios (nmol/min.100g)	2.33±0.61	2.9±1.01	1.23±0.10*	8.50±1.91*	0.44±0.29*	14.19±1.02*

Valores expresados como media±ESM.* p<0.001 vs basal.

Actividad NOS: en A, V y Ao fue mayor en ratas controles 12M respecto de 2M. En 12M, R24 y R72 aumentó la actividad tanto en A y V; disminuyó en Ao. En 2M, la actividad aumentó en A y Ao; no se observaron cambios en V. Western Blot: los homogenatos tuvieron reactividad positiva para eNOS y nNOS; no así para la iNOS. La expresión basal en A y V de eNOS en ambos grupos etarios fue similar; los niveles proteicos de nNOS fueron mayores en 12M. En Ao, la expresión de eNOS fue mayor en 12M que en 2M. La restricción de agua no indujo cambios en la expresión de eNOS y nNOS en A y V en ambos grupos etarios; en Ao la restricción de agua no modificó los niveles de eNOS. Conclusión: La restricción de agua induciría cambios en la actividad de la NOS cardiovascular en animales 2M y 12M, siendo la respuesta adaptativa al estrés osmótico diferente en el grupo adulto. Los ajustes en el sistema del NO durante restricción de agua compensarían las alteraciones hemodinámicas y además serían dependientes de la edad.

334 (426) VALORACIÓN DE ACTIVIDAD DE SUPEROXIDO DISMUTASA Y CAMBIOS MORFOFUNCIONALES MITOCONDRIALES EN RATAS CON ATROSCLEROSIS SUBCLÍNICA TRATADAS CON VITAMINA E Y C ASOCIADAS. Llorens C.¹; Baez M.²; Tarán M.³; Campana V.⁴; Pons P.⁵; Palma J.⁶; Moya M.⁷

Cátedra de Física Biomédica Facultad de Ciencias Médicas UNC¹; Cátedra de Física Biomédica Facultad de Ciencias Médicas UNC; IICSHUM²; Cátedra de Física Biomédica Facultad de Ciencias Médicas UNC³; Cátedra de Física Biomédica Facultad de Ciencias Médicas UNC; UNLAR⁴; Cátedra de Física Biomédica Facultad de Ciencias Médicas UNC; Centro de Microscopía Electrónica⁵; Cátedra de Física Biomédica Facultad de Ciencias Médicas UNC⁶; Cátedra de Física Biomédica Facultad de Ciencias Médicas UNC; UNLAR⁷ <cande_llorens@hotmail.com>

Se estudiaron los efectos antioxidantes de vitamina E + C en modelo aterogénico inducido por hiperfibrinogenemia (HF). Se analizó: HF y la actividad de superóxido dismutasa (SOD) asociado a cambios morfofuncionales mitocondriales en músculo liso de aorta con aterogénesis. Se usaron ratas Wistar machos: control (I), HF x 90 ds. (II) e HF x 90 ds. + vitamina E y C (III). HF se indujo por inyección subcutánea de adrenalina por 90 ds. Vit. E se administró: 2mg/día/rata + vit. C: 2.14mg/día/rata durante 75 días(oral). Se dosó en plasma fibrinógeno (HF) (mg/dL), actividad SOD (U/ml) (lisado de glóbulos rojos) y los complejos mitocondriales por espectrofotometría. Morfología mitocondrial se estudio por microscopía electrónica. Los resultados se analizaron: MANOVA y Test de Fisher, nivel de significación p<0.05.

	Control (I)	HF x 90 ds (II)	HF x 90 ds+ vit. E y C (III)
Fibrinógeno (mg/dL)	209 ± 9	407 ± 8.9	214 ± 5
SOD (U/ml)	138.5 ± 6.68	245 ±10.4	365.6 ± 14.5
Complejo I (µmolesNADH.min.mgprot)	0.0646 ± 0.01	0.0188 ± 0.008	0.1158 ± 0.004
Complejo II (µmoles succinato.min.mgprot)	5.34x10 ⁻¹¹ ± 3.73x10 ⁻¹¹	8.01x10 ⁻¹⁶ ± 5.77x10 ⁻¹⁶	5.47x10 ⁻¹¹ ± 2.33x10 ⁻¹²
Complejo III (µmoles ubiquinona.min.mgprot)	0.2375 ± 0.02	0.171 ± 0.06	0.2761 ± 0.001
Complejo IV (µmoles ferrocitocromo c.min.mgprot)	0.1680 ± 0.02	0.0124 ± 0.003	0.2623 ± 0.058

Media±ES: HF: (I) vs (II): p<0.001; (II) vs (III): p<0.001; (I) vs (III): NS. SOD: (I) vs (II) vs (III): p<0.001; CI: (I) vs (II) vs (III): p<0.001; (II) vs (III): p<0.001. CII: (I) vs (II): p<0.001; (II) vs (III): p<0.001; (I) vs (III): NS. CIII: (I) vs (II): p<0.001; (II) vs (III): p<0.01; (I) vs (III): NS. CIV: (I) vs (II): p<0.001; (II) vs (III): p<0.01. (I) vs (III): p<0.001 Las vitaminas combinadas restablecen e incluso potencian la actividad SOD, estabilizando los mecanismos prooxidativos, generando regresión de lesiones mitocondriales y mejorando la fosforilación oxidativa, efectos que neutralizarían la lesión isquémica presente en aterogénesis

335 (758) ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES (EPCS) EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO.

Lembo C.¹; Renna N.²; Gonzalez S.³; Lama M.⁴; Miatello R.⁵

Universidad Nacional de Cuyo¹; Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular IMBECU-CONICET²; Depto. Patología. Fac. Cs. Médicas - U. N. Cuyo^{3 4 5} <carinalemb@yaho.com.ar>

Introducción: Aunque la evidencia demuestra que las EPCs contribuirían en la revascularización tisular, la importancia de su utilización a nivel clínico permanece desconocida. Objetivo: Examinar la participación de (EPCs) en la fisiopatología del remo-delado vascular en un modelo de síndrome metabólico (SM). Diseño del estudio: I.WKY•II. FFR: WKY recibiendo fructosa en agua de bebida al 10% (v/v) durante 12 semanas•III. SHR•IV. FFHR: SHR con fructosa en agua de bebida al 10% (v/v) durante 12 semanas, se realizó: Determinación de Presión arterial sistólica (método pletismográfico), índice HOMA, Coloración de PAS en tejido vascular mesentérico. Cuantificación de EPC por citometría de flujo, en sangre periférica, con los anticuerpos antiCD34 y antiVEGF-R2. Actividad de NAPH oxidasa en tejido aortico. Análisis estadístico: ANOVA y post-test de Bonferroni. (*p<0.001 v WKY y #p<0.001 v FFHR) y también por ANOVA de una vía, no paramétrico Test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunns, según corresponda. Resultados

Variables	WKY	FFR	SHR	FFHR
PAS (mmHg)	118±0,05	132 ± 1*	164±3*	171 ± 1,7*#
Índice HOMA (µU/mL/mmol/L)	4,32 ± 0,1	11,93± 0,1*	7,20± 0,1*	14,1 ± 0,45 *#
Células PAS positivas (nº cél x vaso)	5,4±1,6	7,6±2	19±3*	26±2,7*
Células CD34+/VEGF-2+ medidas por citometría de flujo(%)	0,33±0,007	0,19±0,007*	0,20±0,001	0,06±0,01*#
Células CD34+ medidas por citometría de flujo (%)	0,61±0,06	0,34±0,02*	0,40±0,02*	0,06±0,01*#
Células VEGFR-2+ medidas por citometría de flujo (%)	0,73±0,06	0,18±0,03*	0,05±0,06*	0,29±0,06*#
Actividad de NAPH oxidasa (Unidades Relativas de Luminiscencia)	38,33±0,16*	50,14±12,5*	66,26±20,2*	160,6±7,8*#

Conclusiones: Los datos confirman el desarrollo del modelo experimental y contribuyen a sustentar la hipótesis que sugiere que la reparación vascular por EPCs se encuentra alterada o disminuida en el remodelado arterial mesentérico asociado a este modelo de síndrome metabólico, probablemente por maduración diferencial hacia otras líneas celulares.

336 (805) EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DE BETABLOQUEANTES ADMINISTRADOS AL INICIO DE LA REPERFUSIÓN EN CORAZONES AISLADOS DE RATAS.

Diez E.¹; Ponce Zumino A.²; Miatello R.³

Área Fisiología Normal - FCM - UNCuyo; Laboratorio de Fisiología Cardíaca - IMBECU - CONICET^{1 2}; Área Fisiopatología - FCM - UNCuyo; Laboratorio de Fisiología Cardíaca - IMBECU - CONICET³ <emiradiez@gmail.com>

El tratamiento con betabloqueantes (BB) ha sido asociado a disminución de riesgo para la ocurrencia de arritmias de reperusión (AR). Si bien se sabe que los BB afectan corrientes iónicas in vitro, se desconoce cómo actúan durante la reperusión. El objetivo fue evaluar los efectos de distintos BB sobre los potenciales de acción (PA) epicárdicos y las AR. Se perfundieron

drogas BB en los primeros tres minutos de la reperusión, en corazones aislados de rata, sometidos a 10 minutos de isquemia regional. Se compararon, respecto de un control perfundido con solución de Krebs-Henseleit (n=11), el efecto de esmolol 10 µM (β1 selectivo, n=10), de nadolol 10 µM (BB no selectivo, n=9) y de ICI 118551 10 µM (β2 selectivo, n= 10). Se estudiaron la incidencia de las AR y los efectos sobre la morfología de los PA. Los promedios fueron analizados estadísticamente por ANOVA1 y la incidencia de las AR mediante x2. Esmolol y nadolol, redujeron la incidencia de las AR, (p <0.01 y p <0.05, respectivamente), mientras que con el bloqueo β2 selectivo obtuvo un valor de p = 0.051. Todas las drogas disminuyeron la amplitud del PA respecto de los valores de preisquemia (p<0.05), y se recuperaron al final de la reperusión, excepto con esmolol que permaneció baja (p<0.05). Los tratamientos acortaron la duración del PA, sin embargo al restituir la solución de control, sólo luego del bloqueo β1 selectivo se observó una marcada prolongación (p<0.05). Las drogas con efecto sobre receptores β2 disminuyeron la frecuencia, mientras que con esmolol no se registraron cambios en esta variable. Estos datos indicarían que la reducción de la amplitud y duración del PA y de la frecuencia cardíaca serían componentes del mecanismo protector de los BB. El efecto antiarrítmico del esmolol podría deberse, en parte, a las propiedades electrofisiológicas descritas en este trabajo.

337 (798) LA ESTIMULACIÓN VAGAL EFERENTE AUMENTA EL TAMAÑO DE INFARTO DE MIOCARDIO EN CONEJOS A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS.

Buchholz B.¹; Rodriguez M.²; Ivalde F.³; Donato M.⁴; Gelpi R.⁵

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5} <donatomartin@hotmail.com.ar>

Diferente evidencia experimental ha demostrado que la estimulación vagal (EV) induce la expresión de proteínas cardioprotectoras, atenúa las arritmias y mejora la sobrevida en la insuficiencia cardíaca crónica pos-infarto de miocardio. A pesar de estos hallazgos, no existen datos concluyentes acerca de los efectos de la EV *in vivo* sobre el tamaño de infarto inducido por isquemia y reperusión. Objetivos: El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la EV sobre el tamaño de infarto aplicando la EV antes del inicio de la isquemia. Métodos: Se utilizaron conejos a los que se les realizó isquemia miocárdica regional de 45 min seguida de 4 hs de reperusión (Grupo 1, n=9). En el grupo 2 (n=7) se repitió el protocolo anterior pero se aplicó, además, EV eferente derecha durante 10 min a una intensidad suficiente como para reducir la frecuencia cardíaca (FC) entre 10 y 20%, seguida de 5 min de recuperación en forma previa a la isquemia. Finalmente, en el grupo 3 (n=5) se repitió el protocolo de G2 pero se administró atropina durante la estimulación, a dosis necesaria para bloquear el efecto de la EV sobre la FC. Para eliminar la estimulación aferente, el nervio vago fue seccionado a nivel cervical. El área de riesgo se midió por tinción con Azul de Evans y las zonas infartadas se evaluaron utilizando cloruro de trifetil de tetrazolium. El tamaño de infarto se expresó como porcentaje del área de riesgo. Resultados: La EV aplicada antes de la isquemia aumentó el tamaño de infarto desde 41,99±2,73% a 57,29±4,89% (p<0,05). La administración de atropina durante la EV revirtió este efecto, reduciendo el tamaño de infarto a un 45,00±4,56% (p<0,05). Conclusiones: La estimulación vagal eferente realizada antes de la isquemia tiene efecto deletéreo, incrementando significativamente el tamaño de infarto a través de un mecanismo colinérgico muscarínico.

338 (608) EFECTOS DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) SOBRE LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL EN CORAZONES DE RATAS SOMETIDOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN EN DISTINTAS CONDICIONES METABÓLICAS.

Jaitovich M.¹; Torresin M.²; Hermann R.³; García Allevi M.⁴; Marina Prendes M.⁵; Savino E.⁶; Varela A.⁷

Cátedra de Fisiología, FFyB. UBA. IQUIMEFA-CONICET^{1 2 3 4 5 6 7} <gmarina@ffyb.uba.ar>

Trabajos anteriores demostraron que el ayuno previo de 24 hs (AY) mejora la recuperación funcional y disminuye la liberación de creatina quinasa (CK) en corazones perfundidos Langendorff sometidos a isquemia global-flujo cero (I) (25min) - reperfusión (RP) (30 min). El PC mejora la recuperación funcional, disminuye la liberación de CK en corazones provenientes de ratas alimentadas ad libitum (AL) pero revierte los efectos beneficiosos del AY, aboliendo las diferencias entre ambos grupos. El objetivo fue evaluar si los efectos observados se acompañan de cambios paralelos en la apertura de poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM). El PC consistió en 6 ciclos de RP (10 seg) - I (10 seg) al finalizar la isquemia sostenida. Las mitocondrias fueron aisladas al finalizar el experimento y la apertura del PTPM se evaluó midiendo el descenso de la absorbancia (Abs) de la suspensión de mitocondrias a una longitud de onda (λ) de 540 nm en respuesta a diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Se empleó ciclosporina A (CsA), inhibidor de la apertura del PTPM, para comprobar que los cambios en la Abs se deben a la apertura del mismo. Dicho agente inhibió en todos los grupos el descenso de la Abs en respuesta a la máxima concentración de Ca^{2+} empleada. La estadística se hizo con ANOVA (n=8). Resultados (expresados como porcentaje de caída de la Abs inicial a λ 540 nm):

	$Ca^{2+}100$ uM	$Ca^{2+}150$ uM	$Ca^{2+}200$ uM	$Ca^{2+}300$ uM	$Ca^{2+}400$ uM	$Ca^{2+}500$ uM
AL	1,20 ± 0,2	1,65 ± 0,3	1,97 ± 0,1	2,40 ± 0,1*	2,42 ± 0,2	2,40 ± 0,1
AL PC	1,87 ± 0,3	2,42 ± 0,5	2,48 ± 0,5	2,90 ± 0,3	3,9 ± 0,2*	4,22 ± 0,2
AY	0,76 ± 0,05	0,72 ± 0,06	0,80 ± 0,1	1,09 ± 0,2	1,33 ± 0,2	2,29 ± 0,2*
AY PC	0,84 ± 0,08	1,41 ± 0,35	1,68 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,80 ± 0,2*	2,80 ± 0,2

*p < 0.05 vs el porcentaje de caída de Abs en respuesta a todas las concentraciones menores de Ca^{2+} en el mismo grupo.

Los resultados sugieren que tanto los efectos del AY como los del PC en AL se acompañan de una mayor resistencia a la apertura del PTPM. Por otro lado, el PC revierte dicho efecto en AY.

339 (565) LA ESTIMULACIÓN DEL CATABOLISMO DE LOS TRIGLICÉRIDOS ENDÓGENOS (TG) POR EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) ES NOCIVA PARA LA RECUPERACIÓN CONTRÁCTIL DEL CORAZÓN PROVENIENTE DE RATAS AYUNADAS SOMETIDO A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN. Hermann R.¹; Jaitovich M.²; Marina Prensdes M.³; Torresin M.⁴; Pascale N.⁵; Savino E.⁶; Varela A.⁷

Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA. IQUIMEFA-CONICET^{1 2 3 4 5 6 7} <romina_hermann@yahoo.com.ar>

Trabajos previos demostraron que el ayuno (24 h) (AY), que estimula el catabolismo de TG durante el período aeróbico pre-isquémico y consecuentemente inhibe la estimulación isquémica de la glucólisis, mejora la recuperación funcional y atenúa la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM) en corazón de rata sometido a isquemia-global-flujo cero (I)-reperfusión (RP). El PC revierte los efectos beneficiosos del AY y estimula el consumo de TG durante la RP. El objetivo fue investigar si los efectos del PC en corazones AY se deben a la estimulación del consumo de TG durante la RP. Corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a I (25 min) - RP (30 min) fueron sometidos a PC [6 ciclos de RP (10 seg) - I (10 seg)] al inicio de la RP en presencia de oxfenicina 2 mM (Ox) que inhibe la carnitina-palmitoil-transferasa-1. Se midió la recuperación contráctil [Presión sistólica pico x Frecuencia (Px F), velocidad de contracción y de relajación ($\pm dP/dt$)], el consumo de glucógeno y de TG. Se evaluó la concentración umbral de Ca^{2+} para producir la apertura del PTPM en mitocondrias aisladas al finalizar la RP. Se empleó ANOVA, n=8. La Ox revirtió los efectos nocivos del PC en AY sobre la recuperación contráctil [20 min RP: P x F (% del valor pre-isquémico): AY 72±9; PC 47±5; PC+Ox 69±9; p<0,01 PC vs AY y PC+Ox; se observó el mismo perfil en la recuperación de $\pm dP/dt$], efecto que se acompañó de inhibición del consumo de TG (μ mol/g peso seco: fin de RP: AY 13,7±0,7; PC 7,8±1,2; PC+Ox 12,9±1,7; p<0,01 PC vs AY y PC+Ox) y de glucógeno (μ g/100 mg peso seco: fin de RP: AY 88,7±21,6; PC: 14,6±3,8; PC+Ox

122,1±18,1; p<0,01 PC vs AY y PC+Ox) durante la RP. No modificó la concentración umbral de Ca^{2+} necesaria para producir la apertura del PTPM. Los resultados sugieren que la estimulación del consumo de TG por el PC podría estar implicada en la reversión de la protección ejercida por el ayuno sobre la recuperación funcional, sin afectar la apertura del PTPM.

340 (564) DISEÑO DE UN NUEVO MODELO OVINO DE MIOCARDIOPATÍA DILATADA POST-INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO. Locatelli P.¹; Olea F.²; Salmo F.³; Hnatiuk A.⁴; Sepúlveda D.⁵; Laguens R.⁶; Crottogini A.⁷

Universidad Favaloro^{1 2 3 4 5 6 7} <plocatelli@favaloro.edu.ar>

En investigación pre-clínica sobre regeneración miocárdica se requieren modelos de miocardiopatía dilatada (MD) post-infarto agudo de miocardio (IAM) en mamíferos grandes. Nuestro objetivo fue diseñar un modelo ovino de MD post-IAM que, a diferencia del existente, no se fundamentara en las arterias a ocluir (ya que la anatomía coronaria ovina es heterogénea) sino en el tamaño de infarto a lograr. En 6 ovejas adultas se indujo un IAM ántero-lateral de ~ 25% de la masa del ventrículo izquierdo (VI) seleccionando en cada animal la combinación de ligaduras coronarias que, por visualización directa, se estimase necesaria. La evolución post-IAM se evaluó por ecocardiografía [volúmenes ventriculares de fin de diástole (VFD) y sístole (VFS), fracción de eyección (FE), y espesor parietal de fin de diástole (EPFD) y sístole (EPFS)]. En 12 semanas, el VFD aumentó de 31,7 a 77,4 ml (p<0,003, X \pm DS, t-test apareado) y el VFS de 14,4±4 a 42±11,7 ml (p<0,002). La FE bajó de 55,1±5 a 46±6,3% (p<0,006), el EPFD de 8.4±0.9 a 6.4±0.9 mm (p<0.003), y el EPFS de 11.8±1.4 a 8.3±0.8 mm (p<0.002). El tamaño de infarto (planimetría) fue 22,8±3,7% del VI. Conclusión: En un mamífero grande de histología miocárdica similar a la humana, un IAM ántero-lateral de ~ 25% del VI, independientemente de la anatomía coronaria, induce MD. Este modelo puede ser de utilidad en investigación pre-clínica de regeneración cardíaca.

341 (369) HIPERTROFIA DE MIOCARDIO EN MODELOS COMBINADOS DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL RENOVASCULAR (RV) Y DOCA-SAL (DS): FUNCIONALIDAD VENTRICULAR Y COMPORTAMIENTO HORMONAL. Cerrudo C.¹; Matorra F.²; Rodríguez Fermepin M.³; Rey Deutsch A.⁴; Saucedo S.⁵; Cavallero S.⁶; González G.⁷; Hertig C.⁸; Gelpi R.⁹; Fernández B.¹⁰

Cátedra de Fisiopatología, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA²; Cátedra de Fisiopatología, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA³; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA⁴; Cátedra de Fisiopatología, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA⁵; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA⁶; INGENIERÍA CONICET⁷; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA⁸; Cátedra de Fisiopatología, INFIBIOC, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA⁹; <cerrudocarolina@yahoo.com.ar>

Con el objetivo de estudiar la evolución del comportamiento morfológico, funcional y hormonal del corazón ante cambios del tipo de sobrecarga y de hipertrofia, demostramos previamente (*Medicina*, 68, 67-68, 2008) que a las 12 semanas (sem), la hipertrofia cardíaca y la síntesis de péptidos natriuréticos (PNs) es mayor en DS que en RV; y que en modelos combinados estos parámetros son intermedios entre los grupos puros y sham. Continuamos el estudio de parámetros hormonales y funcionales en modelos crónicos puros de 6 y 12 sem (RV6, DS6, RV12, DS12), grupos combinados (RV6/DS6, DS6/RV6) y sham (Sh6, Sh12). Evaluamos función ventricular in vivo (presión arterial media (PAM), presión sistólica del VI (PSVI), su derivada ($\pm dP/dt$) y presión desarrollada del VI (PDVI)) y determinamos expresiones de

sión ventricular (VI,VD) de ANP y BNP. Los resultados de función se muestran en la tabla

	PAM	PSVI (mmHg)	PDVI	+dP/dt (mmHg/seg)
Sh6	88±2	107±5	105±4	6336±212
Sh12	88±5	112±4	108±4	5597±646
RV6	139±10 [#]	156±10 [#]	152±10*	10628±405 [#]
RV12	154±10 [§]	165±11 [#]	152±8*	11535±551 [§]
RV6/DS6	144±6 [#]	169±10 [#]	164±10 [#]	13027±1523 [§]
DS6	119±8*	156±6 [#]	150±7*	10143±968 [#]
DS12	138±11 [#]	156±11 [#]	151±11*	9746±732 [#]
DS6/RV6	132±7 [§]	172±7 [§]	178±5 [#]	10602±957 [#]

En VI el ARNm-ANP aumentó más en DS y el de BNP aumentó en RV de forma tiempo dependiente. En VD, el ARNm-ANP tuvo mayores aumentos en RV12 y DS6. Los parámetros hormonales presentaron en RV6/DS6 y DS6/RV6 valores menores que RV12 y DS12 respectivamente. El incremento de hipertrofia cardíaca se correlacionó con la expresión de ARNm-ANP en función del tiempo ($p=0,01$; $r^2=0,8173$). No existió correlación entre parámetros funcionales y hormonales. Los modelos crónicos puros RV y DS presentan niveles de hipertensión y modificaciones de la función del VI similares pero DS presenta mayor hipertrofia y niveles de PNs. En los modelos combinados, la sustitución de un tipo de sobrecarga reduce las alteraciones hormonales y morfológicas pero no modifica las alteraciones de los parámetros funcionales.

GENETICA 2 Y MEDICINA REGENERATIVA 2

342 (572) RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO APOE -491 A/T, EL PERFIL LIPÍDICO Y LA ENFERMEDAD CORONARIA. Bañares V.¹; Bardach A.²; Tavella M.³; Schreier L.⁴

Centro Nacional de Genética Médica, ANLIS "DR Carlos Malbrán"; PROPIA -Programa de Prevención del Infarto en Argentina- UNLP-CIC¹; PROPIA - Programa de Prevención del Infarto en Argentina-, UNLP - CIC, Buenos Aires.²³; Lab Lípidos y Lipoproteínas, FFYB, UBA.⁴ <vgbaniars@hotmail.com>

Los aumentos de colesterol (col) total, LDL y triglicéridos (TG) y la disminución de col-HDL se producen por fallas en el metabolismo lipoproteico y representan uno de los mayores factores de riesgo cardiovascular. El alelo e4 del gen APOE fue asociado con niveles elevados de col y riesgo aumentado de enfermedad coronaria (EC) en varones. Sin embargo, otros estudios no lo asociaron con EC en sus poblaciones. Otros factores genéticos y/o ambientales actuarían sobre estas asociaciones. Además de las modificaciones cualitativas de la proteína propia de cada alelo, variaciones cuantitativas en los niveles de expresión del gen originadas por polimorfismos en el promotor como el -491 A/T podrían actuar como factor de riesgo de EC. Objetivo: determinar si hay asociación entre el polimorfismo -491 A/T en APOE y el perfil lipídico en una población con diagnóstico de EC. Se estudiaron 380 pacientes, ambos sexos de 33 a 80 años sometidos a angiografía coronaria como st. de referencia realizada por único observador para diagnóstico de EC o para evaluación prequirúrgica valvular, conformándose 2 grupos según la presencia de estenosis: casos n=253 y controles n=127, sin diferencias en edad. Se excluyeron pacientes que recibían hipolipemiantes. Los valores de col-LDL fueron menores en el grupo con alelo T entre mujeres hasta 45 años, $90,13 \pm 31$ vs. $152,10 \pm 35,5$ mg/dl, $p=0,046$ (t-test). No hubo diferencias con TG y HDL. Aplicando regresión lineal se observó que cuando el alelo T está presente col-LDL aumenta con la edad $p=0,007$, esta relación se mantuvo sólo entre las mujeres, $\beta: 0,45$ $p=0,005$. Los casos con genotipo TT presentaron mayor edad, $p=0,007$ y dividiendo según género, las diferencias se mantienen entre mujeres, $p=0,010$. El alelo -491 T fue menos frecuente en mujeres casos respecto de controles $p=0,016$ (test de chi2), OR: 0,186, IC-95%: 0,045-0,763 $p=0,02$. El alelo T contribuiría a mantener menores niveles de col-LDL en mujeres ejerciendo un efecto protector de EC.

343 (587) TRANSPLANTE DE MÉDULA ÓSEA COMO TRATAMIENTO EN LA PORFIRIA CONGÉNITA ERITROPOYÉTICA. EVOLUCIÓN DEL CUADRO BIOQUÍMICO Y GENÉTICO. Piñeiro Pauwels M.¹; Gerez E.²; Melito V.³; Martínez M.⁴; Batlle A.⁵; Parera V.⁶; Staciuk R.⁷; Bonduel M.⁸; Rossetti M.⁹

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA^{1 2}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA; Departamento de Química Biológica-FCEyN-UBA^{3 4}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA^{5 6}; Servicio de Transplante de Médula Ósea- Hospital de Pediatría Prof. Dr "JP Garrahan"^{7 8}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA; Departamento de Química Biológica-FCEyN-UBA⁹ <belen81_rosario@hotmail.com>

La Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE) es una porfiria cutánea, autosómica recesiva, debida a mutaciones en el gen de la Uroporfirinógeno III-Sintetasa (Urogen III-S) que lleva a una marcada disminución de su actividad y a la acumulación de la serie isomérica I, responsable de la severa sintomatología cutánea. Estudiamos un paciente diagnosticado con PCE en los primeros meses de vida, cuando presentaba manifestaciones cutáneas leves y un perfil de excreción de porfirinas concordante con dicho diagnóstico. Se detectaron las mutaciones 627 ins28/C73R. A los 5 años se determinaron: Porfirinas totales en orina, PTO: 16587 µg/24h, VN: $d \leq 250$ µg/24h; índice de porfirinas plasmáticas, IPP: 7,00 $\lambda = 619$ nm, VN: $d \leq 1,30 \leq 619$ nm). El niño fue entonces sometido a un transplante de médula ósea, su hermana fue la donante compatible. Inicialmente, se observó una notable mejoría tanto en los valores bioquímicos como en la sintomatología (PTO: 1937 µg/24h, IPP: 4,10 $\lambda = 619$ nm), sin embargo, los estudios realizados 2 años post transplante indicaron un aumento del contenido de porfirinas en orina y plasma (PTO: 6079 µg/24h, IPP: $5,77 \leq 619$ nm). Con el objeto de explicar esta recidiva, se realizaron estudios enzimáticos (HPLC) y genéticos en el paciente y sus familiares, utilizando PCR y secuenciación automática. El análisis genético reveló la presencia de ambas mutaciones y una actividad de la Urogen III-S del 53% con respecto al valor control. La madre y ambos hermanos son portadores de la mutación C73R y el padre de la 627ins28. La medición de la actividad enzimática confirma la correlación genotipo-fenotipo para PCE, obteniéndose valores de actividad cercanos al 50% para los portadores de la C73R, asociada a una sintomatología severa en homocigosis, y del 74% para la 627ins28. Estos resultados ponen en evidencia la presencia en el paciente de células quiméricas, que podrían asociarse a la proliferación de sus células y las provenientes de la donante.

344 (598) IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL GEN CDKL5/STK9 RESPONSABLE DEL SÍNDROME DE RETT. Iudica C.¹; Gil E.²; Puente J.³; Gilardi P.⁴; Lopez Miranda L.⁵; Zanier J.⁶

Asociación de Genética Humana^{1 2}; Labgenetics SL^{3 4}; Asociación de Genética Humana^{5 6} <adn@aghu.org>

El Síndrome de Rett es un desorden genético con modo de herencia ligado al X dominante caracterizado por retardo mental y severos síntomas neurológicos. El gen CDKL5 en Xp22.13 (GenBank Accesion Number: NM_003159), está asociado a un fenotipo severo, con encefalopatía de comienzo temprano, convulsiones, trastorno global del desarrollo y retraso intelectual profundo. CDKL5 (ciclina tipo 5 dependiente de kinasa) también conocido como serin-treonina- kinasa 9 (STK9), presenta un tamaño de 227.99 kb y consta de 21 exones, 20 de los cuales codifican para una proteína kinasa implicada en la transmisión de señales mediante fosforilación de distintas proteínas en residuos de serina y treonina, e involucrada en la regulación del ciclo celular. Este trabajo presenta un caso clínico en donde se ha identifica-

do una mutación puntual no descrita con anterioridad. El caso índice es una niña producto de un primer embarazo de curso normal de pareja no consanguínea sin antecedentes. Sus pautas madurativas hasta los 6 meses resultaron normales. A los 7 meses presenta convulsiones y pérdida de pautas madurativas. El EEG muestra espigas multifocales independientes. Al examen clínico presenta microcefalia, hiperlaxitud articular, babeo, movimiento de lavado de manos. Estudiada genéticamente, su cariotipo es 46, XX (30) y el estudio molecular es normal para el gen MECP2, cuyas mutaciones puntuales y grandes deleciones son responsables en la mayoría de los casos del Síndrome de Rett. El estudio molecular del gen CDLK5/SK presenta en heterocigosis el cambio nucleotídico c.619G>T en el exón 6 que provoca la aparición de la mutación sin sentido p.Gly207Ter, que supone el cambio del codón 207 (que codifica para el aminoácido Gly) por un codón de terminación, generando una proteína trunca. Estos resultados sugieren que la mutación descrita tiene valor diagnóstico en pacientes con diagnóstico presuntivo de Síndrome de Rett y resultados normales para el análisis molecular del gen MECP2.

345 (733) ANÁLISIS DE MARCADORES MOLECULARES EN PACIENTES ARGENTINOS CON PORFIRIA VARIEGATA.

Granata B.¹; Parera V.²; Battle A.³; Rossetti M.⁴

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas J. de San Martín^{1 2 3}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas J. de San Martín; Departamento de Química Biológica - FCEN - UBA⁴ <xoyxoana@yahoo.com.ar>

Mutaciones en el gen que codifica para la enzima Protoporfirinógeno Oxidasa (PPOX) provocan la Porfiria Variegata, una porfiria autosómica dominante, de sintomatología mixta y asociada a un descenso de actividad enzimática del 50%. A pesar de la alta heterogeneidad molecular característica de las porfirias, la mutación c.1043insT, descrita sólo en Argentina, está presente en el 42% de los pacientes. Para determinar el origen de esta elevada prevalencia, en una primera instancia se estudiaron SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) y se obtuvieron resultados que no nos permitieron inferir la ocurrencia de un efecto fundador, debido a la poca variabilidad de los polimorfismos estudiados así como a la reducida disponibilidad de familiares (SAIC 2008). Para complementar este estudio se realizó un análisis de microsatélites (STRs); seleccionándose dos STRs flanqueantes al gen de la PPOX (D1S2705 y D1S104), ambos compuestos por la unidad de repetición CA, por amplificación por PCR y posterior electroforesis en geles de poliacrilamida. Se estudiaron pacientes con la inserción (D1S2705 y D1S104: 9), con otras mutaciones (D1S2705: 14 y D1S104: 13) y controles (D1S2705: 16 y D1S104: 18). Para ambos STRs se obtuvieron sólo 3 alelos, cuando en otras poblaciones hay descriptos hasta 8. Además, uno de los alelos observados está presente en el 100% de los casos, mientras que la distribución de los 2 alelos restantes es similar en todos los grupos. No se observó ningún haplotipo particular asociado a la mutación. Considerando que los marcadores moleculares analizados hasta el momento muestran poca variabilidad en la población Argentina, se continuará el trabajo con el análisis de otros marcadores, tanto intra como extragénicos. Por el momento, los resultados conjuntos de SNPs y STRs no nos permiten inferir la ocurrencia de un efecto fundador.

346 (698) ESTUDIO BIOQUÍMICO Y GENÉTICO EN UN CASO ATÍPICO DE PORFIRIA DUAL. Piñeiro Pauwels M.¹; Gerez E.²; Melito V.³; Martínez M.⁴; Battle A.⁵; Parera V.⁶; Rossetti M.⁷

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA^{1 2}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA; Departamento de Química Biológica-

FCEyN-UBA³; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA; Departamento de Química Biológica-FCEyN-UBA⁴; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA^{5 6}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA; Departamento de Química Biológica-FCEyN-UBA⁷ <belen81_rosario@hotmail.com>

La Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE) es una porfiria cutánea, autosómica recesiva. Se presenta con eritema, prurito, hiperpigmentación, hipertricosis y ampollas mutilantes, eritrodancia y anemia hemolítica, debido a deficiencia en la Uroporfirinógeno III sintetasa (UROIII-S). La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es una patología autosómica dominante debida a fallas en la Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D), caracterizada por la presencia de ataques agudos neuro-abdominales. La paciente manifestó dolor abdominal, síntomas cutáneos leves, eritrodancia y esplenomegalia. Este cuadro y los valores bioquímicos sugirieron la coexistencia de PCE y PAI (SAIC 2007). Tenía, además, elevados valores de ferritina sérica (1369 ng/mL, V.N: 12-150 ng/mL), indicando niveles altos de hierro en sangre. El objetivo fue confirmar el diagnóstico bioquímico midiendo la actividad de las enzimas involucradas e identificando las mutaciones responsables. El diagnóstico genético se realizó en sangre periférica mediante PCR y secuenciación automática. La presencia de la mutación p.G111R en PBG-D es concordante con actividad hallada (49,37 U/ml GR; VN: 81,51 11,96 U/ml). Sin embargo, el análisis del gen de la UroIII-S, descartó la existencia de mutaciones en el promotor eritroide, en los exones y regiones adyacentes, consistente con el valor normal de actividad obtenido. Dado que el hierro inhibe la UROIII-S hepática y que la paciente presentaba valores elevados de ferritina, se ensayó el efecto de concentraciones crecientes de hierro sobre su actividad en glóbulos rojos. *In vitro* se encontró una relación inversa entre la actividad de la enzima (42-0% de conversión de hidroximetilbilano en Uro III) y la concentración de hierro (0-1,2mM de (NH₄)₂Fe(SO₄)₆·6H₂O). Estos datos sugieren que el cuadro compatible con PCE sería desencadenado por una inhibición de Uro III-S debido a los altos niveles de hierro que presentaba la paciente.

347 (735) CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL DESAFÍO CON TRICHINELLA SPIRALIS (TS) EN RATONES DE DISTINTO GENOTIPO DE LA COLONIA CBI/IGE.

Vasconi M.¹; Bertorini G.²; Londra M.³; Panero N.⁴; Di Masso R.⁵; Hinrichsen L.⁶

Área Parasitología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, U.N.R.^{1 2}; Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, U.N.R.^{3 4}; Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, U.N.R.; CIC-UNR, U.N.R.^{5 6} <lhinrich@unr.edu.ar>

No hay, actualmente, tratamiento oportuno que limite la triquinosis, la prevención es clave y las medidas a implementarse, tendientes a disminuir la cantidad de mamíferos capaces de infectarse con el parásito, deberían basarse en la comprensión de los mecanismos íntimos que regulan la relación hospedero-parásito. El efecto del genotipo en la respuesta al desafío con Ts durante la primoinfección, se estudió en dos líneas de ratones del modelo murino desarrollado en el IGE. Se utilizaron machos adultos, de las líneas CBI/L y CBI/C, que se infectaron por vía oral con larvas infectantes L1 de Ts. Grupos de 5-9 ratones se desafiaron con 1 (GI), 2 (GII) o 4 (GIII) larvas por g de peso corporal y se determinó la carga parasitaria en lengua (número de parásitos por unidad de peso; CPr, no/g) en el período crónico (42±2 días post-infección). Animales de GII se sacrificaron también en el período agudo (6 y 13 días post-infección) para analizar la fecundidad (Fh) de las hembras extraídas del intestino delgado y el número de parásitos adultos (nPA). La carga parasitaria aumentó al aumentar la dosis infectante (media±ES) (CBI/C, GI: 305±79, GII: 390±80, GIII: 1368±185; CBI/L, GI: 48±15, GII: 65±13, GIII: 110±21), aunque la magnitud del incremento fue distinta para cada genotipo (P<0.05); CBI/L fue el genotipo "re-

sistente" y CBI/C fue "susceptible". Acorde a esta clasificación, en la etapa entérica, nPA y Fh disminuyeron entre los 6 y 13 días post-infección ($P < 0.01$) en los ratones CBI/L; por el contrario, CBI/C no mostró un comportamiento claro en este período ya que no se observaron tendencias significativas en los valores de nPA y Fh. Estos datos sugieren que el análisis de este modelo animal será útil para dilucidar los mecanismos que regulan la relación compleja y dinámica entre parásito y hospedero, conocimiento necesario para predecir el resultado de las estrategias de control de las enfermedades parasitarias basadas en la resistencia genética del huésped.

348 (830) POLIMORFISMO T(-1031)C DEL GEN TNF- α EN SINDROME DE POLIQUISTOSIS OVÁRICA (PCOS). Avila M.¹; Muzzio D.²; Robles A.³; Pérez M.⁴; Frechtel G.⁵; Cerrone G.⁶

Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA¹ ; Cátedra de Genética y Biología Molecular² ; Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{3 4 5 6} <mnicolavila@hotmail.com>

TNF- α es una citoquina proinflamatoria multifuncional con efectos en el metabolismo de lípidos, la coagulación, la resistencia de insulina, y la función endotelial. Objetivo: evaluar el rol de una variante común T(-1031)C del gen, en el perfil hormonal y la predisposición al síndrome metabólico (SM), en pacientes con PCOs. Métodos: Se estudiaron 122 mujeres normales y 165 pacientes con diagnóstico de PCOs. Se amplificó el promotor del gen TNF- α con primers específicos por PCR y luego se identificaron polimorfismos mediante la técnica de SSCP en gel de poliacrilamida al 8% con glicerol y posterior validación del polimorfismo T(-1031)C por PCR-RFLP. Se analizaron frecuencias alélicas y genotípicas y se correlacionaron componentes del SM y del perfil hormonal, con las variantes del polimorfismo (GraphPad InStat). Resultados: se observaron diferencias en las frecuencias del genotipo heterocigota T/C entre la población de PCOs y la de mujeres normales (42.3% vs 30%), con una tendencia estadísticamente significativa para la herencia genotípica del alelo C ($p=0.0674$, OR de 1.658, IC95%: 0.9834 a 2.796 con la aproximación de Woolf). La correlación con los diferentes componentes del síndrome metabólico en la población total analizada, arrojó diferencias significativas para la asociación entre la presencia del alelo C y una mayor presión arterial sistólica y diastólica ($p=0.02$); mientras que dentro de cada población las diferencias tienen una tendencia significativa ($p=0.06$). Esta diferencia se mantiene al contemplar este polimorfismo junto con el presente en la posición -308 del promotor ($p=0,06$). Se observan diferencias no significativas en las frecuencias del alelo C asociadas con el perfil hormonal de la PCOs. Conclusión: una mayor frecuencia del alelo C en pacientes con PCO, previamente relacionado al síndrome metabólico y aterosclerosis, se constituye en un marcador genético de riesgo de complicaciones metabólicas en pacientes portadoras del mismo.

349 (759) APOPTOSIS AUMENTADA POR TRATAMIENTO CON GLOBOTRIAOSILCERAMIDA (GB3) SOBRE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA. IMPLICANCIAS PARA LA ENFERMEDAD DE FABRY. De Francesco P.¹; Fossati C.²; Rozenfeld P.³

LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP^{1 2 3} <nicolasdefrancesco@gmail.com>

La globotriaosilceramida (Gb3) es un glicolípido neutro que se acumula en la Enfermedad de Fabry (EF), una enfermedad de almacenamiento lisosomal causada por la deficiencia genética X-ligada de la enzima lisosomal α -galactosidasa A. Los valores plasmáticos de Gb3 en pacientes con EF se hallan en el rango de 2 a 50 μM , mientras que en individuos sanos son menores a 1,2 μM . Resultados preliminares de nuestro grupo indicarán la existencia de un estado proapoptótico en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con EF. En el presente trabajo se investiga los efectos del tratamiento con Gb3 sobre los niveles de apoptosis de PBMC normales. Partiendo de sangre periférica de sujetos normales, se aislaron PBMC mediante

un gradiente de ficoll, y se cultivaron en presencia de Gb3 variando el rango de concentraciones de 0 a 40 μM , por 48 hs, y a una concentración fija de 20 μM por diferentes tiempos, hasta 48 hs. Posteriormente se procedió a analizar los niveles de apoptosis de estas células mediante las técnicas de Anexina-V y TUNEL por citometría de flujo. También se determinó el grado de despolarización de la membrana mitocondrial (DMM) mediante JC-1. En la cinética del tratamiento con Gb3 se observó un aumento en los niveles de apoptosis en linfocitos y monocitos, alcanzando los valores máximos a las 6 hs para Anexina-V y 48 hs para TUNEL. Así mismo, el agregado de Gb3 produjo una DMM que fue máxima a las 6 hs. Los experimentos de dosis-respuesta con Gb3 mostraron una dependencia de los niveles de DMM y apoptosis en linfocitos y monocitos al aumentar la dosis. Estos hallazgos muestran un efecto directo de dosis patológicamente elevadas de Gb3 sobre la fisiología de las PBMC, lo que podría sugerir un vínculo causal con la apoptosis observada en PBMC de pacientes. La observación de la disrupción del potencial mitocondrial mediante JC-1 indicaría la activación de la vía intrínseca de apoptosis como mediadora de este proceso.

350 (55) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES MODIFICADORES DE HISTONAS EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS. Luzzani C.¹; Scassa M.²; Romorini L.³; Losino N.⁴; Sevlever G.⁵; Barañón L.⁶; Miriuka S.⁷; Guberman A.⁸

Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA¹ ; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLEN^{2 3} ; Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA⁴ ; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLEN⁵ ; Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA⁶ ; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLEN⁷ ; Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA⁸ <carlosluzzani@qb.fcen.uba.ar>

Las Células Madre Embrionarias (CME) poseen la capacidad de proliferar indefinidamente *in vitro*, sin presentar cambios en su fenotipo. A su vez, pueden ser diferenciadas a células de cualquier linaje con excepción de tejidos extraembrionarios. El balance entre estos dos destinos depende de una fina regulación de la expresión de genes específicos dirigida por señales externas a la célula. Existen, además, cambios en la organización de la cromatina a nivel global y de *loci* específicos. Por otra parte, los tejidos embrionarios se desarrollan en un ambiente hipóxico en las primeras etapas del desarrollo. Si bien aún no está claro el efecto de la hipoxia sobre CME, se ha reportado que la exposición de las mismas a una tensión de oxígeno baja (de 1-3%) favorece el mantenimiento del estado indiferenciado. Nuestra hipótesis es que ciertos factores de transcripción específicos de CME como Oct3/4, SOX2 y Nanog podrían estar regulando la expresión de genes que codifican para ciertas enzimas modificadoras de la cromatina y que durante la diferenciación o en condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, se modifica su perfil de expresión. Mediante inmunofluorescencia y RT-PCR comprobamos el estado de diferenciación celular de CME humanas de la línea HUES-9. Posteriormente, por RT-PCR y RT-qPCR analizamos la expresión de diversos genes de enzimas modificadoras de la cromatina. Encontramos que en CME indiferenciadas se expresan tanto enzimas con actividad acetilasa de histonas (Myst2, GTF3C3, GTF3C4 y Gcn5l2) como deacetilasas (HDAC2, HDAC3 y HDAC5), metiltransferasas de histonas (SETDB1, Ehmt2, PRMT1, Suv39h1 y Suv39h2) y un factor perteneciente al Complejo Represor Polycomb 1, Bmi-1. Nuestros resultados muestran que los perfiles de expresión de algunas de estas proteínas varían con la diferenciación y/o con la disponibilidad de oxígeno, sugiriendo que la regulación de la expresión de la maquinaria de remodelación de la cromatina es importante para estos procesos.

351 (336) DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS STEM DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO A CÉLULAS DE FENOTIPO NEURAL: ESTUDIO DE LA METILACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN OCT4. Quijano C.¹; Cardozo A.²; Argibay P.³

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental - Hospital Italiano de Buenos Aires^{1 2 3}
 <analia.quijano@hospitalitaliano.org.ar>

Introducción: Las células stem derivadas de tejido adiposo (ATSCs) son células progenitoras multipotentes derivadas del mesodermo embrionario, muestran potencial de diferenciación específico de linaje y bajo condiciones especiales pueden transdiferenciarse a células de otros linajes, distintos al de origen. Éste comportamiento plástico sugiere similitud funcional con las células stem embrionarias (ESCs). Otra semejanza entre ambos tipos celulares es la expresión de factores de transcripción embrionarios OCT4, NANOG y SOX2. En ESCs, OCT4 inhibe a genes tejido-específicos, promueve la autorreplicación y pluripotencialidad y es down-regulado durante la diferenciación celular, siendo la metilación del ADN en la región promotora del gen un posible mecanismo responsable del silenciamiento. **Objetivo:** En una población de hATSCs, estudiar la expresión génica y la metilación del ADN en el promotor proximal (PP) de OCT4 durante la diferenciación neural in vitro. **Materiales y Métodos:** Las hATSCs fueron obtenidas a partir de 6 muestras de tejido adiposo humano, cultivadas y diferenciadas in vitro a fenotipo neural. La caracterización celular previo y post-diferenciación se realizó mediante inmunocitoquímica. La expresión de OCT4 y la metilación del ADN en la región del PP fueron evaluados mediante PCR-Real time y secuenciación genómica con bisulfito, respectivamente. **Resultados:** El análisis por PCR Real-time evidenció expresión OCT4 en hATSCs indiferenciadas, así como una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) luego de la diferenciación neural. El análisis de secuenciación con bisulfito reveló una frecuencia de metilación de 71.6% en hATSCs indiferenciadas y de 78.3% en las diferenciadas, no siendo una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$). **Conclusión:** Si bien se observa una disminución estadísticamente significativa en la expresión de OCT4 luego de la diferenciación, el patrón de metilación en el PP no varía, permaneciendo hipermetilado.

352 (381) ALTA RECURRENCIA FAMILIAR DE CONVULSIONES FEBRILES: DESCRIPCIÓN DE 20 SUJETOS AFECTADOS EN 2 FAMILIAS. Kauffman M.¹; Consalvo D.²; Pereira De Silva N.³; Kochen S.⁴

IBCN. Facultad de Medicina. UBA. CONICET^{1 2 3 4}
 <marcelokauffman@gmail.com>

Introducción y Objetivos: Aunque no es infrecuente el antecedente de la patología o de eventos comiciales en el grupo familiar de los sujetos con epilepsia, sí lo es la observación de familias que segregan el trastorno en un modo sugestivo de la existencia de una alteración monogénica. Largamente ha sido conocida la existencia de agregación familiar de las convulsiones febriles, presentándose ésta rara vez como un trastorno con alta penetrancia familiar. Nuestro objetivo es describir las características clínicas de 2 familias que muestran una alta recurrencia familiar de convulsiones febriles. **Materiales y Métodos:** Descripción clínica, neurofisiológica y genética de dos familias con alta recurrencia familiar de convulsiones febriles. **Resultados:** Una de las familias segrega convulsiones febriles simples, en al menos 2 generaciones, en 8 sujetos. Aisladamente se han presentado crisis febriles más allá de los 5 años de edad, evidenciándose en todos los casos una excelente evolución sin requerimiento de terapéutica en la mayoría de los sujetos. En los casos analizados no se objetivan mayores alteraciones en las neuroimágenes y la electrofisiología. El patrón de herencia parece corresponder al de un trastorno autosómico dominante. La otra familia segrega convulsiones febriles y afebriles, en al menos 5 generaciones, en 12 sujetos con alta variabilidad intra-familiar en la respuesta al tratamiento farmacológico y la semiología de las crisis afebriles. El patrón de herencia autosómico dominante y la segregación de crisis febriles y afebriles sugieren un diagnóstico de epilepsia generalizada con convulsiones febriles plus. **Conclusión:** Se presentan dos familias que segregan formas familiares monogénicas de convulsiones febriles.

353 (442) BIOENCAPSULAMIENTO DE FOLÍCULOS OVÁRICOS EN MATRICES SOL-GEL. Catalano P.¹; Alvarez G.²; Díaz L.³; Desimone M.⁴; Lux-lantos V.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA¹; Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA^{2 3 4}; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁵ <catalano@dna.uba.ar>

La inmovilización en matrices de sílica-gel demostró ser útil para el encapsulamiento de células y el diseño de biorreactores. La terapia de reemplazo hormonal [estradiol (E) y progesterona] es el tratamiento más utilizado para aliviar los síntomas menopáusicos, aunque su uso es motivo de controversias, por el riesgo de aparición y desarrollo de tumores. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad y funcionalidad de nuevos sistemas de biodispensación hormonal: folículos ováricos bioencapsulados. Se aislaron folículos ováricos preovulatorios de ratas Sprague-Dawley prepúberes tratadas previamente (48 hs) con 25 U de PMSG (SC). Éstos fueron encapsulados utilizando dos precursores sol-gel: tetraetoxisilano (TEOS) y tetrakis (2-hidroxi etil) ortosilicato (THEOS) y mantenidos en cultivo (24 y 72 hs). Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT y la secreción de E al medio de cultivo por RIA. Los folículos encapsulados en ambos tipos de geles fueron viables a las 24 y 72 hs ($p < 0,05$) con viabilidad similar a folículos en cultivo no encapsulados (FNE). La secreción de E por parte de los folículos encapsulados en TEOS luego de 24 hs fue mayor que en los geles controles (sin folículos) ($p < 0,02$) y similar a la secreción de los FNE. Los encapsulados en THEOS mostraron niveles de E mayor que los controles ($p < 0,05$) pero inferiores a los de FNE ($p < 0,03$). Si bien a las 72 hs los folículos encapsulados en ambos tipos de geles mostraron niveles mayores que sus respectivos geles controles ($p < 0,04$) y fueron similares a los de los FNE, todos mostraron niveles menores que los observados a las 24 hs ($p < 0,03$). Concluimos que las matrices sol-gel ensayadas, en especial TEOS, serían aptas para el bioencapsulamiento de folículos ováricos con conservación de la viabilidad y funcionalidad celular, los que podrían ser implantados y permitir una dispensación hormonal en forma controlada. Evaluaremos su funcionalidad a tiempos más largos. (CONICET, UBA y ANPCYT)

354 (450) CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE RATÓN PROVENIENTES DE EMBRIONES EN ESTADIO DE BLASTOCISTO ECLOSIONADO. AUTORRENOVACIÓN MÁS PLURIPOTENCIA. Fagundez C.¹; Loresi M.²; Ojea Quintana M.³; Delcourt S.⁴; Testa R.⁵; Gogorza S.⁶; Argibay P.⁷

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires^{1 2 3}; Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires; Servicio de Ginecología del Hospital Italiano de Buenos Aires⁴; Servicio de Ginecología del Hospital Italiano de Buenos Aires^{5 6}; Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires⁷ <carol.fagundez@hospitalitaliano.org.ar>

Las células madre embrionarias de ratón (CMEr) son células indiferenciadas que pueden autorrenovarse manteniendo su pluripotencialidad. Poseen una alta relación núcleo/citoplasma y expresan genes asociados con la autorrenovación y la pluripotencia (OCT4, Sox2, Nanog, SSEA-1). Muestran elevada actividad de las enzimas fosfatasa alcalina (ALP) y telomerasa, y pueden dar origen a derivados de ectodermo, mesodermo y endodermo. La investigación con CMEr es un paso importante para el desarrollo de nuevas biotecnologías aplicables a problemáticas de origen humano. El objetivo del presente trabajo fue obtener una línea de CMEr para el estudio de eventos del desarrollo en mamíferos y la investigación de procesos biológicos involucrados en enfermedades relacionadas con humanos que podrían modelarse mediante estas células. Embriones de dos células fueron cultivados en medio HTF hasta blastocisto eclosionado y sembrados sobre fibroblastos embrionarios de ra-

tón irradiados en presencia de medio DMEM knockout suplementado con suero de reemplazo. Las colonias obtenidas fueron repicadas mecánicamente, y en repiques avanzados, de manera enzimática. El estado indiferenciado se verificó mediante la detección de ALP y la presencia de los marcadores OCT-4 y SSEA-1. Se evaluó la pluripotencia *in vitro* mediante la formación de cuerpos embrioides (CE). Los blastocistos de ratón originaron numerosas colonias de CMEr que se han mantenido por varios pasajes mostrando una viabilidad del 90%, incluso después de ser congeladas. Estas células exhiben la morfología típica de las CMEr, mostrando positividad para los marcadores de pluripotencia e indiferenciación. La formación de CE demostró la capacidad de estas células de originar distintos tipos celulares. En conclusión, los blastocistos de ratón constituyen una fuente invaluable para la obtención de células madre y el posterior uso de las mismas para estudiar efectos de drogas, posibles terapias regenerativas y el desarrollo de mamíferos.

INMUNOLOGIA 7

355 (372) MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDIAR LA INFLUENCIA DE LAS CITOQUINAS SISTEMICAS EN LA HOMEOSTASIS INTESTINAL. Pedrotti L.¹; Rodríguez-galán M.²; Correa S.³

Dpto. Bioquímica Clínica CIBICI (CONICET) Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba.^{1 2 3}
<pepekidman@hotmail.com>

La perturbación del balance de citoquinas en la mucosa intestinal altera la permeabilidad del epitelio e induce reclutamiento de células activadas. Previamente demostramos que ratones tratados e.v. con plásmidos que expresan IL-12 (inyección hidrodinámica), aumentan marcadamente esta citoquina y el IFN γ , tienen cambios en las poblaciones leucocitarias y expresión de marcadores de activación en linfocitos de bazo. Con este modelo experimental estudiamos el efecto en la mucosa intestinal del aumento sistémico de IL-12. Ratones C57BL/6 (n=2-4) se inyectaron con 1mg de plásmido control (basal) o pscIL-12 (p40-p35 cDNA) en la base de la cola. A los 7 días se obtuvieron nódulos linfoides mesentéricos (NLM) para evaluar porcentaje y fenotipo de linfocitos y células presentadoras de antígeno (CPA) y producción de citoquinas en cultivos estimulados con anti-CD3 + anti-CD28. Observamos incremento en el porcentaje de células dendríticas CD11c+ con alta expresión de MHC tipo II (p<0.05) aunque sin cambios en los marcadores CD80 y CD86. El porcentaje de células CD8+ disminuyó y la relación CD4/CD8 incrementó significativamente con el tratamiento (p<0.05). La producción de IFN γ fue mayor en ratones tratados con IL-12 (p<0.05). En un estudio cinético determinamos que la producción de IL-12 es máxima a las 24-48 h de la inyección y que induce liberación de TNF α desde el día 4. Ratones transgénicos OTI con TCR específico para ovoalbúmina también mostraron una producción aumentada de IFN γ en cultivos estimulados luego de la inyección con el plásmido de IL-12. Nuestros resultados muestran que la producción de citoquinas inflamatorias a nivel sistémico modifica el porcentaje de CPA y poblaciones linfocitarias reclutadas en los NLM así como la actividad funcional de estas células en ratones convencionales o transgénicos. Estos cambios en proporción y función de las poblaciones leucocitarias podrían alterar el balance anti-inflamatorio de la mucosa y la homeostasis intestinal.

356 (584) EFECTO PREBIÓTICO E INMUNOMODULATORIO DEL KEFIRAN EN UN MODELO MURINO. Medrano M.¹; Hamet M.²; Racedo S.³; Rolny I.⁴; Pérez P.⁵; Abraham A.⁶

CIDCA^{1 2}; CIDCA; Cátedra de Microbiología, FCE, UNLP^{3 4 5}; CIDCA; Área Bioquímica y Control de Alimentos, FCE, UNLP⁶ <mmedrano@cidca.org.ar>

El kefirán es un glucogalactano ramificado no digerible capaz de modular la respuesta inmune en la mucosa intestinal. El obje-

tivo del trabajo fue estudiar, en un modelo murino, el efecto del kefirán sobre la microbiota intestinal y su posible correlación con el balance de células relevantes para la respuesta inmune de mucosas. Para ello a ratones Balb/C se les administró kefirán 300 mg/L en el agua de bebida *ad libitum* durante 0, 2 y 7 días de tratamiento (dT). Se tomaron muestras de materia fecal, se extrajo DNA utilizando un kit comercial y se amplificó por PCR con los primers 518r y GC-338f para *Eubacteria*, Bif164f y GC-Bif662 para *Bifidobacterium sp.* y Lac1 y Lac2 para *Lactobacillus sp.* Los amplicones se analizaron por DGGE y análisis de agrupamiento. Las poblaciones de macrófagos en placas de Peyer (PP), nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) y lavado peritoneal se analizaron por citometría de flujo. Se evaluó el número de células IgA+ y F4/80+ en *lamina propria* (LP) mediante inmunohistoquímica. Se evidenciaron células productoras de mucus con azul de Alcian. El análisis mediante primers universales indica que se produjo una modificación de la microbiota en los animales tratados con kefirán. Se observó un cambio en las bandas correspondientes a bifidobacterias y lactobacilos en los ratones tratados. El número de células IgA+ aumentó en LP a 2 y 7 dT. El número de células F4/80+ disminuyó en PP y aumentó en LP y lavado peritoneal a los 7 dT. Por otro lado, se observó un aumento en el número de células productoras de mucus a los 2 y 7 dT. Los resultados demuestran la administración oral de kefirán en ratones es capaz de modificar la microbiota intestinal al mismo tiempo que modula el balance de células asociadas al sistema inmune de mucosa intestinal. Se podría inferir que el efecto inmunomodulador observado para el kefirán podría estar relacionado con la modificación de las poblaciones bacterianas sin descartar un efecto directo del kefirán.

357 (323) LA CO-ADMINISTRACIÓN DE OMP16 COMO ADYUVANTE DE OVA POR VÍA MUCOSAL INDUCE UNA RESPUESTA INMUNE T HELPER 1. Ibañez A.¹; Coria L.²; Pasquevich K.³; Giambartolomei G.⁴; Cassataro J.⁵

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas "José de San Martín," (UBA), Buenos Aires. Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA-CONICET), Buenos Aires, Argentina^{1 2 3 4 5} <andres_sea@yahoo.com.ar>

Resultados previos han demostrado que la porción proteica de la lipoproteína Omp16 de *Brucella* spp. (Omp16S) al ser administrada por vía oral presenta propiedades auto-adyuvantes. Esto nos impulsó a estudiar su capacidad adyuvante en mucosas usando como antígeno modelo ovalbúmina (OVA), por dos vías de mucosas diferentes: la vía oral y la nasal. Para llevar a cabo este estudio se inmunizaron ratones con OVA, Omp16S+OVA o toxina colérica (TC)+OVA. La migración de los linfocitos efectores hacia la mucosa intestinal es guiada, sobre todo, por integrinas de la familia $\beta 7$, en particular $\alpha 4\beta 7$, que interactúa con la adhesina vascular MadCAM-1, que se expresa en las mucosas. Mediante citometría de flujo se pudo determinar que el porcentaje de células T CD8+ que expresan la integrina $\alpha 4\beta 7$ aumentó en los ganglios mesentéricos de los grupos inmunizados por vía oral con Omp16S+OVA (4.53%) y TC+OVA (16.43%) en comparación con el grupo inmunizado con OVA (1.64%). También hemos observado una respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) inducida por la aplicación de OVA en la almohadilla plantar en los grupos inmunizados por vía oral con Omp16S+OVA y TC+OVA (P<0.01 vs. el grupo OVA). De manera similar, los esplenocitos de los ratones inmunizados por vía nasal con Omp16S+OVA o TC+OVA secretaron niveles significativos de IFN- γ (P<0.01 vs el grupo OVA) pero no IL-4 en respuesta a la estimulación con OVA *in vitro*. Mediante citometría de flujo se pudo determinar que el porcentaje de células T CD4+ y T CD8+ anti-OVA que producen IFN- γ intracelular aumentó en el grupo inmunizado por vía nasal con Omp16S+OVA (0.97% y 1.08%) en comparación con TC+OVA (0.28% y 0.22%) y OVA (0.23% y 0.47%). En conclusión, estos resultados indican que Omp16S como adyuvante de mucosas para OVA induce la migración de células T CD8+ a la mucosa gastrointestinal, una respuesta inmune mediada por células T anti-OVA *in vivo* e inducción de células T CD4+ y CD8+ productoras de IFN- γ .

- 358 (610) EFECTO DE UNA LECHE FERMENTADA PROBIÓTICA Y DE SU SOBRENADANTE LIBRE DE BACTERIAS SOBRE INMUNIDAD SISTÉMICA EN UN MODELO DE DESNUTRICIÓN LEVE EN RATÓN.** Novotny Núñez I.¹; Perdigon G.²; De Moreno De Leblanc A.³; Maldonado Galdeano C.⁴

CERELA-CONICET¹ ; Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA-CONICET; Cátedra de Inmunología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán.² ; Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA-CONICET³ ; Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA-CONICET; Cátedra de Inmunología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán⁴ <novotny@cerela.org.ar>

La desnutrición (DSN) es un estado nutricional causado por ingestión deficiente de nutrientes, induce depresión del Sistema Inmune, entre otros. Los Probióticos pueden reconstituir la mucosa intestinal y reforzar la respuesta inmune local y sistémica. Se evalúa el efecto de Leche Fermentada Probiótica (LFP) y su Sobrenadante Libre de Bacterias (SLB) en: inmunidad local y sistémica, actividad fagocítica (AF) de macrófagos Peritoneales (MP), de bazo (MB) y microbiota intestinal. Ratonos de 21 días (d) separados en 4 grupos. G1 control normal: con alimento balanceado ad-libitum. G2 control DSN: restricción del 25% del alimento. G3 luego de DSN continua restricción del 25% del alimento mas LFP. G4 luego de DSN continua restricción del 25% del alimento mas SLB. 5d post-re-nutrición (5dpr) con LFP o SLB se analizó fagocitosis de MP y MB. Se extrajo timo e intestino delgado para determinar citoquinas por IFI. Para inmunidad sistémica a 5dpr se inmunizó con ovoalbúmina, vía subcutánea, 3 veces cada 48 hs. Después de la 1^o inoculación los grupos G3 y G4 se subdividieron según administración de LFP y SLB: previa, continua o post-inmunización. Se determinó IgG-específica-anti ovo por ELISA en suero. No hubo diferencias respecto a G1 en las citoquinas. En ratones re-nutridos 5d con LFP se incrementó UFC de flora bifida (7,31±0,1) respecto a G1 (1,99±0,1). El % de AF de MP y MB en grupos re-nutridos 5d previa inmunización (5dpi) con LFP (26±1; 20±2) y SLB (28±3; 22±2) aumentó respecto a G2 (11±4; 7±1) respectivamente. Se vio aumento significativo en DO para IgG-específica-anti-ovo en suero de ratones re-nutridos 5dpi con LFP ((0,9±0,1) y en grupo que consumió LFP durante y después de inmunización (1,16±/0,05) respecto a G2 (0,4±/0,3). Ratonos re-nutridos con SLB mostraron valores ligeramente inferiores de IgG-anti-ovo de los que recibieron LFP 5dpi. Solo LFP incrementó flora bifida. Ratonos alimentados continuamente con LFP y SLB aumentaron AF e IgG-antiovo en suero.

- 359 (457) ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INMUNES QUE MEDIAN EL EFECTO PROTECTOR DEL PROBIÓTICO L. CASEI CRL 431 FRENTE A UNA INFECCIÓN CON SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM EN RATON.** Castillo N.¹; Perdigón G.²; De Moreno De Leblanc A.³

CERELA-CONICET¹ ; CERELA-CONICET; Fac. de Bqca. Qca. y Fcia, UNT²; CERELA-CONICET³ <nataliacastillo@cerela.org.ar>

Previamente demostramos el efecto protector de la administración continua (previa y post infección) de *L. casei* CRL 431 (Lc) a ratones desafiados con *S. Typhimurium* (ST). Se evalúa la activación de células inmunes in sitio efector de intestino delgado (ID) por determinación de TLRs, marcadores de superficie, células+ en citoquinas y CD80/86 en células totales de placa de Peyer (ctPP). Se administró Lc a ratones BALB/c 7días consecutivos. Luego se los desafió con ST y se los dividió en dos subgrupos: uno continuó recibiendo Lc (7c) y el otro no (7p). Los controles fueron: de infección (CI) y de bioterio (CB). Se tomó muestra basal (7b) y a los 7 y 10 días post infección (PI). Se determinó TLR2, TLR4, 33D1, F4/80, IL6, IL10, IFN γ y TNF α en cortes de ID por IFI. Se estudió en todos los grupos CD80/86 en ctPP (técnica ex vivo) por citometría de flujo. En el grupo 7b se incrementó TLR4

y TLR2 comparado con CB. A los 7 y 10 días PI se observó aumento de TLR2 en los grupos 7c y 7p con respecto a CI, mientras que TLR4 se mantuvo similar a CI, pero mayor que CB. F4/80 y 33D1 aumentaron en el grupo 7b en relación a CB. Este incremento se acentuó 7días PI en ratones 7c comparados con CI y CB. 10 días PI, F4/80 disminuyó a valores similares al basal; 33D1 se mantuvo elevado. En el grupo 7b se observó disminución de células IFN γ y TNF α + y aumento de IL6 con respecto a CB. A los 7 y 10días PI en el grupo 7c se observó aumento de IFN α , IL10 e IL6 y disminución de TNF α comparado con CI. El grupo 7b presentó aumento de la coexpresión CD80/86 en relación a CB. 7días PI, solo el grupo 7c incrementó CD80/86 en relación a CI. La administración de *L. casei* se correlaciona con una mejor presentación antigénica y respuesta inmune más eficiente frente al patógeno. Induce activación de TLR4 y TLR2 y regula la respuesta inflamatoria PI, por disminución de TNF α y aumento de IL10. El aumento de IFN α e IL6 se relacionaría con la mayor producción de IgA secretoria observada previamente para 7c.

- 360 (709) ANÁLISIS DE ACTIVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES EPITELIALES PROCEDENTES DE DISTINTAS MUCOSAS POR AGONISTAS DE LA RESPUESTA INNATA.** González Maciel M.¹; Romanín D.²; Hiriart Y.³; Meier D.⁴; Rumbo M.⁵

Laboratorio de Investigaciones del sistema inmune (LISIN)¹ ; Laboratorio de Investigaciones del sistema inmune (LISIN); Centro de Investigación en Criotecología de Alimentos (CIDCA)² ; Laboratorio de Investigaciones del sistema inmune (LISIN)³ 4 5 <loligm@gmail.com>

El epitelio de las mucosas actúa como un integrador de distintas señales provenientes del lumen y el medio interno. Es capaz de activar una respuesta innata inducible frente a la presencia de señales de invasión de la mucosa, promoviendo la defensa del organismo. El presente trabajo tiene por objetivo caracterizar la respuesta de líneas celulares epiteliales usualmente utilizadas como modelo frente a distintos agonistas de la respuesta innata y citoquinas proinflamatorias. Se emplearon las líneas epiteliales Caco-2, T84 y HT29 (intestino humano); mICcl2 (intestinal murina), AGS (gástrica humana) y A549 (alveolar humana). Se incubaron con los agonistas de: TLR5 (flagelina de *S. typhimurium*, 1 μ g/mL); TLR 4 (LPS de *E. coli*, 100 ng/mL); TLR2 (PAM3Cys, 1 μ g/mL); TLR3 (poli I:C, 10 ng/mL); IL1b (10 ng/mL) y TNF α (100 ng/mL). En todos los casos se analizó por RT-qPCR a las 2 horas de inducción la expresión de CCL20 y en muestras seleccionadas se analizó además la expresión de CXCL2, CXCL8 y CXCL10. En todas las líneas se indujo la expresión de CCL20 (p<0.01) en alguna condición confirmando la distribución amplia de esta respuesta en epitelios. Entre los agonistas, flagelina fue capaz de activar el mayor número de líneas celulares (todas excepto mICcl2), mientras que todas las líneas resultaron respondedoras frente a las citoquinas empleadas. Los mayores niveles de inducción los mostraron las líneas Caco-2 (incremento relativo IR de 300 \pm 50 veces respecto al no estimulado) y AGS (IR de 2200 \pm 200). La reactividad frente a LPS estuvo restringida a la línea HT29. En todos los casos se observó una correlación entre la inducción transcripcional de CXCL2, CXCL8, CXCL10 y CCL20. No se encontró un perfil unificado de reactividad, sino que cada línea celular presenta características propias, aún entre líneas celulares de procedencia similar. Este trabajo permite seleccionar la línea celular adecuada de acuerdo a la vía en estudio.

- 361 (701) ESTUDIO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL PROCESO INFLAMATORIO EN UN MODELO DE MALNUTRICIÓN PROTEICA SEVERA.** Calabrese G.¹; Rasente R.²; Roux M.³

Cátedra de Biología Celular y Molecular; Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹ ; Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² ; Laboratorio de Mucosas, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³ <gcalabe@ffybu.uba.ar>

Hemos demostrado que el antígeno dietario desencadena un proceso inflamatorio intestinal, regulado por TNF- α que induce en las células intestinales epiteliales (IECs) la translocación del factor NF κ -B al núcleo celular modulando la transcripción de genes inflamatorios. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión de la IL-17 y de factores de transcripción relacionados, en nuestro modelo de inmunodeficiencia secundaria por desnutrición proteica severa al destete. En este modelo por pérdida hasta el 25% del peso inicial y posterior renutrición con caseína al 20% durante 21 días en ratas Wistar (R_{21}), se estudió la expresión de IL-17, Foxp3 y STAT3 por Western Blot (WB). Se analizó sobre las IECs aisladas y luego fraccionadas por ultracén-trifugación diferencial, la distribución subcelular de la citoquina y de los factores en las fracciones citosólicas, microsomales y nucleares. La detección se realizó con el empleo de los anticuerpos anti IL-17 recombinante (Peprotech), anti Foxp3 (Santa Cruz, Biotechnology) y un monoclonal anti STAT3 (BD, Pharmingen) y revelados con el sistema Avidina-Biotina-Peroxidasa y su sustrato DAB (Vector). El análisis reveló la expresión de IL-17 (R_{21} microsomal 2.6 UA/ μ g prot. vs Control microsomal 1.5 UA/ μ g prot; $P < 0.05$) en la fracción microsomal de los animales R_{21} , acompañada de una localización de Foxp3 predominantemente citosólica y nuclear del STAT3 y NF κ -B. Estos resultados sugieren que: (1) La expresión de IL-17 contribuiría a la perpetuación de la respuesta inflamatoria, (2) La respuesta proinflamatoria descrita en los animales R_{21} sería inducida por los factores transcripcionales NF κ -B y STAT3, translocados al núcleo de las IECs, comparados con la localización citosólica de los mismos en el grupo control, (3) La localización citosólica del factor Foxp3 en los animales R_{21} favorecería la expresión IL-17.

362 (4) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE YOGUR EN UN MODELO DE MURINO DE RECURRENCIA DE INFLAMACIÓN INTESTINAL. Chaves A.¹; Perdígón G.²; De Moreno De Leblanc A.³

Centro de Referencia para Lactobacilos¹; Centro de Referencia para Lactobacilos; Facultad de Bioqca, Qca y Fcia. UNT²; Centro de Referencia para Lactobacilos³ <aschaves@cerela.org.ar>

En Inflamación Intestinal (II) la microbiota juega un papel importante pudiendo inducir una gran estimulación del sistema inmune mucoso. Previamente demostramos que la administración de yogur (Y) regula la respuesta inflamatoria TNBS inducida. Objetivo: estudiar el efecto de la administración de Y en un modelo de recurrencia de II inducida por TNBS y los mecanismos inmunes involucrados. Ratones inoculados con TNBS que recuperaron su peso inicial, se dividieron en 2 grupos: 1) tratados con Y 21 días TNBS-Yogur-TNBS (TYT); 2) control de TNBS-TNBS (TT). A los 21d en ambos grupos se tomaron muestras de hígado e intestino grueso (IG). Luego fueron re-inoculados con TNBS y a los 3d post 2° inoculación se tomaron muestras para: translocación bacteriana a hígado (TB), IG para histología, microbiota intestinal y determinación de cél.+10campos para citoquinas pro y antiinflamatorias (IL-17, IFN γ , TNF α e IL-10). Se evaluó variación de peso corporal (PC) y mortalidad. TT mostró una disminución de PC al 2° y 3°d post 2°TNBS (21,37 \pm 0,97 2d y 20,72 \pm 1,95 3d) comparado con TYT (28,15 \pm 2,36 2d, 27,74 \pm 3,13 3d). La mortalidad fue del 3-8% solo para TT coincidente con un mayor score de daño histológico (5,3 \pm 0,7) comparado con TYT (2,6 \pm 0,5). En el grupo TYT, se favoreció la población de bifidobacterias (5,28 \pm 0,14 UFC) con disminución de enterobacterias (3,37 \pm 0,93 UFC) comparado con TT (2,01 \pm 0,2 UFC y 6,70 \pm 1,35 UFC respectivamente). La TB, a los 3d post 2°TNBS, fue menor para TYT comparado con TT. El N° de cél. IL-17+ en TYT fue menor 18 \pm 5 vs 33 \pm 6 para TT en 3d post 2°TNBS. TT incrementó el N° de cél. IFN γ + en relación al dato basal. Para IFN γ y TNF α TYT no mostró diferencias respecto del control normal. IL-10 aumentó en TYT (23 \pm 4 y 30 \pm 5) vs (13 \pm 4 y 17 \pm 4) para TT. La administración de Y durante la remisión es capaz de atenuar los síntomas de la II y estaría mediado por IL-10 y cambios en la microbiota intestinal, que regularían la respuesta inmune manteniendo la homeostasis intestinal.

363 (498) BACTERIAS DEL GÉNERO ACTINOMYCETALES EJERCEN UN EFECTO INHIBITORIO SOBRE CÉLULAS EPITELIALES HUMANAS DE MUCOSAS. Smaldini P.¹; John S.²; Fossati C.³; Docena G.⁴

LISIN Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune UNLP¹; Centre for Infectious Diseases and International Health Windeyer Institute of Medical Sciences, University College London²; LISIN Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune UNLP³ <paola.smaldini@gmail.com>

Las bacterias del género Actinomycetales son bacterias saprófitas, aeróbicas presentes en el medio ambiente, a las que se les ha asignado un efecto inmunomodulatorio en distintas situaciones patológicas. El objetivo del trabajo es estudiar el efecto que los actinomycetales (*Gordonia bronchialis*-Gb y *Rhodococcus coprophilus*-Rc) ejercen sobre células epiteliales de mucosas activadas con agentes pro-inflamatorios. Se emplearon líneas celulares de epitelio de pulmón e intestino humano (A549 de pulmón, Caco-2 y Caco luciferasa de intestino). Como estímulos pro-inflamatorios se empleó flagelina-Flic, y citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α . Como readout del sistema se midió la emisión de luz y la inducción de citoquinas, kimoquinas y TLR por RT-PCR y PCR tiempo real. Como inmunomoduladores bacterianos se emplearon los Actinomycetales (Gb y Rc) muertas por calor. En el sistema Caco luc la emisión de luz está acoplada a la activación de la vía de NF- κ B e inducción del promotor de CCL20. Se observó que células Caco luc responden a *Salmonella typhimurium* muerta y viva, pero no a Gb y Rc muertas. Sin embargo, cuando Caco-2-luc son pre-activadas con distintos estímulos pro-inflamatorios expresan TLR2, 4 y 9, y responden a las bacterias muertas, observándose una inhibición dosis-dependiente. Caco-2 y A549 estimuladas con IL-1 β , TNF- α y Flic responden en forma diferencial induciendo IL-1 β , IL-6, TNF- α , CCL20, IL-8 y MCP-1. Sin embargo, cuando son co-cultivadas con Gb y Rc sólo se observa inhibición significativa en la inducción IL-1 β , CCL20 e IL-8. Estos resultados indican que las bacterias *Gordonia bronchialis* y *Rhodococcus coprophilus* muertas ejercen un efecto inhibitorio sobre la activación *in vitro* de células epiteliales en un entorno inflamatorio. Inhiben la vía de señalización intracelular NF- κ B y la secreción de citoquinas y kimoquinas pro-inflamatorias. Sobre la base de estos resultados se plantea el empleo de estas bacterias muertas en distintas condiciones inflamatorias.

364 (592) SEÑALES INTRACELULARES ACTIVADAS POR BACTERIAS PROBIÓTICAS O LECHE FERMENTADA EN CÉLULAS INMUNES ASOCIADAS A INTESTINO. Maldonado Galdeano C.¹; De Moreno De Leblanc A.²; Dogi C.³; Carmuega E.⁴; Weill R.⁵; Perdígón G.⁶

Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA; Cátedra de Inmunología.Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia UNT¹; Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET)²; Nutritia, Buenos Aires, Argentina⁴; Dpto Investigación y Desarrollo, Danone SA, Argentina⁵; Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA; Cátedra de Inmunología.Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia UNT⁶ <cmaldo@cerela.org.ar>

Bacterias probióticas y leches fermentadas que contienen dichas bacterias (LFP) producen estimulación de células inmunes y de células epiteliales intestinales (CEI) con producción de citoquinas. Objetivo: determinar activación de calcineurina: vía NFAT y si el factor transcripcional NF κ B esta involucrado en la producción de citoquinas (TNF α e IL-6) inducidas por bacterias probióticas y LFP. Comparar dicha activación con bacterias no probióticas y comensales. Estudiar las moléculas CD-80/86. CEI y placas de Peyer (PP) fueron aisladas de intestino delgado (ID) de ratones. Los cultivos celulares fueron tratados o no con un anti-NF κ B para bloquear la vía y estimuladas posteriormente con: cepas probióticas *Lactobacillus casei* CRL431 (Lc) o *Lactobacillus casei* DN 111004 (Lc DN), o con una LFP conteniendo Lc DN o con bacterias no probióticas: *Lactobacillus acidophilus* heterólogo (La-hetero) o *Lactobacillus acidophilus* homólogo (La-homo). En

el sobrenadante de cultivo de CEI se determinó IL-6 y TNF α en sobrenadante de células de PP por ELISA. La activación de calcineurina se realizó por IFI en cortes de ID. Las moléculas coestimuladoras CD-80/86 fueron analizadas por citometría de flujo en células de PP de ratones alimentados con las bacterias mencionadas durante 7 días o con la LFP durante 5 días. Demostramos que la producción de IL6 y de TNF α fue dependiente de la vía NF κ B. LFP estimuló IL6 no así el resto de las bacterias ensayadas (LFP 36 \pm 6 vs C16 \pm 0,6 pg/ml). Con respecto a TNF α , Lc, LcDN, La-hetero indujeron aumento (87, 109, 145 pg/ml respectivamente vs C 17 \pm 0.2) no así LFP (9 \pm 0,1) en células de PP. La activación de células calcineurina+ fue similar en todas las muestras ensayadas (17 \pm 3 vs C 11 \pm 2). La co-expresión de CD80/86 fue estimulada por las cepas probióticas y LFP no así por las bacterias no probióticas. Estos resultados coinciden con estudios previos del laboratorio donde se demostró activación de la inmunidad innata por probióticos.

- 365 (536) ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE ASOCIADO A MUCOSAS (MALT) LUEGO DE LA INOCULACIÓN INTRAGÁSTRICA DE CEPAS ESCHERICHIA COLI PRODUCTORAS DE LA TOXINA SHIGA (STX) (STEC) EN RATONES AL DESTETE.** Fernández Brandó R.¹; Miliwebsky E.²; Mejías M.³; Panek C.⁴; Bentancor L.⁵; Ramos M.⁶; Rivas M.⁷; Palermo M.⁸

Instituto de Medicina Experimental (ILEX), Academia Nacional de Medicina¹; Departamento de Fisiopatología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Carlos G. Malbrán,²; Instituto de Investigaciones Hematológicas (IHHEMA), Academia Nacional de Medicina; Instituto de Medicina Experimental (ILEX), Academia Nacional de Medicina³⁻⁴; Instituto de Investigaciones Hematológicas (IHHEMA), Academia Nacional de Medicina⁵⁻⁶; Departamento de Fisiopatología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Carlos G. Malbrán,⁷; Instituto de Investigaciones Hematológicas (IHHEMA), Academia Nacional de Medicina; Instituto de Medicina Experimental (ILEX), Academia Nacional de Medicina⁸ <rominbra@yahoo.com.ar>

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una complicación de la infección con cepas STEC. Ya que el MALT es el primer sitio encontrado por STEC, nuestro objetivo fue estudiar la estimulación inmune en Placas de Peyer (PP) y nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) por citometría de flujo, luego de la inoculación ig de dos cepas *E. coli* O157:H7, una Stx+ (125/99) y otra Stx- (605/03) o PBS (Ctrl). Se observó disminución del % de linfocitos B (LB) en las PP de ratones inoculados con la cepa 125/99 desde las 24hs post-inoculación (X \pm DS, ANOVA)(Ctrl=77 \pm 4, n=11, 125/99=68 \pm 9, n=26, p<0.0005). No hubo diferencias en la IFM de CD62L. En los NLM de los ratones inoculados con la cepa 125/99, se observó un aumento transiente a las 24hs en el %LB seguido por una progresiva disminución hasta los 7d post-inoculación (7d:Ctrl=25 \pm 5, 605/03=24 \pm 5, 125/99=19 \pm 6, p<0.0001). Estos cambios podrían sugerir el tráfico de LB desde PP a NLM y a sitios efectores. Sólo los ratones inoculados con 605/03 presentaron una disminución en la IFM de CD62L en LB de NLM, 24hs post-inoculación (Ctrl=1566 \pm 223, 605/03=574 \pm 153, 125/99=1214 \pm 122, p < 0.005). Sin embargo, ambos grupos presentaron una disminución en la IFM de CD62L de LT (Ctrl=2790 \pm 225, 605/03=1186 \pm 206, 125/99=1863 \pm 324, p<0.005). Para analizar el efecto directo sobre los leucocitos, Stx2 recombinante (Stx2r) fue inyectada en la almohadilla plantar y el ganglio poplíteo drenante fue estudiado. Observamos un aumento del %LB CD69+ desde las 24hs (48hs: Ctrl=15 \pm 3, Stx2r=84 \pm 4, t-test p<0.0001) y un aumento en el % de células dendríticas (DC) CD11c+ (48hs:Ctrl=0.4 \pm 0.3, Stx2r=2.4 \pm 1.1, t-test p<0.01). El %LB no disminuyó, descartando un efecto tóxico directo de la Stx. A pesar de que ambas cepas *E. coli* Stx+ and Stx- indujeron activación de LB y LT del MALT, se observaron efectos diferenciales entre ellas. Debido a que la Stx2r activó LB y atrajo DC, podría ser uno de los factores responsables de los efectos diferenciales observados en el MALT.

- 366 (303) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE VIP/VPAC2 EN LOS SITIOS DE IMPLANTACIÓN DE RATONES NOD.** Azzam S.¹; Hauk V.²; Calafat M.³; Roca V.⁴; Fraccaroli L.⁵; Ramhorst R.⁶; Pérez Leiros C.⁷

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Laboratorio de Inmunofarmacología¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶⁻⁷ <sofia.azzam@gmail.com>

La regulación inmune-neuroendocrina del dialogo materno-fetal es fundamental para la implantación y el desarrollo de la placenta. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) podría tener un rol como mediador por su efecto secretorio e inductor de respuestas T_{H2} y Treg. Previamente demostramos que los ratones NOD presentan un aumento en la tasa de reabsorción embrionaria. El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de VIP/VPAC en sitios de implantación normales y con procesos de reabsorción en hembras NOD y control BALB/c y su modulación por estradiol (E₂). En el día 9 de gestación se obtuvieron muestras de suero y explantes de sitios de implantación (S). El E₂ sérico fue cuantificado por RIA. Se analizó la expresión de VIP por *real-time* RT-PCR, y de receptores VPAC₁ y VPAC₂ por RT-PCR semicuantitativa en sitios de implantación viables y reabsorbidos. Se cuantificó la expresión del ARNm de VIP en sitios viables (SN) y reabsorbidos (SR) de ambas cepas. Se observó una disminución de los niveles de ARNm de VIP en SN de ratones NOD vs BALB/c (VIP/GAPDH (2^{AA} Ct) X \pm ES: BALB/c 1,00 NOD (SN) 0,71 \pm 0,05 *p <0,05) y entre SN y SR de NOD (VIP/GAPDH (2^{AA} Ct) X \pm ES: (SN) 0,71 \pm 0,05; (SR) 0,44 \pm 0,04*p<0,05) Se determinó la expresión del VPAC₂ en condiciones basales y tratados in vitro por 6 h con E₂ (unidades arbitrarias de área VPAC2/GAPDH, X \pm ES: BALB/c basal 12 \pm 0,2; BALB/c E₂ 67 \pm 6* p<0,01; NOD basal 1,6 \pm 0,2; NOD E₂ 7,6 \pm 0,6). El E₂ induce significativamente la expresión de VPAC₂ sólo en úteros de ratones BALB/c. El receptor VPAC₁ se encuentra expresado en forma constitutiva y no es modulado por E₂. No se observaron diferencias en los niveles de E₂ entre ratones NOD y BALB/c preñados. Concluimos que los sitios de implantación de ratones NOD de 16 semanas con un perfil de citoquinas T_{H1} sérico expresan niveles significativamente reducidos de VIP, aún menores en sitios con reabsorción, y defectos en la modulación de VPAC₂ por E₂.

- 367 (829) CHLAMYDIA TRACHOMATIS INFECTION OF MALE GENITAL TRACT: EVIDENCE OF AUTOREACTIVE PROSTATITIS.** Mackern Oberti J.¹; Motrich R.²; Breser M.³; Sanchez L.⁴; Maccioni M.⁵; Rivero V.⁶

CIBICI CONICET Facultad de Ciencias Químicas UNC¹⁻²⁻³⁻⁴⁻⁵⁻⁶ <jpmackern@fcq.unc.edu.ar>

Chlamydia trachomatis is one of the most common sexually transmitted pathogens that cause mucosal infections in humans developing a wide spectrum of serious diseases. Although the role of *Chlamydia trachomatis* (CT) it has been extensively studied in autoimmune disease such as Reiter's syndrome and reactive arthritis, there are no reports about CT infection and its relationship with autoimmune prostatitis. The objective of the present work was to develop an ascending model of male genital tract infection with CT in order to analyze the possible development of autoimmune reactivity to prostate antigens. With this purpose, male Wistar rats, were inoculated with *Chlamydia trachomatis* mouse *pneumonitis* in the urethra and sacrificed 15 or 80 days postinfection (dpi) in order to set up an acute and chronic-like infection stage. PCR assays at 15 dpi showed the presence of CT in urethra (4/6), bladder (3/6), prostate (2/6) and seminal vesicles (2/6), but not in testis samples (0/8). When samples were analyzed at day 80 dpi, the presence of CT was not observed in urethra (0/8), bladder (0/8) or testis (0/8), but was present in a high proportion of prostate (5/8) and seminal vesicles (5/8) samples. Interesting, CT infection produced more important histological alterations such epithelial desquamation and inflammatory infiltrate in the prostate than in others tissues at 80 dpi. Moreover, autoantibodies against prostate antigens could be observed in the majority of CT infected animals (5/8). In addition, infected animals also showed specific prolifera-

rative response (measured by thymidine incorporation) against prostate antigens (4/8). Our results suggest that CT chronic of male genital tract shows a special tropism for the prostate gland that could be related to abnormalities in tolerance against prostate antigens and may act as a possible trigger factor in the development of autoimmune prostatitis in susceptible individuals.

368 (156) LA EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS ORGANO-FOSFORADOS INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE SUBUNIDADES DE NADPH OXIDASA EN PLACENTA E INDUCE EL ESTALLIDO RESPIRATORIO EN TROFBLASTOS JAR. Guiñazú N.¹; Rena V.²; Bulgaroni V.³; Chiappella G.⁴; Genti-raimondi S.⁵; Rivero V.⁶; Magnarelli G.⁷

IDEPA-CONICET; Universidad Nacional del Comahue¹; CIBICI-CONICET; Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba²; IDEPA-CONICET; Universidad Nacional del Comahue³; CIBICI-CONICET; Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba⁵; IDEPA-CONICET; Universidad Nacional del Comahue⁷ <natanien@hotmail.com>

El estudio de los mecanismos de toxicidad inducidos por plaguicidas organofosforados (OP) ha sido clásicamente abordado en base a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Considerando que el estrés oxidativo es un mecanismo adicional de toxicidad de OP y que ha sido asociado con complicaciones del embarazo, el objetivo de este trabajo fue analizar si la exposición a OP impacta sobre el balance oxidativo de la placenta. Se llevaron a cabo dos tipos de estudios: un muestreo poblacional de corte transversal en el que se utilizaron criterios de inclusión/exclusión y ensayos *in vitro* con células JAR. Se investigó por WB, si en las placentas (n=16) de residentes en comunidades rurales de zona de aplicación intensiva de OP, se afecta la expresión de los componentes de NADPH oxidasa, enzima que participa en la producción del anión superóxido. En las muestras de período de aplicación de OP se observó un incremento en la expresión de las subunidades citoplasmáticas p67phox, p47phox, mientras que los componentes del flavocitocromo b588 (gp91phox y p22phox) no mostraron cambios significativos respecto a las muestras de período de receso. Para validar los resultados observados, se evaluó por quimioluminiscencia (luminol) si la exposición *in vitro* de trofoblastos JAR a OP, era capaz de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El estudio cinético indicó que la incubación con clorpirifos (50µM) incrementa significativamente la producción de ROS a partir del ciclo N° 9, 480 seg., (Cp = 41,67±3,68 vs Basal = 25,33±4,14 URL, p<0.001) y se mantiene hasta el ciclo N° 15, 840 seg., (Cp = 36,00 ±3,55 vs Basal = 22,33±1,41 URL, p<0.001). Los resultados indican que la exposición a OP sería capaz de incrementar la respuesta oxidativa de placenta y de trofoblastos. El desbalance en la capacidad oxidante/antioxidante inducido por la exposición a estos xenobióticos podría tener consecuencias tanto en la función fisiológica placentaria como en el desarrollo del embarazo.

369 (432) LA GESTACIÓN INDUCE CAMBIOS EN LA POBLACIÓN DE LT EN TIMO Y MÉDULA ÓSEA MATERNA. Cortina M.¹; Prados M.²; Roux M.³; Miranda S.⁴

Instituto de Investigaciones Cardiológicas Prof. Dr. Alberto C. Taquini (CONICET-UBA)¹; Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA³; Instituto de Investigaciones Cardiológicas Prof. Dr. Alberto C. Taquini (CONICET-UBA)⁴ <maruja_cortinita@yahoo.com.ar>

Durante la gestación normal células progenitoras de origen linfoide llegan al organismo materno y persisten por largo tiempo. Con el objetivo de estudiar el impacto de la gestación sobre el sistema inmune materno, analizamos poblaciones linfocitarias residentes en timo y médula ósea empleando un modelo murino. Ratones hembras de la cepa CBA/J de 8±0,5 meses de edad fueron apareadas con machos BALB/c (cruza normal CxB) o DBA/2 (cruza abortadora CxD), dividiendo cada cruce en dos lotes: PV (1ª preñez) y MV (4ª preñez), sumados al lote NPV de hembras

de igual edad, vírgenes (n/lot= 7 a 10). Los animales se sacrificaron a los 18±0,5 días de gestación, extirpándose timo y fémur para obtener las suspensiones celulares respectivas. El análisis de las poblaciones linfocitarias se realizó por citometría de flujo. En timo, observamos que la gestación produce una disminución de células, CD3CD4⁺ y CD3 CD8⁺ en ambas cruces, aunque en mayor magnitud en la normal (CD4⁺: NPV=0,91±0,02 vs CxB=0,71±0,07 p<0,001; vs CxD=0,82±0,07 p<0,01; CD8⁺: NPV=0,86±0,03 vs CxB= 0,52±0,05; p<0,001; vs CxD= 0,70±0,06; p<0,001). En la cruce normal la multiparidad incrementó el número de células CD3CD4⁺ (PV=0,71±0,07 vs MV=0,77±0,06 p<0,05), pero no modificó la subpoblación CD3CD8⁺. Cuando se estudió el pool de células T en médula ósea en nuestro modelo, se observó que la población CD3CD4⁺ aumenta con la gestación (NPV=0,02±0,01 vs PV CxB=0,08±0,03; p<0,001 y vs CxD=0,08±0,02; p<0,001) pero si las gestaciones se repiten en la cruce normal, esta población disminuye a expensas de las células de memoria CD44⁺ y de células TCRαβ⁺ (CD3CD4⁺: PV=0,08±0,03 vs MV=0,05±0,03; p<0,05; CD44⁺: PV=0,28±0,06 vs MV=0,18±0,04; p<0,05 y TCRαβ⁺: PV=0,84±0,03 vs MV=0,5±0,06 p<0,01). Estos resultados indican que la gestación induce importantes efectos sobre la población T presente en los órganos linfoides centrales maternos sugiriendo que puede afectar la inmunocompetencia de la madre.

370 (349) MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE MATERNA EN EL MODELO IN VITRO DE DIÁLOGO MATERNO-FETAL MEDIADA POR VIP Y LPS EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS Y PATOLÓGICAS. Fraccaroli L.¹; Grasso E.²; Calafat M.³; Hauk V.⁴; Lombardi E.⁵; Pérez Leirós C.⁶; Ramhorst R.⁷

Laboratorio de Inmunofarmacología, Dpto de Química Biológica, UBA¹ 2 3 4; Instituto de Fertilidad, Buenos Aires⁵; Laboratorio de Inmunofarmacología, Dpto de Química Biológica, UBA⁶ 7 <lfraccaroli@qb.fcen.uba.ar>

La implantación embrionaria requiere una respuesta inflamatoria/Th1 controlada y su desregulación puede comprometer el embarazo. Las células trofoblásticas expresan receptores tipo Toll 4 (TLR-4) y a través de la interacción con LPS generan una respuesta inflamatoria controlada en la decidua materna. Dado que el VIP (péptido intestinal vasoactivo) posee efectos antiinflamatorios y tolerogénicos, estudiamos su capacidad de modular la respuesta inmune materna en el diálogo materno-fetal en presencia de LPS. Se realizaron cocultivos de células trofoblásticas (línea celular Swan-71 de citotrofoblasto de 1er. trimestre) y mononucleares totales maternas de mujeres fértiles o con Aborto Recurrente Espontáneo (ARE) en presencia de LPS (0,01µg/µl) y VIP (10⁻⁷ M). VIP disminuyó significativamente la producción de nitritos y MCP-1 y aumentó la de IL-10 (método de Griess y ELISA respectivamente) (p<0,05 M. Whitney test) en presencia de LPS en ambos grupos de mujeres. Asimismo, VIP aumentó específicamente la frecuencia de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ y la expresión de TGFβ. Sin embargo, en pacientes con ARE, el aumento fue significativamente mayor en presencia VIP+LPS alcanzando los niveles observados en las mujeres fértiles. Seguidamente, investigamos la producción de VIP en linfocitos CD4⁺ por análisis de citometría de flujo y la expresión de su receptor VPAC1 por RT-PCR. Luego de 24 h de cocultivo con las células Swan-71, las pacientes con ARE presentaron menor frecuencia de células CD4⁺ VIP⁺ y menor expresión de VPAC1 comparadas con las mujeres fértiles (10,9±1,6% vs 1,5±1,5%; p<0,05 M. Whitney test). LPS no aumentó la producción de VIP pero indujo un leve aumento en la expresión del receptor VPAC1 en estas pacientes. Conclusión: VIP es capaz de modular la respuesta inmune materna tanto en las mujeres fértiles o con ARE; sin embargo, el LPS potenciaría sus efectos en las pacientes con ARE, posiblemente a través de la inducción de VPAC1.

371 (89) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA-2 POR SEÑALES DE CALCIO EN ESTROMA UTERINO. Canellada A.¹; Sacerdoti F.²; Urteneche M.³; De León R.⁴; Gentile M.⁵

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. Dr. Ricardo Margni-CONICET-UBA; Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5} <acanell@ffyub.uba.ar>

La expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) puede regularse por calcineurina (Cn) /NFAT en distintos tipos celulares. Esta ruta puede bloquearse con inhibidores de Cn, como ciclosporina A (CsA). Nos propusimos estudiar si la ruta Cn/NFAT puede activarse en estroma uterino y si puede regular la transcripción y expresión de COX-2 (marcador de receptividad uterina) durante la ventana de implantación. Métodos: Se cultivaron células estromales aisladas de útero de ratas a los días 0 y 4 de gestación. La pureza de los cultivos se analizó por inmunodetección de citoqueratina y vimentina. A los 7 días de cultivo las células se estimularon o no durante 1h con: PMA+Ionomicina (Plo), Angiotensina II (Ang), con y sin pretratamiento con CsA. Se analizó por *western blot* e inmunofluorescencia la expresión y localización intracelular de NFATc1. La expresión de COX-2 fue analizada mediante RT-PCR y *western blot* en extractos de las células estimuladas *in vitro* durante 4 u 8 horas. Resultados: Detectamos la expresión de NFATc1 en estroma uterino. NFATc1 se traslocó al núcleo celular en respuesta al estímulo con Plo, y dicha traslocación se inhibió con CsA. La transcripción de ARNm de COX-2 se indujo por Plo y, de modo Cn dependiente, por Ang, en útero de rata no gestante y a los 4 días de gestación. Sin embargo, por *western blot* se observó la inducción de la expresión de la proteína COX-2 únicamente a los 4 días de gestación, expresión que no se incrementó cuando las células fueron estimuladas, ni se inhibió con CsA. Conclusiones: La ruta Cn/NFAT se activa por señales de calcio en útero de rata. La transcripción del ARNm de COX-2 en estroma puede inducirse por estímulos que incrementan los niveles de calcio intracelular, de manera dependiente de Cn. La falta de correlación entre la transcripción de ARNm y la expresión de COX-2 podría deberse a la existencia de mecanismos post-traduccionales de estabilización de la proteína, independientes de Cn.

372 (447) HUMAN PSG1A INDUCES, DIRECTLY AND THROUGH THE INDUCTION OF TH17 CELLS, THE PROANGIOGENIC FACTORS IL-6 AND VEGF IN JEG-3 CHORIOCARCINOMA CELL LINE. Martínez F.¹; Knubel C.²; Motran C.³

CIBICI CONICET^{1 2 3} <tanano_@hotmail.com>

Trophoblast cells display an exceptional capability: they physiologically invade into the surrounding tissue. This capability is widely associated with tumours, and, indeed, the invasive behaviour of both is rather similar. The proangiogenic factors IL-6, TGF- β and vascular endothelial growth factor (VEGF) have been implicated in the process of proper placental development. Besides, recently IL-17 has been shown to induce neovascularization and the production of proangiogenic molecules in tumours through an IL-6-Stat3 signalling pathway. Pregnancy-specific glycoproteins (PSG) are a family of highly similar proteins synthesized in large amounts by the placental syncytiotrophoblast. We have demonstrated that PSG1a, the major variant of PSG polypeptides, has immunoregulatory functions due to her ability to modulate macrophages and dendritic cells (DC) cytokine secretion. Treatment of murine DC with recombinant PSG1a induces IL-6 and TGF- β secretion. In addition, during an *in vitro* OVA peptide-restricted assay, PSG1a-treated DC exhibit a capacity to prime CD4⁺ T cells from DO11.10 transgenic mice to produce IL-4, IL-5, IL-10 and IL-17. The aim of this work was to investigate whether PSG1a as well as IL-17 can modulate the IL-6-Stat3 proangiogenic pathway in trophoblast cells. Human PSG1a as well as human IL-17 were able to induce IL-6 ($P < 0.05$) secretion and STAT-3 phosphorylation in Jeg-3 cells, although they did Stat-3 activation with significantly different kinetics (1 h for PSG1a and 6 h for IL-17). Similarly, we found that PSG1a and IL-17 induced VEGF up-regulation at 6 and 24 h respectively. In addition, levels of PSG1a and IL-17 positively correlated with IL-6 secretion, Stat3 activity and VEGF expression in trophoblast cells. PSG1a can thus

promote, directly and through the induction of Th17 cells, trophoblast invasion.

373 (828) INCREASED mRNA LEVELS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND TLR/NFKB PATHWAY MOLECULES IN RESPONSE TO CHLAMYDIA TRACHOMATIS INFECTION IN CD45- CELLS FROM PROSTATE. Mackern Oberti J.¹; Breser M.²; Motrich R.³; Maccioni M.⁴; Rivero V.⁵

CIBICI CONICET Facultad de Ciencias Químicas UNC^{1 2 3 4 5} <jpmackern@fcq.unc.edu.ar>

Prostatitis is a common disease being *Chlamydia trachomatis* (CT) one of the common pathogens associated with it. Despite of a lot of work focusing on mucosal chlamydial infection, little is known about how the prostate cells could respond to this infection. We have previously reported that Primary Prostatic Cell cultures (PPEC) expressing different classic markers of epithelial cell (cytokeratin in 80%) and also leukocyte markers (CD45 in 2-5%) and respond to CT infection with the release of many inflammatory components such as IL8, MIP1a and MCP1. The aim of the present work was to analyze the response of CD45 negative PPEC and CD45 positive cells to CT infection studying the expression of different Toll-Like Receptor Signaling genes using a PCR Array kit. The expression of 84 genes related to TLR-mediated signal transduction, including adaptors and proteins that interact with toll-like receptors, effectors, members of the NFKB, JNK/p38, NF/IL6, and IRF signaling pathways were analyzed by real-time PCR. Prostate CD45 negative and CD45 positive cells were sorted with MACS using anti CD45 conjugated with magnetic beads. CT infection of CD45 positive cells induced mRNA upregulation of several genes as MCP1 (fold up regulation change of 22 times), CSF2(145), CSF3(10800), IP10(217), IL1a(107), IL1b(80), IL1r1(10), IL6(60), IFN β 1(116), TNF(14), IL10(20), CD86(22), IRAK2(9), Eif2ak2(20), Ptgs28(190), TLR3(8). On the other hand CT infection of primary prostatic CD45 negative induced the upregulation of MCP1(22), CSF3(13), IP10(14), MAPKK4(4), MAPKK8ipr3(4), Nfkbib(77), Nfrkb(175), Pglyrp1(7), Rela(800), Tbk1(90), TLR3 (13), Tnfaip3(5), Tollip(11). These results demonstrate that epithelial cells and leukocytes respond in a different way in response to CT infection and suggest that resident non-leukocyte cells may play an important role in local chlamydial infection upregulating proinflammatory genes and modulating innate immune response of resident leukocytes.

374 (126) MIFEPRISTONE (RU486) RESTAURA LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS POR ENDOTOXINAS BACTERIANAS. Rearte B.¹; Maglioco A.²; Balboa L.³; Laborde E.⁴; Landoni V.⁵; Chiarella P.⁶; Fernández G.⁷; Isturiz M.⁸

ILEX-CONICET Academia Nacional de Medicina^{1 2}; IIHema- Academia Nacional de Medicina³; ILEX-CONICET Academia Nacional de Medicina^{4 5 6}; ILEX-CONICET Academia Nacional de Medicina; IIHema- Academia Nacional de Medicina^{7 8} <barbararearte@yahoo.com.ar>

Los fenómenos sépticos dan una respuesta inflamatoria seguida por otra antiinflamatoria que puede concluir en inmunosupresión. El 50% de las sepsis se debe a infecciones por Gram (-), cuyos lipopolisacáridos de membrana (LPS) son causa de la inflamación y, eventualmente, de la inmunosupresión, siendo ésta una causa de mortalidad en fases tardías de las sepsis. Un evento relevante en las sepsis es la tolerancia a LPS, definida por una capacidad reducida del huésped para producir citoquinas inflamatorias luego de un primer encuentro con LPS y capaz de generar inmunosupresión. En trabajos previos demostramos que tratando ratones tolerantes con RU486, antagonista de receptores de glucocorticoides (GC), se genera una desarticulación de la tolerancia. Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del RU486 sobre la respuesta inmune en ratones inmunosuprimidos (IS) por LPS. Para ello, ratones BALB/c fueron tratados con dosis crecientes de LPS durante 13 días. Luego, fueron tratados con RU486 e inmunizados con glóbulos rojos ovinos. Al 7^o

día se evaluaron parámetros de inmunosupresión y la respuesta inmune por hemaglutinación y citometría. Así, esplenocitos CD11b+ mostraron una disminución en la expresión de MHC-II y TLR4 en ratones IS con respecto a controles (C), evaluado por intensidad de fluorescencia media (MFI) (C: MHCII = 317±28; TLR4= 16±2 vs IS MHCII=153±16; TLR4= 6±1; p<0.05). Para evaluar fagocitosis/ asociación se determinó el "binding" de zimosán-FITC (Zy). Los resultados muestran disminución en el % de células CD11b+/ Zy+ en ratones IS (C: 21,2±3% vs IS: 11±1%; p<0.05). Aunque el tratamiento con RU486 no dio restauraciones de esos parámetros, sí la hubo en la respuesta inmune humoral (IS =3.5±0.9% del C vs IS+RU486 =26.3±6%; p<0.01). Conclusión: el RU486 restaura parcialmente la respuesta inmune humoral a nivel de anticuerpos IgM e IgG, hecho auspicioso que permitirá desarrollar estrategias que normalicen la respuesta inmune en sepsis tardías.

375 (820) MACROFAGOS ALVEOLARES Y ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS CASTRADAS. Biaggio V.¹; Garay P.²; Caballero N.³; Gomez N.⁴; Gimenez M.⁵

Universidad Nacional de San Luis; Laboratorio de Biología Molecular; CONICET; IMIBIO^{1 2 3 4 5} <vbiaggio@gmail.com>

Existen evidencias que indican que el estrés oxidativo juega un rol clave en la patofisiología pulmonar. Además, los macrófagos alveolares (MAS) tienen un rol central en la respuesta inflamatoria, estas células poseen receptores para los esteroides gonadales, lo que contribuiría a regular sus funciones. La Testosterona (T) disminuye la actividad de SOD, CAT y Gpx favoreciendo la liperoxidación (Chainy, 1994), asimismo la T produce un ambiente pro-oxidante (Tam, 2003). Estudios previos con 21 días de castración, demostraron un microambiente oxidativo en pulmón (Gómez y col.; 2003). Teniendo en cuenta estos antecedentes investigamos el efecto de 2 meses de castración en los MAS del BAL, especialmente cambios en la expresión de las enzimas antioxidantes. Se utilizaron ratas Wistar macho de (200 ± 20g), separadas en un lote Control (Co) y un lote castrado (Ca), ambos grupos se sacrificaron a los 60 días. Se extrajo suero y se determinó T. A partir de uno de los lóbulos del pulmón se investigó liperoxidación cuantificando las sustancias reactivas al Acido Tiobarbitúrico (TBAR'S). Para determinar las enzimas antioxidantes se partió de otro lóbulo se extrajo ARN total y se amplificó por PCR, usando B-actina como gen control. Se realizaron extendidos del BAL, los cuales se tiñeron con Giemsa. Testosterona disminuye significativamente (p<0.01) y los TBAR'S muestran una tendencia a aumentar en el grupo Ca, sin ser significativos. A su vez, la expresión de SOD, CAT y GPx no varió significativamente en Ca respecto Co, como también los niveles de ARN de TNF α y PPAR γ . El incremento de macrófagos presentes en BAL (78%) nos estaría indicando un probable estado prooxidante que no llegaría a modificar la expresión de las enzimas antioxidante, con este tiempo de tratamiento.

376 (61) CURCUMINA (CUR) MODIFICA LA ACTIVIDAD DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MAESTROS DE LINFOCITOS T. Castro C.¹; Barcala Tabarozzi A.²; Liberman A.³; Dewey R.⁴; Arzt E.⁵; Perone M.⁶

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, UBA, IFIBYNE-CONICET^{1 2 3}; Instituto Tecnológico De Chascomus (IIB-INTECH) CONICET-Universidad Nacional de Gral. San Martín⁴; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEyN, UBA, IFIBYNE-CONICET^{5 6} <carlonacastro@gmail.com>

Los linfocitos T CD4⁺ pueden clasificarse en T helper (Th) 1 y Th2. Los linfocitos Th1 secretan citoquinas proinflamatorias, están involucrados en la inmunidad celular y su activación descontrolada promueve desórdenes autoinmunes, como la diabetes tipo 1. Las células Th2 secretan citoquinas antiinflamatorias y median la inmunidad humoral. El empleo de agentes inmunomoduladores in vivo ha demostrado cambiar el balance Th1/Th2 y proteger de desórdenes autoinmunes. Cur es un potente anti-oxidante, anti-

tumoral y anti-inflamatorio, inhibe la expresión de IL2, IFN γ e IL12 a nivel de mRNA y proteína, en células T y macrófagos. Estudiamos el efecto de Cur en la proliferación y apoptosis de células T activadas, y en la actividad transcripcional de factores de transcripción maestros de linfocitos T como T-bet y GATA-3, claves para la diferenciación Th1 y Th2, respectivamente. Se utilizaron células T purificadas de bazo (NOD), activadas y tratadas con 5-20 μ M Cur y controles. Se cuantificó la incorporación de ³[H]TdR y apoptosis (AnnexinV⁺). La actividad transcripcional de GATA-3 y T-bet fue estudiada en células EL-4 (linfoma T murino) mediante transfecciones transientes de un plásmido que codifica cDNAs de los elementos de respuesta (ER) de GATA-3 y T-bet clonados río arriba del gen reportero de la luciferasa. También, determinamos la actividad de promotores de IL-5 (Th2) e IFN- γ (Th1). Cur inhibió la proliferación in vitro de células T (NOD) y de esplenocitos (NOD) (90%, p<0.05). Cur 20iM aumentó la apoptosis de células T (30 % vs ctrl). Cur (10iM) disminuyó la actividad transcripcional de T-bet sobre sus ER (60%, p<0,02) y sobre el promotor de IFN γ (70%, p<0,05). Cur no modificó la actividad transcripcional de GATA-3 sobre sus ER vs ctrl. Sin embargo, aumentó la actividad de GATA-3 sobre el promotor de IL-5 (34%, p<0,05). Cur podría emplearse como agente inmunoregulador para el tratamiento de desórdenes autoinmunes induciendo cambios en el perfil Th1/Th2.

377 (607) BENZNIDAZOL ACTÚA COMO UN INHIBIDOR ESPECÍFICO DE AMPLIO ESPECTRO SOBRE LA VÍA DE ACTIVACIÓN DE NF-KB EN CÉLULAS RAW 264.7. Manarin R.¹; Pascutti M.²; Ruffino J.³; De Las Heras B.⁴; Boscá L.⁵; Bottasso O.⁶; Revelli S.⁷; Serra E.⁸

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina; Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.^{1 2}; Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.³; Departamento de Farmacología, Fac. de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.⁴; Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.⁵; Instituto de Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.^{6 7}; Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR)-CONICET, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina⁸ <romimamarin@yahoo.com.ar>

Previamente, hemos demostrado que Benznidazol (BZL), conocido por su acción tripanocida sobre *T. cruzi*, posee propiedades anti-inflamatorias e inhibe a NF- κ B. Este factor de transcripción normalmente se encuentra en el citoplasma unido a proteínas inhibitoras (I κ B), sin embargo, ante un estímulo, IKK lo fosforila y permite que NF- κ B migre al núcleo, donde regula numerosos procesos celulares, entre los que se encuentra la respuesta inflamatoria. En el presente trabajo se estudió el mecanismo molecular por el cual BZL ejerce su acción inhibitoria sobre NF- κ B en células RAW 264.7 estimuladas con LPS. Se demostró que los efectos inhibitorios del compuesto sobre el mediador NO eran modulados por la cantidad de NOS-2 a nivel transcripcional, mientras que la actividad de la NOS-2 no fue modificada por BZL. Además, BZL no inhibió a otros marcadores típicos de activación de macrófagos como son la fagocitosis, expresión de MHC-II o producción de especies reactivas del oxígeno por la NADPH oxidasa. BZL fue capaz de interferir específicamente con la activación de la vía de NF- κ B sin afectar la de otro factor relacionado como es AP-1. Este fenómeno inhibitorio no sólo se observó en la activación mediada por LPS, sino también cuando se utilizaron otros estímulos, como por ejemplo IL-1b, FNT-a, PMA o H₂O₂. También se observó que el tratamiento con BZL inhibe la fosforilación de I κ Ba y por lo tanto su degradación, mientras que no bloqueó la fosforilación de IKKa/b. Finalmente, se observó que BZL retrasó la activación de la MAPK p38, pero no afectó la de ERK1/2 ni JNK. De estos resultados se concluye que BZL se comporta como un inhibidor de amplio espectro específico para la activación de NF- κ B al interferir con varios puntos de la vía de señalización y

además, este trabajo soporta la idea que BZL podría ser potencialmente útil para tratar desordenes inflamatorios.

378 (309) PERFIL DE ACTIVACIÓN DE MACRÓFAGOS DE RATONES NOD FRENTE A CÉLULAS APOPTÓTICAS Y SU MODULACIÓN POR EL PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP). Hauk V.¹; Azzam S.²; Calafat M.³; Larocca L.⁴; Fraccaroli L.⁵; Ramhorst R.⁶; Pérez Leirós C.⁷

Laboratorio de Inmunofarmacología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.^{1 2 3 4 5 6 7} <vchauk@qb.fcen.uba.ar>

Los macrófagos tienen un papel central en la homeostasis tisular por su función fagocítica para la remoción de células apoptóticas con generación de mediadores anti-inflamatorios como IL-10. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) ofrecen un modelo interesante para estudiar procesos de mantenimiento y ruptura de la homeostasis tisular que conducen a pérdida de tolerancia y autoinmunidad. El neuropéptido VIP tiene un potente efecto anti-inflamatorio, proTh2 y Treg. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta de los macrófagos peritoneales de ratones NOD frente a estímulos fagocíticos: timocitos apoptóticos y acinos NOD de 16 semanas de edad que presentan apoptosis y el efecto de VIP (10-7M) en ambos casos. Se emplearon hembras de 16 semanas. Se realizaron co-cultivos con timocitos y acinos apoptóticos aislados. Se estudió la función fagocítica y señales intracelulares asociadas por microscopía electrónica, confocal y TUNEL. La producción de IL-10 se midió por ELISA y nitratos por Griess. Se observó que los macrófagos NOD presentan translocación basal de p65 (NFκB), VIP inhibió la translocación del factor inducida por el co-cultivo con timocitos apoptóticos en ambas cepas. El co-cultivo de acinos NOD con macrófagos aumentó la producción de nitratos sólo en macrófagos NOD ($\mu\text{M}/10^6$ células X±ES; NOD: $10 \pm 1,1$; NOD+acinos: $25 \pm 2,5$, $P < 0,05$) y no indujo producción de IL-10 como en ratones BALB/c ($\text{ng}/10^6$ células X±ES; BALB/c: $1,2 \pm 0,1$; BALB/c+acinos: $3,9 \pm 0,4^*$; NOD: $1,3 \pm 0,5$ NOD+acinos: $2,1 \pm 0,5$ * $P < 0,05$ vs basal BALB/c). La incubación con VIP aumentó la producción de IL-10 en macrófagos NOD. Los resultados indican activación basal de NFκB en los macrófagos NOD y producción de mediadores proinflamatorios y menor IL-10 frente a células apoptóticas con un efecto anti-inflamatorio del VIP.

379 (414) ROL DE LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE PD-L1 EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA PORPHYROMONAS GINGIVALIS. Alvarez I.¹; Gliosca L.²; Maccarone G.³; De Nastri A.⁴; García V.⁵

*Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina*¹; *Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Argentina*^{2 3 4}; *Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina*⁵ <ivanabelenalvarez@yahoo.com.ar>

Porphyromonas gingivalis (Pg) causa el 95% de las periodontitis agudas y crónicas, enfermedades asociadas a lesión inflamatoria. La enfermedad periodontal sólo se presenta si hay respuesta inmune del individuo y según el fenotipo de respuesta Th, ésta resultará beneficiosa o perjudicial contra Pg. Una fuerte respuesta innata frente a las bacterias de la placa producida por células NK y liberación de IFN-γ induce respuesta beneficiosa para el huésped. Así, es fundamental conocer los mecanismos inmunológicos participantes en la generación de protección contra Pg. PD-L1, receptor de células NK, NKT, LT, monocitos, es una molécula de señalización inhibitoria en la respuesta adaptativa y poco se conoce su rol en la respuesta innata. Se reportó que el LPS de Pg aumenta PD-L1 en células presentadoras de antígeno induciendo tolerancia. Aquí, investigamos la expresión/función de PD-L1 en la respuesta inmune de individuos sanos frente a un sonicatedo de la bacteria completa (Pg). Al estimular células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con Pg y evaluar la expresión de PD-L1 por citometría de flujo, observamos que el antígeno incrementó significativamente la expresión de PD-L1 en LT, NK, NKT y monocitos (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$;

** $p < 0,01$; ** $p < 0,01$, respectivamente comparado con medio, Test de Wilcoxon). Como el IFN-γ es crucial para generar un ambiente Th1 protector contra Pg evaluamos su producción luego de estimular CMSP con Pg. La estimulación antigénica a diferentes tiempos aumentó significativamente la producción de IFN-γ (* $p < 0,05$ test de Wilcoxon). Evaluamos la modulación de la producción de IFN-γ bloqueando con anticuerpos específicos anti-PD-L1 y analizando la producción de la citoquina por ELISA. La estimulación con Pg + anti-PD-L1 indujo una mayor secreción de IFN-γ comparada con Pg sola (* $p < 0,05$ test de Wilcoxon). Así, PD-L1 participaría en la inducción de tolerancia contribuyendo a la evasión del sistema inmune por Pg en lesiones periodontales.

380 (762) COMPARACION DE NIVELES DE INTERFERON-GAMMA E INTERLEUQUINA-17 EN LIQUIDOS SINOVIALES DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDEA Y ESPONDILOARTROPATIAS. Lacoste M.¹; Ledezma C.²; Larrea C.³; Cañelas A.⁴; Ruiz B.⁵; Ramis E.⁶; Tamashiro H.⁷; Blas R.⁸; Di Genaro M.⁹

Inmunología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis; Laboratorio de Inmunopatología, IMIBIO-SL (CONICET-UNSL), San Luis^{1 2}; *Inmunología, Universidad Católica de Cuyo, Hospital Dr. Guillermo Rawson, San Juan*^{3 4 5 6}; *Diagnosis, San Luis*⁷; *Medici, San Luis*⁸; *Inmunología, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis; Laboratorio de Inmunopatología, IMIBIO-SL (CONICET-UNSL), San Luis*⁹ <gabnela@unsl.edu.ar>

Citoquinas pro-inflamatorias cumplen roles centrales en las artropatías. Interleuquina IL-17, producida por células T colaboradoras (Th17), tendría un papel central. Por otra parte, interferón-gamma (IFN-γ), citoquina Th1, ha sido asociado al desarrollo de artritis reumatoidea (AR), y regularía a células Th17. Sin embargo, datos sobre las concentraciones de citoquinas Th1 y Th17 en líquidos sinoviales (LS) de pacientes con artropatías son limitados y controvertidos. El objetivo del trabajo fue comparar los niveles de IFN-γ e IL-17 en LS de pacientes con AR, espondiloartropatías (SpA) y osteoartritis (OA) de nuestra región. Se obtuvieron 58 LS: 33 de pacientes con AR (edad promedio: 55 ± 14), 11 con SpA (edad promedio: 33 ± 16) y 14 con OA (edad promedio: 63 ± 10). Se analizaron los niveles de IFN-γ e IL-17 empleando kits de ELISA. Se observó un mayor número de LS con niveles detectables de IFN-γ en AR (97%), comparado con SpA (64%) y OA (71%) (Fisher, $P < 0,05$). En cuanto a las concentraciones promedio de IFN-γ, también se observó un aumento de esta citoquina en LS de AR (media±error estándar: $32,3 \pm 8,1$ pg/ml) vs SpA ($14,5 \pm 6,4$ pg/ml) y OA ($11,3 \pm 3,4$ pg/ml) (Mann-Whitney, $P < 0,05$). Cuando se analizaron los niveles de IL-17, se observó mayor frecuencia de LS con niveles detectables de esta citoquina en LS de AR (64%) y SpA (64%) comparada con OA (7%) (Fisher, AR vs OA $P < 0,001$; SpA vs OA $P < 0,01$). Se observó un incremento significativo en la concentración de IL-17 en LS de AR (media±error estándar: $12,7 \pm 3,7$ pg/ml) y SpA ($6,4 \pm 2,5$ pg/ml) vs OA ($0,4 \pm 0,4$ pg/ml) (SpA vs OA $P < 0,05$; AR vs OA $P < 0,01$). Teniendo en cuenta que IL-17 marcó la diferencia entre SpA y AR, con respecto a OA, se concluye que esta citoquina cumpliría un rol importante en la inmunopatogenia de ambas artropatías, siendo IFN-γ una citoquina central en la respuesta inflamatoria, especialmente en AR. Estudios de la regulación de citoquinas contribuirían al desarrollo de nuevas terapias.

NEFROLOGIA 1

381 (203) EXPRESIÓN RENAL Y EXCRECIÓN URINARIA DEL COTRANSPORTADOR SODIO-DICARBOXILATO 1 (NADC1) EN RATAS CON COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA. Brandoni A.¹; Torres A.²

Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario; CONICET.^{1 2} <anabelbrandoni@gmail.com>

La proteína cotransportadora sodio/dicarboxilato 1 (NaDC1) se expresa en riñón, principalmente en la membrana apical de células del túbulo proximal. Este cotransportador es importante en la reabsorción de los intermediarios del ciclo de Krebs presentes en el filtrado glomerular. Además, a partir de estudios realizados en nuestro laboratorio se ha podido demostrar, por primera vez, la presencia de NaDC1 en orina. Es poco lo que se conoce acerca de la regulación de este transportador, especialmente en estados patológicos. El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la expresión renal y excreción urinaria de NaDC1 en ratas con colestasis extrahepática (CEH) de 21h (n=4). Se procesó, además, un grupo de ratas Sham (S, n=4). Se evaluó la abundancia (%) de NaDC1 en tejido renal (en homogenados corticales (h) y en membranas apicales (m)) y en orina (o), mediante electroforesis y Western blotting. La abundancia de NaDC1 en orina se expresó en relación a los niveles urinarios de creatinina. NaDC1 (h): S= 100 ± 1, CEH= 98 ± 2; NaDC1 (m): S= 100 ± 4, CEH= 50 ± 4*; NaDC1 (o): S= 100 ± 4, CEH= 161 ± 9* (*p<0.05). La hipocitraturia está asociada con un aumento en el riesgo de formación de cálculos renales, y la expresión renal aumentada de NaDC1 se ha correlacionado a una disminución en la excreción de citrato urinario y a la aparición de nefrolitiasis. El aumento de la excreción renal de NaDC1 y la disminución de su expresión en membrana apical en ratas con colestasis extrahepática contribuirían a mantener niveles elevados de citrato en orina y así disminuir la probable formación de cálculos renales. Ésto sería de especial importancia en este modelo de colestasis extrahepática, de manera tal de evitar una posible obstrucción de las vías urinarias, las cuales en estas ratas son, además, fundamentales para la eliminación de los compuestos biliares acumulados en sangre.

382 (290) AQP2 EN EL MODELO DE HIPERTENSIÓN PORTAL EXPERIMENTAL POR LIGADURA DE LA VENA PORTA.

Majowicz M.¹; Roselló D.²; Albertoni Borghese M.³; Tallis S.⁴; Delfante A.⁵; Vidal N.⁶; Perazzo J.⁷

Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹; Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA²; Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA³; Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA⁴; Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA⁶; Cátedra de Fisiopatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA⁷ <mmajow@ffybu.uba.ar>

La ligadura parcial de la vena porta (VP) constituye un modelo experimental para estudiar la hipertensión portal (HP) prehepática en ratas. En este modelo se demostró la presencia de alteraciones a nivel del SNC, sin embargo se conoce poco acerca de las posibles alteraciones a nivel renal. Los cambios en la circulación portal hepática producidos por la HP disparan un reflejo hepato-renal, que lleva a la disminución de la excreción de sodio y agua y en consecuencia a una retención de fluidos. El objetivo del trabajo fue estudiar la expresión de AQP2 en las diferentes zonas del riñón en este modelo de HP experimental para determinar si AQP2 podría participar promoviendo la retención de líquido o bien desencadenando algún mecanismo de tipo compensatorio. Se usaron ratas wistar machos de 250-300g. La HP se indujo mediante la ligadura parcial de la VP durante 14 días (H14). Como control se usó un grupo con operación simulada o sham (Sh). Las ratas se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los riñones, separando corteza (Co), médula (M) y papila (P) y homogeneizando con un buffer. Las proteínas de las muestras se separaron por electroforesis y transfirieron a membranas de PVDF para detectar AQP2 por western blot. Se cuantificó la densidad óptica de las bandas y se usó β-actina como control de carga. Los resultados se expresan como % respecto del control, tomando éste como 100%. La expresión de AQP2 no se modificó ni en Co ni en M, mientras que disminuyó en P a expensas de la forma no glicosilada. Co: Sh = 99,99 ± 5,48, H14 = 109,43 ± 7,36; M: Sh = 100 ± 5,99, H14 = 90,73 ± 6,18; P: Sh = 100 ± 6,99, H14 = 74,34 ± 6,60**. **p<0,01 vs Sh, n=6. La menor expresión de AQP2 en

la P renal de los animales H14 sería un efecto compensatorio para disminuir la retención de fluidos. La disminución de AQP2 podría deberse a una menor síntesis de la proteína o a una mayor degradación debida a la menor estabilidad de la forma no glicosilada.

383 (320) EXPRESIÓN DE AQP2 EN DIFERENTES ZONAS DEL RIÑÓN DE RATAS CON DIABETES EXPERIMENTAL. Ortiz M.¹; Albertoni Borghese M.²; Passalacqua M.³; Balonga S.⁴; Vidal N.⁵; Majowicz M.⁶

Cátedra de Biología Celular y Molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA^{1 2 3 4 5 6} <mortiz@ffybu.uba.ar>

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica asociada con diuresis osmótica y natriuresis. AQP2 es un canal para agua, presente en las células principales de los túbulos colectores (TC) renales y es el principal blanco para la regulación de la permeabilidad de los TC mediada por vasopresina. El objetivo del trabajo fue estudiar la expresión de AQP2 en la diabetes experimental, dado que existe bibliografía contradictoria al respecto. Se utilizaron ratas wistar machos de @300g. La diabetes se indujo mediante una inyección i.p. de 70 mg/Kg de estreptozotocina (STZ). Los controles (C) se inyectaron con buffer citrato. Los animales se estudiaron a los 3, 7 y 15 días (D3, D7 y D15). Luego del sacrificio se extrajeron los riñones, separando corteza (Co), médula (M) y papila (P), y se homogeneizaron con un buffer. Las proteínas de las muestras se separaron electroforéticamente y transfirieron a membranas de PVDF para detectar AQP2 por Western blot. Se cuantificó la densidad óptica de las bandas y se usó β-actina como control de carga. Los resultados se expresaron como % respecto del control, tomando éste como el 100%. La expresión de AQP2 disminuyó tanto en Co como en M (a expensas de la forma no glicosilada), mientras que aumentó en P (a expensas de la forma glicosilada). Co: C = 100 ± 1,2, D3 = 9,9,40 ± 6,29, D7 = 73,38 ± 3,36*, D15 = 63,99 ± 7,01**; M: C = 100±0,77, D3 = 74,17±1,76**; D7 = 79,87 ± 0,87**, D15 = 71,06±6,10**; P: C = 100±6,72, D3 = 151,45 ± 13,73*#; D7 = 142,84 ± 11,57*#, D15=98,03±5,39. *p<0,05 vs C; ** p<0,01 vs C; # p<0,05 vs D15; n=4. La disminución de AQP2 a nivel de Co y M renal contribuiría, al menos en parte, a la poliuria característica de la DM. Sin embargo, a nivel de la P renal se manifiesta de manera temprana (D3 y D7), un efecto compensatorio que con el tiempo dejaría de operar. El patrón de glicosilación en las diferentes zonas del riñón sería importante para la estabilidad de AQP2.

384 (411) PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO 20-HIDROXIEICOSATETRAÉNICO (20HETE) EN LA REGULACIÓN DE LA EXCRECIÓN FRACCIONAL DE SODIO PROXIMAL (EFNAP) Y DISTAL (EFNAD) SECUNDARIA A LA EXPANSIÓN DEL VOLUMEN EXTRACELULAR (VEC) EN RATAS HIPOTIROIDEAS (TX). Sánchez Alberti A.¹; Gurevich J.²; Gonzalez D.³; Roman R.⁴; Nowicki S.⁵

CEDIE-CONICET^{2 3}; Kidney Disease Center, Medical College of Wisconsin⁴; CEDIE-CONICET⁵ <snowicki@cedie.org.ar>

Demostramos previamente una mayor expresión del mRNA del CYP4A2 en células aisladas del túbulo contorneado proximal (cTCP) de ratas Tx; y que el 20HETE, un producto del metabolismo del Ácido Araquidónico (AA) por el Citocromo P450 4A (CYP4A), participa en la mayor EFNa secundaria a la expansión del VEC observada en ratas Tx. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del hipotiroidismo sobre la actividad y la expresión proteica del CYP4A en cTCP, y sobre la EFNa y EFNa secundaria a la expansión del VEC. Se estudiaron ratas macho de 8 semanas, controles (C), Sham y Tiroidectomizadas (Tx). La actividad del CYP se analizó en cTCP según la producción de 20HETE a partir del AA, y su expresión por Western Blot. La actividad del CYP fue semejante entre los distintos grupos (ng 20HETE/0,5 mg de proteína 60 min: C 274±28; Sham 284±23; Tx 215±6, n= 2-4), a pesar de una mayor expresión de la proteína en cTCP de las ratas Tx. La EFNa y EFNa se diferenciaron

mediante el Clearance de Lito en ratas anestesiadas. Se estudiaron los períodos basal, expansión (Exp, 5%, NaCl 0.9%, 60 min), y recuperación (Recup). No se observaron cambios en la EFNa₃ entre los grupos en ningún período. En cambio, la EFNa₃ fue mayor en ratas Tx en todos los tiempos (Basal: C 0,3±0,1*; Sham 0,4±0,1*; Tx 4,6±1,9; Exp: C 5,9±0,3*; Sham 6,3±1,4* Tx 14,0±2,0; Recup: C 5,5±1,0*; Sham 5,7±2,4*; Tx 14,1±1,4; n=2-5). * p< 0.05 vs Tx.. El reemplazo de ratas Tx con T3 (5ug/Kg 7 días, Tx+T3), o la inhibición del CYP (ABT, 50 mg/Kg, Tx +ABT) revirtió la EFNa₃ de las ratas Tx a los valores controles (Tx+T3 y Tx+ABT p< 0.05 vs Tx. en todos los períodos, n=4-5). En conclusión, en las ratas Tx no pudimos demostrar un rol del 20HETE en la regulación de la EFNa₃, lo cual se sustenta con la similar actividad del CYP en cTCP de ratas C y Tx. En cambio, la disminución de la EFNa₃ por el ABT indica la participación del 20HETE en la regulación de la reabsorción de Na en segmentos distales del nefrón de ratas Tx.

385 (437) INSUFICIENCIA RENAL AGUDA POR COLINA-DEFICIENCIA Y PROSTANOIDEOS. Ossani G.¹; Puyó A.²; Monserrat A.³; Peredo H.⁴

Centro de Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires¹; Cátedra de Anatomía e Histología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.²; Centro de Patología Experimental, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires³; Cátedra de Farmacotecnia 1. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires; CONICET⁴ <georginaossani@gmail.com>

La colina forma parte o es la precursora de compuestos de importancia fisiológica. Ratas macho recién destetadas, alimentadas con dieta colina-deficiente (CD), con aceite de maíz (AM) como lípido, desarrollan dentro de los 7 días de iniciada la alimentación carencial, insuficiencia renal aguda. La patogenia es controvertida, proponiéndose como mecanismos el vasoespasmó y la lesión tubular primaria. El aceite de pescado (AP) tiene un notorio efecto protector en este modelo. El rol de los prostanoideos (P) en la regulación del sistema vascular renal es reconocido. El riñón es importante en la síntesis de los P y éstos podrían jugar un rol en el efecto protector del AP. Ratas Wistar macho, recién destetadas, fueron divididas en 4 grupos, n=4 (CD y suplementadas -CS-, con AM o AP como lípidos) y sacrificadas al día 4 (sin lesión morfológica renal) y 7 (con y sin necrosis renal en el grupo CD con AM). Se determinaron: 6-cetoPGF1 α , TXB2, PGF2 α y PGE2 mediante cromatografía líquida de alta presión. Los resultados se analizaron estadísticamente con un test no paramétrico. Sólo las ratas CD, con AM, sacrificadas el día 7 mostraron necrosis renal. Todos los P resultaron más bajos en las ratas alimentadas con AP, independientemente de la colina (p<0.05) (Tablas 1 y 2, ng de P por mg de tejido renal). Este efecto se acentuó al día 7. Los ácidos grasos aportados por el AP podrían derivar la síntesis de P hacia la serie 3, ejerciendo la PGI3 igual efecto vasodilatador que la de la serie 2 y el TX de la serie 3 menor efecto vasoconstrictor que el de la serie 3, pudiendo esto justificar el efecto protector del AP; otra posibilidad son los cambios en la composición lipídica de la membrana celular.

Día 4	PG ceto F1 α	TXB2	F2 α	E2
CD + AM	0,635	2,923	0,260	2,748
CS + AM	1,415	6,083	0,713	0,883
CD + AP	0,693	2,575	0,010	1,243
Día 7	PG ceto F1 α	TXB2	F2 α	E2
CD + AM	1,280	4,583	0,940	2,095
CS + AM	1,788	8,093	2,680	0,958
CD + AP	0,033	0,008	0,008	0,048
CS + AP	0,010	0,775	0,003	0,148

386 (475) EXPRESIÓN RENAL Y EXCRECIÓN URINARIA DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS 5 (OAT5) EN RATAS TRATADAS CON CLORURO MERCÚRICO.

Di Giusto G.¹; Torres A.²

Area Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.¹; Area Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario.; CONICET.² <giseladg@hotmail.com>

El mercurio inorgánico es un conocido tóxico ambiental que se acumula en las células del túbulo proximal produciendo insuficiencia renal. Oat5 es un transportador de aniones orgánicos presente en membrana apical del túbulo proximal. Esta proteína también se detecta en orina según estudios recientes realizados en nuestro laboratorio (*J Histochem Cytochem*, 2009). El objetivo de este trabajo consistió en estudiar la expresión renal y la excreción urinaria de Oat5 en ratas tratadas con cloruro mercúrico (HgCl₂). Se evaluó la excreción urinaria de Oat5 (or) mediante Western blotting en comparación con la actividad de fosfatasa alcalina en orina (For, parámetro indicativo de daño renal) relacionando ambas variables con los niveles de creatinina urinaria (Cr). También se estudió la expresión renal de Oat5 en homogenados (H) y en membranas apicales (M) mediante Western blotting e inmunohistoquímica. Se usaron ratas Wistar macho adultas tratadas 18 hs previas a los experimentos con diferentes dosis de HgCl₂: 0(C,n=4), 0.2(Hg0.2,n=4), 1(Hg1,n=4), 5(Hg5, n=4) mg/kg p.c., s.c.).

	C	Hg0.2	Hg1	Hg5
Oat5 or(%)	100±5	189±22 ^{a,c,d}	246±15 ^{a,b,d}	332±17 ^{a,b,c}
For(Ul/mg Cr)	0.23±0.025	0.25±0.03 ^d	0.22±0.01 ^d	14.38±0.99 ^{a,b,c}
Oat5 H(%)	100±7	70±4 ^{a,c,d}	53±1 ^{a,b,d}	33±2 ^{a,b,c}
Oat5 M(%)	100±1	106±6 ^d	120±15 ^d	66±6 ^{a,b,c}

ANOVA y Newman-Keuls (P< 0.05) a vs C, b vs Hg0.2, c vs Hg1, d vs Hg5.

Los estudios de inmunohistoquímica corroboraron los resultados obtenidos con Western blotting. Se observó, además, una buena correlación de los siguientes parámetros: Oat5 or vs dosis de Hg (r=0.88), Oat5 H vs dosis de Hg (r=0.83) y Oat5 or vs Oat5 H (r=0.99). El aumento de la excreción urinaria de Oat5 en asociación con la disminución de su abundancia en homogenados indicaría un aumento en la vía de liberación específica de Oat5 hacia el lumen tubular. El aumento de la excreción urinaria de Oat5 a dosis en las cuales no se modificó For sugiere que los niveles de Oat5 en orina podrían ser usados como marcadores de daño nefrotóxico subclínico.

387 (507) ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN LA PROTEÍNA DE ESTRÉS TÉRMICO HSP 70 EN TEJIDO RENAL DE RATAS EN UN ESTADIO TEMPRANO DE DIABETES INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA Pagotto M.¹; Molinas S.²; Trumper L.³; Monasterolo L.⁴

IFISE-CONICET. Farmacología. Facultad de Cs. Bioq. y Farm. UNR¹; CIUNR. Farmacología³; CONICET. Farmacología⁴ <melina.pagotto@gmail.com>

La respuesta celular a estímulos patofisiológicos o ambientales causantes de estrés es la expresión de proteínas de estrés térmico (HSP), las cuales confieren protección celular actuando como chaperonas moleculares, reduciendo la desnaturalización de proteínas, formación de agregados o plegamientos incorrectos. Los niveles de HSP 70 se han visto modificados en tejidos extrarrenales en la enfermedad diabética, pudiendo resultar en una disminución de la capacidad citoprotectora de distintos tipos celulares. Nuestro objetivo fue estudiar la alteración en la expresión de la proteína HSP 70 en tejido renal de rata en un estadio temprano de diabetes experimental. Ratas Wistar macho adultas recibieron estreptozotocina i.v. (50 mg/kg) (STZ) o vehículo (C). Luego de 7 días, se extrajeron los riñones, una porción se con-

geló para realizar cortes con crióstato y el resto se separó en corteza y médula. Se estudió la expresión de la proteína HSP 70 por Western Blot en homogenados de corteza y médula renal y mediante inmunofluorescencia en cortes de tejido. Los resultados son promedio \pm SEM de 4-5 observaciones, * $p < 0.05$. Se observó una significativa disminución en la expresión de HSP70 (unidades arbitrarias) en corteza renal, (C:51.4 \pm 0.6, STZ:38.9 \pm 0.21*) y una tendencia a disminuir en médula (C:73.4 \pm 26.2, STZ:36.9 \pm 6.3) de riñones diabéticos. Las imágenes obtenidas mediante inmunofluorescencia observadas en microscopio confocal concuerdan con estos resultados. Se han iniciado experimentos para evaluar la expresión de la proteína HSP70 en monocapas de células renales MDCK. Resultados preliminares muestran una tendencia a disminuir la expresión al incubarse con altas concentraciones de glucosa. Estos resultados demuestran una disminución de la expresión renal de la proteína HSP70 en una fase temprana de diabetes, pudiendo alterar la capacidad citoprotectora celular y colaborar de esta manera con las alteraciones observadas en la fisiopatología renal diabética.

388 (515) ALTERACIONES DEL SISTEMA SIMPÁTICO EN RATAS COLINO-DEFICIENTES. Ossani G.¹; Monserrat A.²; Nowicki S.³

Centro de Patología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2}; CEDIE-CONICET³ <georginaossani@yahoo.com.ar>

La colina es una amina cuaternaria, que al ser oxidada a betaína interviene (conjuntamente con la vitamina B₁₂ y el ácido fólico) en la metilación de la homocisteína a metionina, cuyo derivado la s-adenosil-metionina es cofactor de dos enzimas involucradas en la síntesis y catabolismo de catecolaminas (CA), la Feniletanolamina-N-Metil Transferasa (PNMT) y la Catecol-O-Metil Transferasa (COMT). En ratas, una dieta deficiente en colina (CD) consecutiva al destete provoca insuficiencia renal aguda (IRA) en el término de 5-7 días. El vasoespasmo se ha postulado como uno de los posibles mecanismos patogénicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre el sistema simpático, evaluado por las CA plasmáticas y urinarias, y la IRA por CD. Se estudiaron ratas Wistar macho alimentadas con dietas CD ó colina-suplementadas (CS) a partir del destete. Los días 4 y 7 se recogieron muestras de plasma (aorta abdominal) y orina de 24h (jaula metabólica), y se extrajeron ambos riñones que fueron procesados para evaluar la lesión histopatológica y los niveles de CA (HPLC-DE). Sólo se observó necrosis cortical en el grupo CD-día 7. El día 7, la excreción renal de CA fue menor en ratas CD respecto de las CS (en pg/24h 100g, NA 7 \pm 2 vs 315 \pm 63; DA 11 \pm 5 vs 909 \pm 69, n=4-5), y en plasma los niveles de NA y A, pero no de DA, fueron también menores en ratas CD (en pg/ml NA 471 \pm 74 vs 1200 \pm 131; A 759 \pm 131 vs 2829 \pm 1159; DA 524 \pm 110 vs 272 \pm 67, n=6-10). Todos los valores medidos el día 4 en ratas CD y CS son semejantes al grupo CS-día 7. Nuestros resultados indican que el desarrollo de la IRA en ratas CD-día 7 no está relacionado al aumento del tono simpático renal y sugieren que de haber un vasoespasmo cortical el mismo no es debido al aumento de CA. La menor excreción de CA puede ser secundaria a la necrosis cortical. Sin embargo, los menores niveles de CA en plasma sugerirían un deficiente tono simpático periférico en las ratas CD que es prevenido por la suplementación por colina.

389 (529) RESPUESTA TUBULAR AL MANEJO DE PROTEÍNAS EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN RATAS. Oltra G.¹; Ochoa F.²; Gutierrez L.³; Lago N.⁴; Zotta E.⁵

Laboratorio de Fisiopatología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA^{1 2 3}; Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina UBA⁴; Laboratorio de Fisiopatología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA⁵ <giselaoltra@gmail.com>

La insuficiencia renal crónica se caracteriza por la pérdida progresiva de nefronas. Las nefronas remanentes experimentan modificaciones a medida que el riñón intenta adaptarse a dicha reducción. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar los mecanismos de adaptación relacionados con la evolución de la enfermedad renal progresiva. Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos de 150 g de peso, a las que se le indujo insuficiencia renal crónica (IRC) a partir del modelo de 5/6 de nefrectomía. Se realizaron estudios histológicos e histoquímicos (IHQ) a las semanas 1, 3, 5 y 20 post cirugía. Por IHQ se evidenció la presencia del factor de crecimiento transformante β -1 (TGF- β -1) sobre todo en los túbulos proximales y de alfa-actina de músculo liso (α -SMA) a nivel túbulointersticial en la 1, 3 y 5 semanas de evolución. No detectamos estos cambios a las 20 semanas. El estudio IHQ del mecanismo de reabsorción proximal de proteínas evidenció una disminución en la expresión de megalina. En conclusión durante la evolución de la IRC por 5/6 de nefrectomía la alteración en la expresión de megalina podría estar asociada al aumento en la expresión del TGF- β -1 y el desarrollo de una transformación epitelio-mesenquimática responsable de la fibrosis túbulointersticial que evoluciona a una glomeruloesclerosis focal y segmentaria a las 20 semanas. Así mismo estos cambios podrían relacionarse con los mecanismos responsables de las alteraciones en el manejo renal de proteínas

390 (573) EFECTO PROTECTOR DE LA MELATONINA (MEL) FRENTE A LA TOXICIDAD DEL ALUMINIO (AL) EN RATAS HEMBRAS INTACTAS Y OVARIETOMIZADAS (OVX). Mahieu S.¹; Millen N.²; Gonzalez M.³; Contini M.⁴

LIFE. Facultad Bioquímica y Cs Biológicas. UNL^{1 2 3 4} <smahieu@fbc.unl.edu.ar>

Hemos visto efectos tóxicos del Al como resultado de reacciones oxidativas en riñón e hígado en ratas machos. Estudiamos el efecto simultáneo del tratamiento de Al y Mel en ratas hembras sobre el estado oxidativo en riñón e hígado. **Grupos** (c/u n=6): **1:** intactas (C), **2:** OvX, tratadas por 3 meses con lactato de Al (0,62 mg Al/100g peso, ip, 3 días /sem.), **3:** Al, **4:** OvX+Al; tratadas con Mel (10 mg/kg peso, ip 5 días /sem.) **5:** C+Mel, **6:** OvX+Mel, **7:** Al+Mel, **8:** OvX+Al+Mel. Se determinó lipoperoxidación (LPO) y glutatión (GSH) y las actividades de glutatión peroxidasa (GSHPx), glutatión reductasa (GR) y catalasa (CAT) en riñón e hígado. Se obtuvieron las actividades de ATPasa Na/K y GGT. Se evaluaron balances de agua y sodio y la capacidad de concentración urinaria. En hígado Al aumentó LPO en ratas OvX restableciéndose por Mel, sin cambios en GSH. En riñón, Al no induce cambios en LPO. GSH aumenta por OvX y por Mel excepto en OvX+Al+Mel. En hígado GSHPx se reduce por OvX y aumenta por Al; cambios restablecidos por Mel. En riñón GSHPx (nmol NADPH/min.mg prot) se reduce por OvX y Al. Mel evita el efecto solo en OvX. **1:**123 \pm 6, **2:**80 \pm 1*, **3:**82 \pm 1*, **4:**77 \pm 7*, **5:**138 \pm 5, **6:**121 \pm 13, **7:**69 \pm 3*, **8:**117 \pm 2. Al reduce CAT en riñón e hígado, efecto revertido por Mel. Al redujo ATPasaNa/K hepática en OvX, normalizándose por Mel. GGT se redujo en los grupos tratados con Al y no hubo cambios por Mel. Al disminuyó la capacidad para concentrar la orina en ratas intactas y OvX, sin restablecerse por Mel [U]osm (mOsm/l): **1:**2296 \pm 47^a, **2:**2425 \pm 78^b, **3:**1652 \pm 67^c, **4:**2030 \pm 25^d, **5:**2224 \pm 37^a, **6:**2470 \pm 35^b, **7:**1603 \pm 35^c, **8:**2082 \pm 47^d. Al altera marcadores del estado oxidativo en ratas OvX posiblemente por la falta de estrógenos, siendo los efectos diferentes en los órganos estudiados. Mel atenúa los cambios por su eficacia depuradora de especies oxígeno reactivas (ROS) y el estímulo de enzimas antioxidantes. Las modificaciones observadas en el manejo del agua podrían ser independientes de la producción de ROS.

391 (600) CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA RESPUESTA TÚBULO-GLOMERULAR EN EL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) ATÍPICO HUMANO POR DÉFICIT DE FACTOR H. Gutierrez L.¹; Ochoa F.²; Oltra G.³; Raffaele P.⁴; Fortunato R.⁵; Lago N.⁶; Zotta E.⁷

Laboratorio de Fisiopatología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA^{1 2 3}; Unidad renal. Fundación Favaloro⁴; Unidad Renal. Fundación Favaloro⁵; Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina. UBA⁶; Laboratorio de Fisiopatología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA⁷ <lucianamarielgutierrez@hotmail.com>

El SUH es el resultado de la acción de múltiples factores. Consiste en la asociación de anemia hemolítica microangiopática e insuficiencia renal aguda. La forma típica es inducida por la toxina Shiga tipo 2 (Stx2). La forma atípica incluye formas familiares, con patrones de herencia autosómica dominante y recesiva asociada a la región cromosómica 1q32. Esta región contiene el sistema regulador de la activación del complemento humano (RCA) donde se ubica el gen codificante del factor H (CFH/HF1). El factor H, es una proteína plasmática cuyo déficit induce una activación de C3 y formación de microangiopatía trombótica. En trabajos anteriores describimos en un modelo de SUH experimental en ratas por Stx2, alteraciones en la expresión de proteínas de la barrera de filtración y en el sistema de endocitosis tubular de proteínas. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar por técnica de inmunoperoxidasa (Vector) las modificaciones en la expresión de estas proteínas utilizando anticuerpos primarios contra nefrina, podocalixina (Alpha Diagnostic) y megalina (Santa Cruz). Los estudios se realizaron a partir de riñón humano postransplante de un paciente con antecedentes de SUH atípico por déficit de factor H y que recidivó en el riñón transplantado. Se utilizó como riñón control muestras del mismo pre transplante. Se detectaron alteraciones histológicas compatibles con SUH, rechazo crónico leve y lesiones inducidas por anticalcineurínicos (drogas utilizadas como inmunosupresores) La inmunohistoquímica demostró en los túbulos proximales pérdida de la expresión de megalina. Las marcaciones con nefrina y podocalixina en glomérulo demostraron alteraciones en la expresión de proteínas del diafragma de filtración glomerular. Nuestros resultados sugieren que en el SUH atípico por déficit de factor H las modificaciones en la presencia de megalina podocalixina y nefrina podrían ser las responsables de alteraciones histofuncionales relacionadas con el desarrollo de proteinuria

392 (634) FACTORES NO HEMODINÁMICOS RELACIONADOS CON LA GÉNESIS DE LA PROTEINURIA EN UN MODELO DE SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN RATAS. Ochoa F.¹; Oltra G.²; Gutierrez L.³; Lago N.⁴; Zotta E.⁵

Laboratorio de Fisiopatología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA^{1 2 3}; Centro de Patología Experimental. Departamento de Patología. Facultad de Medicina UBA⁴; Laboratorio de Fisiopatología. Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina. UBA⁵ <fochoa@inbox.com>

En Argentina, el SUH es la causa más común de insuficiencia renal aguda (IRA) en niños menores de 5 años. Los daños tisulares son consecuencia del efecto de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) producida por *Escherichia coli* enterohemorrágica. Se ha informado que el 30% de los pacientes con SUH progresa a la cronicidad. Uno de los más importantes factores relacionados con la evolución a la cronicidad es la proteinuria. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar la génesis de la proteinuria en un modelo de SUH en ratas. Utilizando el modelo previamente descrito por nosotros, ratas Sprague-Dawley machos (150 g) fueron inoculadas por vía intraperitoneal con 3 mL de sobrendante de cultivo de *E. coli* recombinante que expresa Stx2 (20 ug Stx2/Kg de peso). Las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas para determinación de diuresis y dosaje de proteínas a diferentes tiempos. Se procesaron los riñones para estudios de Western Blot, histología y técnicas de inmunohistoquímica. Se estudió la expresión de nefrina en región podocítica basal (diafragma de filtración glomerular), podocalixina endotelial y podocitaria y megalina en túbulo proximal. Observamos a las 48 horas post inoculación, una disminución en la expresión de nefrina y podocalixina en la región glomerular, y disminución de la expresión de megalina en el túbulo

proximal. Nuestros resultados sugieren que en este modelo de las alteraciones en la barrera de filtración glomerular y en el sistema de endocitosis de proteínas del túbulo proximal podría relacionarse con la génesis de la proteinuria.

GASTROENTEROLOGIA 1

393 (628) EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO (RE) EN LA ALTERACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE SALES BILIARES INDUCIDA POR ESTRADIOL-17 β -D-GLUCURÓNIDO (E) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR). Barosso I.¹; Zucchetti A.²; Taborda D.³; Crocenzi F.⁴; Sánchez Pozzi E.⁵

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE- Conicet)^{1 2 3 4 5} <barosso@ifise-conicet.gov.ar>

La activación del RE participa en efectos del estradiol tales como la activación de moléculas de señalización intracelular: PKC y PI3K. Ambas quinasas participan en la colestasis por E, su derivado glucuronizado, por lo que fue de interés evaluar el rol de RE en esta patología. La activación del RE se manifiesta por su fosforilación en ser118 y puede ser bloqueada por ICI 182780 (ICI). Métodos: Estudios funcionales: DAHR fueron tratadas con concentraciones crecientes de E (25-400 μ M) en presencia de ICI (1 μ M) y luego expuestas a colil-lisilfluoresceína (CLF, análogo fluorescente de sales biliares). Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CLF (cvaCLF). Activación de RE: Membranas totales de hepatocitos tratados con E (100 μ M) por 15 min fueron sometidas a Western blot (Wb) y reveladas con anti-RE fosforilado en ser118. Resultados (n=3): Las curvas concentración-respuesta mostraron que ICI aumentó IC50 de E (163 \pm 5 μ M vs 93 \pm 5 μ M, p<0.05). Wb reveló que E aumentó fosforilación de RE (Control: 100 \pm 0%, E: 335 \pm 19%, p<0.05). Dado que PKC α participa de la colestasis por E se analizó si el RE y PKC α compartían la misma vía o son activados independientemente. Para esto se evaluó el efecto conjunto de ICI y G66976 (1 μ M), inhibidor de PKC α en cvaCLF y se evaluó el nivel de activación de PKC inducida por E (100 μ M) en presencia de ICI estimada por la translocación de PKC a membrana medida por Wb. ICI (44 \pm 7%, p<0.05) y G66976 (42 \pm 3%, p<0.05) lograron el mismo grado de protección frente a E (32 \pm 3%, C:54 \pm 5%), la cual no mejoró en presencia de ambos (43 \pm 2%, p<0.05). Sin embargo, ICI no previno la activación de PKC inducida por E (%PKC en membrana: E:96 \pm 5%, E+ICI:92 \pm 5% Control:36 \pm 7%). Conclusiones: E activa el receptor de estrógenos y su bloqueo previene la colestasis. RE compartiría la vía de señalización con PKC aunque el bloqueo de RE no modifica la activación de PKC por lo que la unión de E a RE no sería previa a la activación de PKC.

394 (745) COLITIS ULCEROSA (CU): FUNCIONALIDAD DE LA GLICOPROTEÍNA P (GP-P) EN BIOPSIAS DE MUCOSA COLÓNICA (BC). Cortada C.¹; Bellicoso M.²; Cismondi V.³; Gil A.⁴; Negreira S.⁵; Hueros S.⁶; Goncalves S.⁷; Tirado P.⁸; Sambuelli A.⁹; Rubio M.¹⁰; Carballo M.¹¹

CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹; Hospital de Gastroenterología "Dr. Carlos Bonorino Udaondo"²; Centro de Diagnóstico Molecular³; Hospital de Gastroenterología "Dr. Carlos Bonorino Udaondo"^{4 5 6 7 8 9}; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹⁰; CIGETOX (Citogenética Humana y Genética Toxicológica), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹¹ <eldecata@yahoo.com.ar>

La CU es una enfermedad inflamatoria intestinal crónica donde se postula una desregulación de la respuesta inmune de mucosa. El gen ABCB1, codifica para gp-P, es candidato de interés en la patología y respuesta terapéutica. Gp-P se expresa en epitelio

intestinal, linfocitos intraepiteliales (LIEs) y de sangre periférica (LSP), funcionando como una bomba de eflujo. Objetivo: Estudiar en células aisladas de BC la funcionalidad de la gp-P a fin de evaluar su comportamiento en la CU y correlacionarla con la de LSP. Se tomaron BC de pacientes con CU en actividad (n=7) con antecedentes de refractariedad al tratamiento que requirieron intervención con glucocorticoides IV y/o 6-mercaptopurina y/o infliximab. Los controles fueron individuos con mucosa intestinal normal (n=8). En LIEs y células epiteliales (CE) aislados se estudió el eflujo de rodamina 123, sustrato de la gp-P, en ausencia y presencia del inhibidor Valspodar (1µM) determinando por citometría de flujo la fluorescencia intracelular y los linajes celulares (inmunomarcación). Los resultados se expresaron evaluando el % de células que contienen máxima(M1)/mínima(M2) concentración del colorante, reflejando inactividad/actividad de gp-P. El mismo ensayo se realizó en simultáneo en LSP. Resultados(X±DS): En LIEs los valores fueron: *pacientes*: sin inhibidor M1=72±25/M2=26±24, con inhibidor M1=88±10/M2=12±10; *controles*: sin inhibidor M1=38±18/M2=60±19, con inhibidor M1=92±3/M2=7±4. Se observaron diferencias (test de Student para la media de 2 colas) en M1 y M2 sin inhibidor (p<0.009); no se observaron diferencias con inhibición (p=0.3). En CE se observaron diferencias sin y con inhibición (p<0.02). No hubo correlación entre la gp-P de LIEs y LSP en pacientes o controles. Conclusiones: en la CU la actividad de gp-P en mucosa fue significativamente diferente de los controles. La falta de correlación entre LIEs y LSP sugiere un comportamiento diferente de la gp-P ante exposición a drogas o fenómenos inflamatorios locales.

395 (37) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE COMO MODULADOR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA GLÁNDULA SUBMAXILAR DE LA RATA. Fernandez Solari J.¹; De Laurentiis A.²; Mohn C.³; Prestifilippo J.⁴; Ossola C.⁵; Rettori V.⁶; Elverdin J.⁷

CEfYBO- CONICET/UBA, Cat. Fisiología, Fac Odontología, UBA¹ ; CEfYBO- CONICET/UBA² ; Cat. Fisiología, Fac Odontología, UBA⁴ ; CEfYBO- CONICET/UBA⁶ ; Cat. Fisiología, Fac Odontología, UBA⁷
<javierfsolari@yahoo.com.ar>

Es conocida la función inmunológica de la glándula submaxilar (GSM) y su contribución al mantenimiento de la salud de los tejidos orales. En trabajos previos demostramos por inmunohistoquímica la presencia de los receptores de cannabinoides (CB1) y CB2 así como de receptores TLR4 para LPS en la GSM de la rata, principalmente en el sistema ductal. Adicionalmente, observamos una disminución de la secreción salival 3 hs post inyección de LPS (ip), que es mediada por endocannabinoides y prostaglandinas (PGs). El objetivo del presente trabajo fue estudiar el posible papel del sistema endocannabinoide (SEC) como modulador de la respuesta inflamatoria inducida por LPS en la GSM tanto *in vitro* como *in vivo*. La meta-anandamida (MAEA, 10⁻⁹M) disminuyó la liberación de TNFα (ELISA) incrementada por LPS (10 µg/ml) + INFγ (100 ng/ml) en GSMs *in vitro* (N=6/grupo), mientras que el antagonista selectivo de CB1, AM251 (10⁻⁹M) previno el efecto inhibitorio de la MAEA (control (C): 269.4±38.37 pg TNFα/mg GSM; LPS+INFγ (LI): 725.1±122.7 pg/mg, P<0.01 vs C; LI+MAEA: 324.2±29.28 pg/mg, P<0.01 vs LI; LI+MAEA+AM251: 630.9±64.0 pg/mg, P<0.05 vs LI+MAEA). Además, las GSMs incubadas en presencia de MAEA mostraron una disminución de la PGE liberada (RIA), incrementada por LPS+INFα. En experimentos *in vivo*, los niveles de TNFα aumentaron en la GSM 3 hs post inyección de LPS (ip). A su vez, el TNFα (300 ng/50µl) inyectado intra-GSM produjo una disminución significativa de la secreción salival estimulada por metacolina (N=5 ratas/grupo). Este efecto inhibitorio fue prevenido por la administración intra-GSM previa y conjunta de los antagonistas de CB1, AM251 (15µg/50µl), y de CB2, AM630 (15µg/50µl), sugiriendo que el TNFα sería un intermediario entre el LPS y el SEC. Los resultados del presente trabajo demuestran que el papel inmunomodulador que se le atribuye a la GSM involucra la participación del sistema endocannabinoide (PICT 07-1016 y 06-0258; UBACyT 0007 y Fundación Roemmers).

396 (146) LA SAL BILIAR TAOURSOSESODOSOXICOLATO (TUDC) PREVIENE LA TRANSICIÓN A MICELA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LA LISIS HEPATOCELULAR INDUCIDA POR SALES BILIARES DETERGENTES. Basiglio C.¹; Mottino A.²; Roma M.³

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE - CONICET)¹ ; <ceciliabasiglio@yahoo.com.ar>

TUDC es utilizado como agente terapéutico en hepatopatías de naturaleza colestásica. En este tipo de patologías, la falla secretora biliar produce acumulación de sales biliares con propiedades tensioactivas, las cuales pueden inducir daño de membrana plasmática y muerte celular por hepatolisis. En este trabajo, se analizó la capacidad del TUDC para estabilizar la membrana plasmática hepatocelular frente al daño inducido por la sal biliar tensioactiva tauroquenosodocolato (TQDC), principal sal biliar endógena acumulada en colestasis. La disrupción de membrana plasmática se evaluó i) en hepatocitos aislados, mediante la liberación de las enzimas citosólicas lactato deshidrogenasa y alanina aminotransferasa y ii) en membrana plasmática aislada, mediante el ensayo de auto-extinción de la fluorescencia de la sonda membranotrópica octadecilrodamina B; este ensayo permite monitorear la transición de bicapa a micela por acción de detergentes. Los resultados obtenidos indican que los hepatocitos aislados de rata pre-incubados con TUDC son más resistentes a la lisis inducida por TQDC (1-8 mM; relación molar TUDC:TQDC 3:1), siendo este efecto evidente a partir de una concentración de TQDC de 4 mM (-23 %; p < 0,05; n = 4). Cuando se evaluó el efecto de TUDC (500 µM) en membranas aisladas, la concentración de TQDC necesaria para alcanzar la transición media de bicapa a micela fue de 7,92 para TQDC y de 8,85 para TQDC+TUDC (p < 0,05; n = 4). Esta diferencia se mantuvo cuando TUDC fue removido del medio antes de agregar TQDC, indicando que TUDC actuó sobre la membrana y no sobre TQDC. En cambio, cuando se realizaron los mismos experimentos pero utilizando como detergente Tritón X-100, no se observó efecto protector alguno ni en la lisis celular ni en la curva de transición de bicapa a micela. Concluimos que TUDC ejerce citoprotección previniendo selectivamente la transición a micela de la membrana hepatocelular inducida por sales biliares hidrofóbicas acumuladas en colestasis.

GENETICA 3 - MEDICINA REGENERATIVA 3

397 (119) PERFIL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN HEDGEHOG EN MENINGIOMAS HUMANOS CON DIFERENTES GRADOS DE MALIGNIDAD. Laurendeau I.¹; Ferrer M.²; Garrido D.³; Ciavarelli P.⁴; Giliberto F.⁵; Ferreiro V.⁶; Basso A.⁷; Bieche I.⁸; Szijan I.⁹

Université Paris-Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques; Genetica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA¹ ; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Servicios de Neurocirugía y de Genética.² ; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedras de Genética y Biología Molecular y de Matemáticas.³ ; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Servicios de Neurocirugía y de Genética.⁴ ; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedras de Genética y Biología Molecular y de Matemáticas.⁵ ; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Servicios de Neurocirugía y de Genética.⁶ ; Université Paris-Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques; Genetica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA⁸ ; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedras de Genética y Biología Molecular y de Matemáticas.⁹ <iszijan@ffyba.uba.ar>

La vía de señalización Hedgehog (Hh) cumple un papel importante durante la embriogénesis y también en el adulto en la regulación de procesos celulares como proliferación, angiogénesis, remodelación de matriz extracelular y renovación y diferenciación de células troncales. La desregulación de la vía Hh está implicada en el desarrollo de tumores y se han encontrado mutaciones en varios componentes: PTCH, SMO y SUFU en los pacientes con carcinoma de células basales, meduloblastomas y otros tumores. Sin embargo, no se estudió aún el papel de esta vía en meningiomas, los que representan el 30% de tumores craneales primarios, son mayormente benignos y prevalecen en la segunda mitad de la vida. Las nuevas terapias para meningiomas basadas en el uso de blancos moleculares requieren el conocimiento de las alteraciones de vías metabólicas en esos tumores. Para brindar información acerca de las alteraciones moleculares estudiamos la expresión de 32 genes de la vía Hedgehog a nivel de mRNA por medio de RT-PCR tiempo real en 36 muestras de meningiomas: 23 grado I, 9 grado II, 4 grado III y 6 meninges normales, autorizado por Comité de Ética del Hospital de Clínicas. Los resultados de se analizaron por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y de correlación de Spearman. Los niveles de mARNs de 20 genes implicados en la activación de la vía Hh y de la proliferación celular estaban aumentados en meningiomas comparados con el tejido normal. Por otro lado niveles de mARNs de 6 genes relacionados con la represión de Hh estaban disminuidos. También se observó diferencia en niveles de mARN de varios genes, PTCH, GLI2, SPP1, IGF2, entre diferentes grados de tumores. Se encontró una correlación en la expresión entre los genes con funciones similares. Esta es la primera vez que se demuestra una estimulación de la vía Hedgehog en meningiomas, tanto benignos como malignos, lo cual es importante para su caracterización biológica y clínica y su probable utilidad en la terapia molecular

398 (722) ROL DE VARIANTES DEL GEN FECH EN EL DES-ENCADENAMIENTO DE LA PROTOPORFIRIA ERITROPOYÉTICA. Colombo F.¹; Martínez J.²; Rossetti M.³; Battlé A.⁴; Parera V.⁵

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) CONICET, Hospital de Clínicas-UBA; Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA^{1 2 3}; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) CONICET, Hospital de Clínicas-UBA⁴; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) CONICET, Hospital de Clínicas-UBA; Departamento de Química Biológica, FCEyN-UBA⁵ <fcolombo@hotmail.com>

La Protoporfirina Eritropoyética (PPE) se produce por una deficiencia parcial de la enzima Ferroquelatasa debido a la acumulación de variantes del gen FECH. La PPE es una enfermedad genéticamente heterogénea, autosómica dominante con penetrancia incompleta, donde generalmente el fenotipo es el resultado de la herencia combinada de un alelo mutado y uno de baja expresión. El gen FECH cuenta con más de 133 mutaciones y al menos 345 polimorfismos que contribuyen a modular la enfermedad. El objetivo fue determinar el rol de variantes del gen FECH en la asociación genotipo/fenotipo de pacientes PPE, identificando aquellas que podrían influir de manera significativa sobre el cuadro clínico del paciente. El estudio se amplió a pacientes con otros tipos de porfiria e individuos control. Se analizaron las variantes del gen FECH por secuenciación automática y/o digestión con endonucleasas específicas. Los productos de amplificación y digestión se revelaron en gel de agarosa 1% y 3% respectivamente. Se estudiaron 24 pacientes y 23 familiares PPE, 35 pacientes con otros tipos de porfirias (Cutánea Tardía=12; Variegata=10; Aguda Intermitente=10; Coproporfirina=1; Congénita Eritropoyética=2) y 103 controles. En pacientes PPE, las variantes del gen FECH -251 G, IVS1-23 T, IVS3-48 C (haplotipo GTC) están presentes en el 100% de los casos, cualquiera sea la mutación asociada en trans, con una prevalencia en la población control similar a la observada en pacientes con otras porfirias (6% y 8% respectivamente). En la PPE la penetrancia condiciona el cuadro clínico

del paciente en más del 95% de los casos y ésta se relaciona siempre a un alelo al menos compuesto por el haplotipo GTC del gen FECH. Conocer el rol de las variantes genómicas así como su frecuencia poblacional, nos permitirá confirmar el diagnóstico y evaluar el riesgo de agravamiento del cuadro o desencañamiento de la enfermedad.

399 (546) IMPACTO DE LAS VARIANTES EN LOS GENES TIOPURINA METILTRANSFERASA (TPMT) Y METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LEUCEMIA LINFOLÁSTICA AGUDA (LLA) EN PEDIATRÍA. Aráoz H.¹; Celis Passini V.²; D'aloí K.³; Foncuberta M.⁴; Rocco C.⁵; Alonso C.⁶; Felice M.⁷; Chertkoff L.⁸

Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Genética. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan"¹; Servicio de Hemato-Oncología. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan"^{2 3}; Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Genética. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan"⁴; Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan"⁵; Laboratorio de Biología Molecular-Servicio de Hemato-Oncología. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan"⁶; Servicio de Hemato-Oncología. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan"⁷; Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Genética. Hospital de Pediatría "Prof Dr Juan P Garrahan"⁸ <veritoaraoz@gmail.com>

Las enzimas MTHFR y TPMT participan en el metabolismo de drogas utilizadas en el tratamiento de LLA en pediatría. Diferencias en su actividad podrían modular la respuesta a agentes quimioterapéuticos, como 6-mercaptopurina (6-MP) y metotrexato (MTX). El objetivo del trabajo fue evaluar la influencia de variantes genéticas frecuentes en los genes de MTHFR y TPMT en la respuesta al tratamiento con MTX y 6-MP: eficacia y toxicidad. Pacientes y métodos: Se estudiaron 219 pacientes con LLA tratados con dos protocolos consecutivos basados en las estrategias del grupo BFM. Las variantes TPMT*3A, TPMT*3B, TPMT*3C, TPMT*2 para el gen TPMT y, C677T y A1298C para MTHFR, se identificaron por PCR-RFLP o PCR alelo específica. La toxicidad se evaluó según criterios de la OMS. La asociación entre toxicidad y genotipos se analizó por *Test* de Fisher. La probabilidad de sobrevida libre de eventos (pSLE) fue estimada por el método de Kaplan-Meier y las comparaciones se realizaron por *Test* de log-rank. Resultados: Los niños que recibieron 2gr/m²/día de MTX y tenían al menos un alelo T677 en el gen MTHFR, mostraron riesgo elevado al desarrollo de leucopenia severa en la fase de consolidación (p=0.001). En los pacientes que recibieron 5gr/m²/día MTX, los polimorfismos de MTHFR no modularían la toxicidad al MTX, a pesar de que este grupo presentó mayor frecuencia de toxicidad que el grupo que recibió 2gr/m²/día (23% vs 15%). El análisis de pSLE reveló que los pacientes con genotipo TT677 mostraban riesgo reducido de presentar evento (p=0.032), aún cuando el análisis se ajusta por grupo riesgo (GR)(p=0.026). El análisis dentro de cada GR indicó que esa diferencia se mantiene en el GR intermedio (p=0.029). Con respecto a las variantes de TPMT, no se observó diferencia significativa en la toxicidad a 6-MP y tampoco en pSLE. Conclusión: La pSLE y la toxicidad parecen estar moduladas por la variante genética C677T del gen MTHFR en pacientes que reciben 2g/m²/día MTX.

400 (327) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ID1-4 Y NOGGIN LUEGO DE LA DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDO ADIPOSITO. Cardozo A.¹; Gomez D.²; Argibay P.³

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental - Hospital Italiano de Buenos Aires¹; Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes²; Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental - Hospital Italiano de Buenos Aires³ <johana.cardozo@hospitalitaliano.org.ar>

El sistema nervioso (SN) tiene capacidad de reparación limitada ya que la neurogénesis se limita a ciertas regiones del cerebro adulto. Esto genera interés en utilizar células madre (CM) para reparar daños del SN. Trabajos recientes demostraron la diferenciación neural *in vitro* de CM de tejido adiposo (ASCs) con factores involucrados en la neurogénesis. Basado en esto, podría existir un paralelismo funcional entre neurogénesis y diferenciación neural de ASCs. Objetivo: Evaluar cambios en la expresión de los genes *Id1-4* y *Noggin*, involucrados en la cascada de BMP, antes y luego de la diferenciación neural de hASCs. Se aislaron hASCs de 12 muestras de tejido adiposo. Al pasaje 5, se indujo la diferenciación neural, la cual se evaluó por cambios morfológicos e inmunocitoquímica. Se extrajo ARN de las células pre y post-inducción para evaluar la expresión génica de *Noggin* e *Id1-4* utilizando PCR en tiempo real. Se observó expresión de *Noggin* (antagonista de BMP) en hASCs post-inducción, el cual promueve la diferenciación neuronal; y esta expresión no fue detectada en células sin tratar. Por otra parte, se detectó expresión de *Id1* (blanco de la cascada de BMP) en hASCs sin tratar, la cual disminuyó significativamente luego del tratamiento. Estos resultados son similares a trabajos previos donde se observó una reducción en la expresión de *Id1* luego del tratamiento con suero y/o morfógenos; una diferenciación neural prematura cuando *Id1* es inhibido por siRNA; y una inhibición de la diferenciación neural cuando *Id1* es sobreexpresado. No se observaron cambios significativos en la expresión de *Id2* e *Id3*. Finalmente, se detectó un aumento significativo de la expresión de *Id4* luego de la inducción, lo cual está relacionado con maduración neuronal. Estos resultados pueden contribuir a discernir los mecanismos moleculares involucrados en la diferenciación neural de CM de tejidos adultos no neurales como posible alternativa en la reparación del SN en enfermedades neurodegenerativas

401 (519) LA ACIDOSIS EXTRACELULAR PROMUEVE APOPTOSIS Y QUIESCENCIA DE CÉLULAS CD34+. D'atri L.¹; Romaniuk A.²; Etulain J.³; Torres O.⁴; Malaver E.⁵; Schattner M.⁶

Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5 6} <lpdatri@hematologia.anm.edu.ar>

Estudios experimentales y clínicos han propuesto el trasplante de células progenitoras incluyendo células CD34⁺ como terapia para mejorar la revascularización y la regeneración celular en pacientes con infarto de miocardio o accidente cerebrovascular. La acidosis extracelular, una característica no solamente de procesos inflamatorios sino también de eventos isquémicos y tumorales, es un regulador crítico de la activación y supervivencia de diferentes tipos celulares. Previamente demostramos que el medio ácido induce apoptosis de células CD34⁺ y que algunos factores de crecimiento revertían este efecto. Debido a que el éxito de la terapia celular depende de la supervivencia de las células transplantadas, en este trabajo profundizamos el estudio de los mecanismos asociados al proceso apoptótico gatillado por el medio ácido. La muerte de células CD34⁺ inducida por acidosis extracelular (% de apoptosis evaluada por microscopía de fluorescencia utilizando naranja de acridina y bromuro de etidio en células purificadas de sangre de cordón umbilical) mostró ser dependiente del pH (pH7.4=23±3, pH7=46±2* pH6.5=52±2*, pH6=62±3*, n=3) y del tiempo de exposición (0.5 min=37±3*; 1 min=42±4*; 10 min=54±4*, n=3). La incubación de las células en medio ácido indujo arresto del ciclo celular (aumento del número de células en G0 2,8±0,6 veces vs. pH7.4, n=4) y una disminución (22±5%, n=3) de la capacidad clonogénica de las CD34⁺ (formación de colonias hematopoyéticas). El medio ácido indujo una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial de las células (pH7.4=12±3; pH6.5=3,5±2 ratio FL2/FL1 del colorante JC-1, n=3) y la activación de caspasa-3 (pH7.4= 19±2; pH6.5= 58±8* % células positivas) (FACS) que fue prevenida por trombopoyetina (TPO) (pH6.5+TPO=37±2*). (*P<0.05 vs. pH 7.4; #P<0.05 vs. pH6.5). En conjunto estos datos muestran que la exposición de células progenitoras CD34⁺ a un medio ácido activa la vía mitocondrial de apoptosis e induce la quiescencia de las células.

INMUNOLOGIA 8

402 (672) ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PERFORINA Y DE RANTES EN CÉLULAS T CD8 COMO MECANISMOS INHIBITORIOS DE LA RESPUESTA CITOTÓXICA T INDUCIDA POR LA CEPA DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTIRESISTENTE A DROGAS M. Geffner L.¹; Basile J.²; Yokobori N.³; Ritacco V.⁴; López B.⁵; Barrera L.⁶; Sasiain M.⁷; De La Barrera S.⁸

IIHema - Academia Nacional de Medicina; ANLIS - Malbrán¹; IIHema - Academia Nacional de Medicina^{2 3}; ANLIS - Malbrán^{4 5 6}; IIHema - Academia Nacional de Medicina^{7 8} <laurageffner@hematologia.anm.edu.ar>

La actividad citotóxica T antígeno-específica (CTL) se ha asociado a la lisis de macrófagos (Mac) infectados y *Mtb*. La expresión coordinada de RANTES, perforina y granzulina es un mecanismo empleado por CTLs CD8 para atraer y matar Mac infectados con *Mtb*. Anteriormente, hemos demostrado que la cepa M, causante de brote de tuberculosis multi-resistente (MDR-TB) induce una respuesta CTL débil en controles sanos y pacientes TB, comparada con la cepa no próspera 410, relacionada con M. El objetivo de este trabajo fue evaluar los mecanismos empleados por M para interferir la respuesta CTL. Métodos: Se cultivaron CM provenientes de Buffies durante 5d con las cepas M o 410, y se marcaron con PE-Cy5 anti-CD8. Además, se marcaron con CFSE a Mac autólogos pulsados con *Mtb* y se mezclaron con las CM durante 4h. Se evaluó la formación de conjugados Mac-CD8 por citometría de flujo. A su vez, se evaluó la expresión intracelular de perforina, granzima B, granzulina y RANTES y en superficie de ICAM-1 y LFA-1 en CD8, y de ICAM-1 en Mac. Resultados: M indujo menos %Perforina⁺ en CD8⁺ que 410 (p<0,05). M y 410 indujeron %GranzimaB⁺ o Granzulina⁺ similares, pero M indujo mayor MFI de GranzimaB (p<0,05) y Granzulina. Por otra parte, los conjugados Mac-CD8 fueron menos frecuentes con la estimulación de M que con 410 (p<0,05). M indujo menos %RANTES en CD8. M y 410 indujeron una expresión (MFI) de LFA-1 similar en CD8⁺, mientras que M indujo menos %ICAM-1⁺ en CD8⁺ que 410 (p<0,05), y similar MFI en Mac. Discusión: La falta de lisis de Mac pulsados con M podría deberse a una maduración alterada de CTL con bajos niveles de perforina, molécula esencial para la formación de poros en la célula blanco y subsiguiente lisis por granzimas y granzulina. Además, la baja expresión de RANTES en CD8 podría explicar la deficiencia en la formación de conjugados. Por lo tanto, estos mecanismos de evasión podrían estar cooperando con la persistencia de la cepa M en los macrófagos.

403 (434) EL AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE IL-10 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS REGULATORIAS INDUCIDAS POR T. CRUZI ESTA ASOCIADO A LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA MEK/ERK Y ES INDEPENDIENTE DEL ESTÍMULO DE TLR2. Poncini C.¹; Gimenez G.²; Pontillo C.³; Piazzón I.⁴; González Cappa S.⁵

Facultad de Medicina¹; Dto Microbiología, Facultad de Medicina²; Dto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina³; Academia Nacional de Medicina⁴; Dto Microbiología, Facultad de Medicina⁵ <caropncn@hotmail.com>

Previamente demostramos que el estadio de tripomastigote (Tp) modula la diferenciación y funcionalidad de células dendríticas derivadas de médula ósea (CD), a un fenotipo regulatorio *in vitro*. Los Tp *per se* son malos inductores de la activación de CD, modulan la maduración por LPS, aumentan la secreción de IL-10 y afectan la capacidad de las CD de inducir alorespuesta. Estudios realizados por otros grupos muestran que *T. cruzi* señala vía TLRs. En el presente estudio, caracterizamos por Western blot la activación de ciertas vías de señalización relevantes en la diferenciación de CD, luego del cultivo con Tp vivos (Tp_v) o muertos por calor (Tp_{mc}) con o sin LPS. Por ELISA, analizamos la producción de citoquinas y como se afectó

por la ausencia de ciertos TLRs, utilizando CD de ratones TLR2 -/- y/o mutantes para TLR4 (C3H/HeJ). Los Tpv y los Tpmc aumentaron los niveles de pERK 1/2 durante el estímulo con LPS y activaron la vía de STAT3. Asimismo, observamos que los Tp sinergizan la liberación de IL-10 inducida por LPS y que la inhibición de MEK la reduce significativamente ($p < 0.001$). En paralelo, determinamos que la inhibición de MEK revierte la incapacidad de las CD regulatorias (diferenciadas con Tp+LPS) como presentadoras, observándose buena respuesta específica utilizando un antígeno no relacionado en ensayos de proliferación ($p < 0.01$). Observamos que el TLR2 no está involucrado en el sinergismo de IL-10 inducida por el parásito en presencia de LPS, como lo hace el TLR4 ($p < 0.01$). Concluimos que la vía de ERK está involucrada en el sinergismo de IL-10 inducido por Tp, que el tratamiento por calor preserva la estructura de membrana del parásito y a las moléculas asociadas a dicho fenómeno, siendo independiente de TLR2.

404 (135) LA INDUCCIÓN DE CITOQUINAS (CK) PROINFLAMATORIAS POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTB) ESTÁ ASOCIADO A FACTORES DEL HUÉSPED Y DEL GENOTIPO DE LA CEPA. Yokobori N.¹; Schierloh P.²; Geffner L.³; Sabio Y García C.⁴; Vescovo M.⁵; González Montaner P.⁶; Abbate E.⁷; Ritacco V.⁸; Sasiain M.⁹

IIHema, Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4}; Servicio de Tisioneumonología, Hospital Muñiz^{5 6 7}; Servicio de Micobacterias, ANLIS-Malbrán⁸; IIHema, Academia Nacional de Medicina⁹ <kaoru.noemi@gmail.com>

La tuberculosis multirresistente a drogas (MDR-TB) es un gran desafío para la salud pública. En Argentina se produjeron extensos brotes en la década de los 90', debido en gran medida a la irrupción de la cepa Muñiz (M). Esta cepa perteneciente al linaje Haarlem es un genotipo altamente exitoso que logró establecerse en la comunidad, mientras que la cepa 410, estrechamente relacionada con M, ha sido aislada una única vez. La MDR-TB es muy difícil de tratar; las drogas de segunda línea son menos efectivas y con frecuencia causan efectos secundarios adversos. El régimen de tratamiento se diseñó de acuerdo al patrón de resistencias que presenta *Mtb* en cada caso y la efectividad del mismo es muy variable. Nada se conoce de la respuesta inmune en estos pacientes. Nuestro objetivo fue evaluar la población de monocitos de sangre periférica (Mo) en los pacientes MDR-TB y analizar retrospectivamente si los parámetros evaluados correlacionaban con datos clínicos. Se evaluó la inducción de TNF- α e IL-1 β en Mo por las cepas M, 410 y H37Rv en pacientes MDR-TB. Como controles se estudiaron pacientes con TB sensible a drogas y dadores sanos (N). El pico de producción de TNF- α e IL-1 β fue menor en los pacientes que en los N, los cuales tuvieron una mayor respuesta frente a H37Rv (Tabla1). Resultados preliminares sugieren que la producción de TNF- α estaría asociada al genotipo del bacilo que infecta al paciente MDR. La mayor producción de IL-1 β en los Mo de MDR se asoció con un menor tiempo de negativización bacilar del esputo, lo cual sugiere un rol protector de esta CK ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que la producción de estas CK depende tanto de la cepa como del estado inmunológico del huésped. Tabla 1: Producción intracitoplasmática de TNF- α e IL-1 α en Mo (5 h de estimulación)

C	H37Rv	M	410	n	
TNF- α N	4 \pm 1	71 \pm 8	44 \pm 10*	40 \pm 9*	8
TB	10 \pm 2†	35 \pm 6†	39 \pm 6*	33 \pm 5	10
MDR	7 \pm 2	46 \pm 10	34 \pm 7*	29 \pm 7*	9
IL1- α N	5 \pm 1	81 \pm 5	50 \pm 8*	61 \pm 7*	10
TB	10 \pm 4	56 \pm 10†	48 \pm 10*	41 \pm 10*	7
MDR	11 \pm 2	42 \pm 7†	34 \pm 5	32 \pm 6	8

* $p < 0,05$ H37Rv vs M/410 † $p < 0,05$ N vs. TB/MDR-TB

405 (714) ESTUDIO DE CÉLULAS CD8+FOXP3+ ANTÍGENO ESPECÍFICAS EN GANGLIOS MESENTÉRICOS Y DECIDUA EN MODELO EXPERIMENTAL DE MALNUTRICIÓN. Sosa G.¹; Schumacher A.²; Luczak E.³; Zenclussen A.⁴; Roux M.⁵

Laboratorio de Inmunología de mucosas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Department of Experimental Obstetrics and Gynaecology, Medical Faculty, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany²; Laboratorio de Inmunología de mucosas, Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Department of Experimental Obstetrics and Gynaecology, Medical Faculty, Otto-von-Guericke University, Magdeburg, Germany⁴; Laboratorio de Inmunología de mucosas, fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁵ <gsosa@ffy.uba.ar>

Las respuestas inmunes en el tracto gastrointestinal difieren de las que ocurren en los órganos linfoides periféricos puesto que en los tejidos linfoides asociados a mucosa intestinal se observa supresión más que inmunidad activa. Publicaciones previas han demostrado que en nuestro modelo de malnutrición proteica severa al destete existen células CD8+TCR $\gamma\delta$ + antígeno-específicas para un antígeno de la dieta, dextrina. El objetivo del presente trabajo fue determinar si la regulación por células Treg o tolerancia oral, se manifestaba por las células CD4+Foxp3+, o si podía estar en parte sustituida por la presencia de CD8+Foxp3+ en tejido linfode asociado a mucosa intestinal (ganglio mesentérico, GM) y no en decidua. Para ello se utilizó el modelo experimental de inmunodeficiencia secundaria por desnutrición proteica severa al destete (pérdida del 25% del peso inicial) y posterior renutrición con caseína al 20% durante 21 días en ratas Wistar (R21). Estas ratas fueron apareadas y a los 14 a 18 días se las sacrificó para estudiar las células de GM y de la decidua por citometría de flujo. Para ello se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti CD4-FITC, anti CD8-PerCP, anti CD25-PE, anti Foxp3-APC y anti TCRgd-PE. Resultados (X \pm SE, C60 vs R21, n=5): CD4+CD25+: decidua: 4,45 \pm 0,41 vs 8,25 \pm 0,69, $p = 0,003$; GM: $p = NS$; CD4+Foxp3+: decidua: 0,30 \pm 0,04 vs 2,49 \pm 0,35, $p = 0,016$; GM: 0,08 \pm 0,02 vs 3,36 \pm 0,38, $p = 0,029$; CD8+Foxp3+: decidua $p = NS$; GM: 0,01 \pm 0,00 vs 0,58 \pm 0,08, $p = 0,036$; TCR $\alpha\alpha$ +Foxp3+: decidua y GM: $p = NS$. Conclusiones: en los animales R21 se observa: 1) aumento en decidua y en GM de las células Treg CD4+Foxp3+; 2) las células CD8+Foxp3+ no existen en decidua pero si en GM. Estos resultados sugieren que la presentación del antígeno específico en mucosa intestinal parece ser suficiente para inducir esta clase de células Treg CD8+Foxp3+. UBA B066 y MINCYT-DAAD DA0709.

405b. (67) EL COMPUESTO A (CPDA) ES UN NOVEDOSO MODULADOR DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR) CAPAZ DE INDUCIR LA ACTIVIDAD DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN (FT) GATA-3. Antunica Nogueiro M.¹; Liberman A.²; Ferraz-de-paula V.³; Castro C.⁴; De Bosscher K.⁵; Gerlo S.⁶; Haegeman G.⁷; Perone M.⁸; Arzt E.⁹

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA¹ 2; Neuroimmunomodulation Research Group, FMVZ-USP, San Pablo, Brasil³; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA⁴; Laboratory for Eukaryotic Gene Expression and Signal Transduction (LEGEST), Gent, Bélgica^{5 6 7}; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA^{8 9} <mariaantunica@fbmc.fcen.uba.ar>

Recientemente se ha caracterizado un novedoso modulador del GR, CpdA, capaz de actuar de manera disociada al interferir negativamente con la actividad de FTs (ej. NF κ B) que regulan la expresión de genes clave del sistema inmune, sin inducir la expresión de genes que contienen elementos de respuesta a GCs.

Previamente hemos demostrado que GCs inhiben la actividad transcripcional de T-bet (Th1) y de GATA-3 (Th2). A diferencia de ello, CpdA inhibe la actividad transcripcional del primero e induce la del segundo. Resulta por lo tanto interesante estudiar el efecto de CpdA sobre GATA-3 y cómo su mecanismo de acción difiere del clásico mediado por GCs. Estudiamos la regulación de GATA-3 por CpdA (10-5 M) mediante transfecciones transientes en la línea celular EL-4 (linfoma T murino) usando los elementos de respuesta de GATA-3 y regiones promotoras de IL-5 (Th2) nativas y mutadas, clonados río arriba del gen reportero de la luciferasa. Además, analizamos la participación de distintas kinasas, utilizando inhibidores específicos de PKA, JNK y p38 MAPK (H89, SP600125, SB203580) (10-50 µM), sobre la actividad de GATA-3. El grado de fosforilación y expresión de GATA-3 y p38 MAPK se analizaron por inmunoprecipitación y Western Blot y la secreción de citoquinas por ELISA. Observamos que CpdA aumenta la actividad transcripcional de GATA-3 inducida por AMPc (500 µM) sobre sus elementos de repuesta (150%, $p < 0.01$) y sobre el promotor de IL-5 (314%, $p < 0.01$), al tiempo que estimula la secreción de esta citoquina (197%, $p < 0.01$). Demostramos que CpdA induce fuertemente la fosforilación de p38 MAPK, la cual a su vez induce la actividad transcripcional de GATA-3. Datos preliminares muestran que, mediante esta vía, CpdA induciría la fosforilación de GATA-3 aumentando así su actividad transcripcional. Por lo tanto, CpdA favorecería una respuesta Th2. Estos Resultados demuestran el potencial de CpdA como droga anti-inflamatoria.

PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR 2

- 406 (295) LA SOBREENPRESIÓN DEL GEN SUPRESOR P21 INDUCE EL AUMENTO DE RAC3, SU LOCALIZACIÓN NUCLEAR Y SU ACTIVIDAD COMO COACTIVADOR DE NF-κB. Micenmacher S.¹; Alvarado C.²; Rubio M.³; Ruiz Grecco M.⁴; Fernandez Larrosa P.⁵; Costas M.⁶

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari^{1 2 3 4 5 6}
<samicen@hotmail.com>

RAC3 fue descrito originalmente como coactivador de receptores nucleares de hormonas esteroideas y se encuentra sobreexpresado en numerosos tumores. Demostramos previamente que es coactivador del factor de transcripción NF-κB y contribuye a la tumorigénesis porque tiene actividad antiapoptótica, proliferativa y capacidad transformante regulando positivamente la expresión de Vimentina, involucrada en la transición epitelio-mesenquimática. Dado que la transformación requiere arresto del ciclo celular, se quiso determinar la relación entre la proteína supresora del ciclo celular p21 y RAC3. Observamos que la sobreexpresión de p21 provoca: 1) un aumento de RAC3 de 230% comparadas con células de tipo salvaje luego de 24hs post transfección. 2) Por inmunofluorescencia se determinó que además se produce un aumento de la localización nuclear del coactivador. 3) Por ensayos reporteros de la actividad NF-κB en células HEK293 transfectadas con niveles crecientes de vector de expresión de p21 y estimuladas con TNF-α, detectamos tal como ocurre con la sobreexpresión de RAC3, que el aumento de expresión de p21 aumenta 570% y 835% los niveles de actividad de NF-κB a las 14hs y 21hs respectivamente. 4) Esto correlaciona con un aumento en la expresión de Vimentina de 1400% respecto de las células transfectadas con vector vacío a las 24hs post transfección con p21 y aún en ausencia de estímulo activador de NF-κB. Si bien resta determinar si estos efectos son una acción directa de p21 o consecuencia del arresto inducido por sobreexpresión de esta molécula, se puede concluir que en el arresto celular, uno de los mecanismos por los cuales RAC3 contribuye a la transición epitelio-mesenquimática es el aumento en sus niveles y localización nuclear, aumentando la actividad NF-κB y la expresión de su gen blanco Vimentina.

- 407 (298) LA ASOCIACIÓN DE PKA A SUS PROTEÍNAS DE ANCLAJE ES NECESARIA PARA LA INDUCCIÓN DE EVENTOS QUE CONDUCEN A LA APOPTOSIS MITOCONDRIAL EN HEPATOCITOS DEPRIVADOS DE GLUCOSA. Ferretti A.¹; Mattaloni S.²; Ochoa J.³; Larocca M.⁴; Favre C.⁵

Instituto de Fisiología Experimental, Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, CONICET, Universidad Nacional de Rosario^{1 2 3 4 5} <ferretti@ifise-conicet.gov.ar>

Previamente demostramos que la falta de glucosa induce apoptosis en hepatocitos y que la activación de esta vía depende de la actividad de PKA y de su interacción con sus proteínas de anclaje. Existen sustratos de PKA que son efectores directos de la apoptosis y cuya fosforilación puede favorecer o prevenir su efecto. La proteína pro-apoptótica Bax es fosforilada por PKA, la cual participaría en su activación y formación del canal liberador de citocromo c. Nuestro objetivo fue dilucidar los eventos que conducen a la apoptosis en hepatocitos privados de glucosa y evaluar la participación de PKA en los mismos. Para ello determinamos expresión total y mitocondrial de Bax y liberación de citocromo c al citosol, mediante inmunoblotting de las respectivas fracciones celulares, y potencial de membrana mitocondrial, utilizando un fluoróforo específico. Los hepatocitos fueron cultivados 6 h en presencia (C), o en ausencia (G0) de glucosa, con o sin el inhibidor de la interacción de PKA con sus proteínas de anclaje, Ht31. En G0, la expresión total de Bax ($133.9 \pm 9.7\%$) y la translocación a mitocondria de Bax ($136.3 \pm 12.2\%$) aumentaron significativamente respecto a C (100%, $*p < 0.05$), mientras que Ht31 previno estos efectos ($104.4 \pm 18.1\%$ y $98.7 \pm 20.7\%$, respectivamente). La falta de glucosa indujo un aumento en la liberación de citocromo c al citosol (G0: $137.9 \pm 21.0\%$ vs C: 100%, $*p < 0.05$), el cual fue prevenido por la presencia de Ht31 ($66.6 \pm 6.1\%$). Para evaluar si este aumento en la translocación de Bax a mitocondria era inducido por la fosforilación directa de Bax por PKA, inmunoprecipitamos Bax y la inmunodetectamos con un anticuerpo específico para sitios fosforilados por PKA, no observándose la presencia de Bax fosforilada. Estos resultados indican que en la apoptosis inducida por falta de glucosa en hepatocitos, Bax transloca a mitocondria, proceso que requiere la interacción de PKA con sus proteínas de anclaje y en el que Bax no es fosforilada por la misma.

- 408 (380) NUEVOS GENES REGULADOS POR BRCA1 EN CÉLULAS TUMORALES DE PRÓSTATA. De Luca P.¹; Moiola C.²; Gardner K.³; Vazquez E.⁴; De Siervi A.⁵

Laboratorio de Apoptosis y Cancer - Dpto Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires^{1 2}; *Laboratory of Receptor Biology & Gene Expression, National Cancer Institute, National Institutes of Health (NCI, NIH)*³; *Laboratorio de Apoptosis y Cancer - Dpto Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires*^{4 5} <paoladeluca81@yahoo.com.ar>

La pérdida o la mutación del gen BRCA1 (Breast Cancer susceptibility gene 1) está asociada con el 5% de los cánceres de mama hereditarios. Varios grupos de investigación, en un intento por dilucidar el mecanismo de la función supresora tumoral de este gen, identificaron numerosos roles para BRCA1 en diferentes procesos celulares, como el control del ciclo celular, la recombinación homóloga, la replicación del centrosoma, la respuesta al daño en el ADN y la regulación transcripcional. Cuando se lo descubrió en el año 1994, se le adjudicó la función de factor de transcripción, y posteriormente se determinó que BRCA1 regulaba numerosos genes involucrados en la progresión de ciclo celular y la respuesta al daño en el ADN. Sin embargo, hasta la fecha no se conoce de qué manera BRCA1 se une y regula específicamente la transcripción de esos genes. Recientemente determinamos que BRCA1 forma un complejo con las proteínas

E2F1 y Rb, el cual autoregula su propia transcripción en respuesta al estrés genotóxico. En este trabajo, utilizando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina seguida de "arrays" de promotores (ChIP-chip), mapeamos la localización de BRCA1 en los promotores a partir de células Jurkat T expuestas o no al daño genotóxico. A partir de los datos obtenidos, observamos que BRCA1 se une a 1328 genes en condición control y a 882 genes en las células expuestas al UV. Agrupando estos genes según su ontología encontramos que el 94% de los promotores están relacionados con el ciclo celular y la respuesta al daño en el ADN. Además, validamos la unión de la proteína BRCA1 a algunos de estos genes: CCNB2, BRCA2, H2AFX, BLM, MAD2L1, FEN1, H3F3B, GADD153, BRCA1, CDCA, DDB2 y GADD45; y estudiamos la regulación de la transcripción de los mismos por BRCA1 en líneas tumorales de próstata. Este es el primer estudio a gran escala que muestra la unión y regulación directa de BRCA1 a promotores esclareciendo su papel de factor de transcripción y supresor tumoral.

- 409 (455) LA HISTAMINA PROTEGE LA ESTRUCTURA Y FUNCIONALIDAD DE LA GLÁNDULA SUBMANDIBULAR FRENTE A LOS EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE.** Medina V.¹; Prestifilippo J.²; Croci M.³; Carabajal E.⁴; Bergoc R.⁵; Elverdin J.⁶; Rivera E.⁷

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)¹; Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Inmunooncología, Av. Córdoba 3200, Buenos Aires³; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)⁵; Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires⁶; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁷ <vmolina@ffyb.uba.ar>

La radioterapia de cánceres de cabeza y cuello produce efectos secundarios orales severos por disfunción de las glándulas salivales como hiposaliva y/o xerostomía. Previamente demostramos que la histamina protege el intestino delgado y la médula ósea frente al daño producido por la radiación ionizante (RI). El objetivo del presente estudio fue investigar si la histamina podía evitar las alteraciones funcionales y morfológicas producidas por la RI en la glándula submandibular (GSM). Para ello, 48 ratas fueron divididas en 4 grupos. Los grupos histamina e histamina-5Gy recibieron 0,1 mg/kg.día de histamina (s.c.) desde 24 h antes de la irradiación. Los grupos no tratado y no tratado-5 Gy recibieron una dosis de 5 Gy (fuente de ¹³⁷Cs) en cuerpo entero. 3 días post-irradiación la secreción salival inducida por metacolina fue determinada o los animales fueron sacrificados y la GSM fue pesada, fijada y coloreada con H&E para evaluar las características histológicas. Marcadores de proliferación y apoptosis fueron evaluados por inmunohistoquímica. La RI reduce significativamente la secreción salival en un 40%, efecto asociado a una disminución del peso de la GSM relativo al peso corporal (35%), a una alteración en la arquitectura del epitelio con pérdida del material secretor, anisocariosis, disminución de la proliferación y principalmente una marcada apoptosis celular. El tratamiento con histamina revirtió completamente la disminución de la salivación, conservando la masa glandular con apariencia normal y preservando la organización estructural. La histamina previene la apoptosis de las células acinares y ductales evidenciado por una disminución del número de células TUNEL-positivas por campo (19.0±3.8 vs. 106.0±12.0, P<0.001) y también aumentando la proliferación celular. Podemos concluir que la histamina protege la GSM frente al daño estructural y funcional inducido por la RI, convirtiéndose en un potencial radioprotector para pacientes tratados con RI.

- 410 (643) LA GEMCITABINA INDUCE AUTOFAGIA MEDIADA POR VMP1 Y PROMUEVE LA MUERTE POR APOPTOSIS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS.** Pardo R.¹; Lo Ré A.²; Molejón M.³; Ropolo A.⁴; Papademetrio D.⁵; Gonzalez C.⁶; Alvarez E.⁷; Iovanna J.⁸; Vaccaro M.⁹

Depto de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA.^{1 2 3 4}; Depto de Inmunología, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA.⁵; Depto de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA.⁶; Depto de Inmunología, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA.⁷; Unite 624, INSERM, Marseille, France⁸; Depto de Fisiología, Fac. de Medicina, UBA.⁹ <romipar@yahoo.com>

La autofagia es un proceso de degradación de componentes citoplasmáticos. En cáncer, la autofagia puede jugar un rol citoprotectivo o puede llevar a la muerte celular. Poco se conoce acerca del rol de la autofagia en el cáncer pancreático. Nuestro objetivo consistió en analizar la participación de la autofagia en la muerte de células de cáncer pancreático inducida por gemcitabina, la droga estándar para el tratamiento del cáncer de páncreas. En este estudio demostramos que la gemcitabina induce autofagia en las líneas tumorales pancreáticas PANC-1 y MIAPaCa-2. Este resultado fue evidenciado por la acumulación de organelas ácidas, el aumento (p<0,05) del reclutamiento de LC3 (microtubule-associated protein-1 light-chain-3) y la presencia de ultraestructura de autofagia luego de 8h de tratamiento con gemcitabina 200 µM. Este agente quimioterapéutico también indujo la muerte celular por apoptosis, detectada por morfología, aumento (p<0,05) del porcentaje de células anexina V positivas y clivado de caspasa 3 luego de 24h. Sorprendentemente, el tratamiento con 3-Metiladenina (3-MA), un inhibidor de la autofagia, disminuyó significativamente la apoptosis. En estudios previos se determinó que la proteína VMP1 (Vacuole Membrane Protein 1) induce la autofagia en células de mamíferos. Con el objeto de determinar si la expresión de VMP1 esta involucrada en el mecanismo por el cual la gemcitabina induce autofagia, se realizaron ensayos de Real Time PCR. Los resultados mostraron que el tratamiento con gemcitabina induce la expresión de VMP1 en las células PANC-1 y MIAPaCa-2. La inhibición de la autofagia mediante el silenciamiento de VMP1, por un shRNA específico, disminuyó (p<0,05) la apoptosis. Más aun, la sobreexpresión de VMP1 en las células tumorales condujo a la muerte por apoptosis. Por lo tanto se demuestra que la vía de autofagia mediada por VMP1 promueve la apoptosis en las células de cáncer de páncreas y media la citotoxicidad inducida por la gemcitabina.

INMUNOLOGIA 9

- 411 (568) ESTUDIO DEL FENOTIPO Y FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS T PRESENTES EN EL INFILTRADO LINFOCITARIO TUMORAL DURANTE LA PROGRESIÓN DE UN FIBROSARCOMA MURINO.** Machuca D.¹; Maglioco A.²; Camicia G.³; Holmberg J.⁴; Costa H.⁵; Gamberale R.⁶; Dran G.⁷

ILEX CONICET- Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5 6 7} <dgmachuca@hotmail.com>

El crecimiento tumoral suele afectar el sistema inmune del huésped generando tolerancia, la cual favorece la progresión del tumor a la vez que dificulta las terapias inmunológicas del cáncer. El fibrosarcoma MCC es un modelo ideal para estudiar la generación de tolerancia, ya que al igual que otros tumores murinos experimentales, pasa de ser fuertemente inmunogénico a tolerogénico en un periodo corto de tiempo. Un componente del sistema inmune ligado al tumor y blanco de su acción inmunosupresora es el infiltrado linfocitario (TILs); su composición determina en gran medida la inmunogenicidad tumoral. Si bien los TILs forman parte del estroma del MCC, la dinámica de infiltración y su estado no fueron estudiados. Evaluamos en primer lugar si la presencia del MCC afecta la migración leucocitaria dentro del huésped; en segundo lugar si el desarrollo del tumor afec-

ta la cantidad y fenotipo de los TILS. Transferimos esplenocitos singeneicos marcados a ratones portadores de MCC en distintas fases de desarrollo; a distintos tiempos extrajimos bazo, ganglio y tumor, y detectamos las células marcadas por citometría de flujo. Observamos su presencia en los tres tejidos en los estadios de tumor pequeño y mediano; en tumores mayores de 800 mm³ no detectamos células intratumorales a partir de las 4 horas post-inóculo. Luego, aislamos los TILS a partir del tumor mediante sedimentación en Ficoll; determinamos que los porcentajes de células T disminuyen con el crecimiento tumoral (TCD4+: 11,5±2,6 vs 4,7±2,0*** y TCD8+: 12,2±3,2 vs 4,0±0,3***, para tumores de 200-400 mm³ vs 800-1000mm³ respectivamente, ***p<0,001, n=6-7). Dentro de la población TCD4+, la proporción CD25+Foxp3+/CD25+Foxp3- fue constante independientemente del estadio tumoral. Dentro de la TCD8+ disminuyó la expresión i.c. de IFN γ a medida que el tumor crece. Los resultados sugieren que el crecimiento del tumor MCC se acompaña de una inhibición en el acceso y función efectora de leucocitos en el entorno tumoral.

412 (637) EFFECT OF FACTORS SECRETED BY MURINE MELANOMA B16 CELLS ACTIVATED VIA TLR4 ON THE MATURATION STATE OF DENDRITIC CELLS. Andreani V.¹; Crespo M.²; Morón G.³; Rivero V.⁴; Maccioni M.⁵

Depto Bioquímica Clínica. CIBICI-CONICET. Fac. Ciencias Químicas. UNC.^{1 2 3 4 5} <vandreani@fcq.unc.edu.ar>

Stimulation of murine melanoma B16 cells *in vitro* via TLR4 inhibits subsequent tumor growth *in vivo*. This could be seen in mice lacking TLR4 (TLR4^{lps-del}), indicating that TLR4 on tumor cells but not on host antigen presenting cells is involved. We hypothesize that the activation of TLR4 on tumor cells *in vitro* would induce to them functional changes that could alter the maturation state of dendritic cells (DCs) present at the site of inoculation. TLR4^{lps-del} DCs stimulated with CpG in the presence of supernatant (SN) from LPS-stimulated (SN B16+LPS) B16 cells were capable of overcoming the inhibition of activation observed when they were stimulated in the presence of non-stimulated B16-SN. The purpose of this study was to further analyze the effect of SN B16+LPS on the maturation of DC. Our results show that SN B16+LPS increases the levels of IL6, TNF α and IL12p70 produced by TLR4^{lps-del} DCs, stimulated or not with CpG, compared to the levels produced in the presence of B16-SN (p<0.05). Tumor cell SN did not have significant levels of these cytokines. We also induced tumors with B16 cells stimulated (B16 + LPS) or not with (B16 Basal) LPS in TLR4^{lps-del} mice. CD11c+ cells were isolated from spleen and lymph nodes. Interestingly, a higher percentage of CD11c+ cells, expressing increased levels of CD40 marker (p<0.05), were observed in group B16+ LPS compared to B16 Basal group. In contrast, animals of this group show a reduced percentage Gr1+CD11b+ cells in the spleen and lymph nodes of animals. Therefore, stimulation of murine melanoma cells with LPS promotes an improvement in the activation state of DCs *in vitro* and *in vivo*, and a diminished percentage in myeloid suppressor Gr1+CD11b+ cells.

413 (681) INHIBIDORES DE NF-KB Y PROTEASOMA SENSIBILIZAN LA MUERTE APOPTOTICA POR IFN DE TIPO I EN CELULAS DE UNA LINEA LINFOLASTOIDEA HUMANA. Simunovich T.¹; Papademetrio D.²; Lombardo T.³; Constantino S.⁴; Cavaliere V.⁵; Alvarez E.⁶

Cátedra de Inmunología Facultad Farmacia y Bioquímica UBA IDEHU-CONICET^{1 2 3 4 5 6} <sb_tania@yahoo.com.ar>

En leucemias de origen linfoblastoide B asociadas a EBV, la activación constitutiva del factor NF κ B promueve su sobrevivencia y facilita la evasión a la apoptosis. Los IFN tipo I presentan capacidad inmunomoduladora y antiproliferativa siendo utilizados en infecciones virales y como agentes antineoplásicos. La falta de respuesta al tratamiento con IFN tipo I en ciertas neoplasias linfoblastoides, y su susceptibilidad a inhibidores de NF- κ B y de proteasoma, ha permitido hipotetizar sobre una posible sensibilización del uso combinado. El objetivo fue evaluar el efecto de la

combinación de IFN tipo I con CAPE (ácido cafeín-fenil-etil-éster), inhibidor de NF- κ B, y MG132, inhibidor del proteasoma, sobre la proliferación celular y la inducción de apoptosis en la línea linfoblastoide B humana, PL104, EBV+. Se determinó la inhibición de la proliferación celular, por incorporación de ³H-T, a 24 y 48 hs con IFN α y b(0 a 100.000 UI/ml), CAPE (0 a 100 μ g/ml), MG132 (0 a 8 μ M) y sus combinaciones. Los resultados indicaron que los IFN α y b alcanzan una inhibición máxima de 39% y 55% (p<0.001) respectivamente a las 24hs. Siendo para las dosis de 1000 UI/ml de 18% y 33%, incrementándose al combinarlo con CAPE (15 μ g/ml) a 51% y con MG132 (1,5 μ M) a 75% (p<0.01). Mientras que a 48 hs las combinaciones alcanzan 64% y 99% (p<0.001) respectivamente. La apoptosis fue evaluada por Annexin V-FITC a 24 y 48 hs. Encontramos que los IFNs no inducen muerte apoptótica. Tampoco la combinación de cada uno (1000 UI/ml) con CAPE (15 μ g/ml) ya que los valores fueron de (2,2 ± 1,1)% con IFN α y (5,3±2,3)% con IFN β (p<0.001) a las 48 hs. En cambio, al combinarlos con MG132 (1,5 μ M) los aumentos resultaron significativos (62,0±2,3)% para IFN α y (65,7±2,3)% para IFN β (p<0.01) Se concluye que el tratamiento con IFN tipo I inhibe el crecimiento sin causar muerte apoptótica a los tiempos ensayados. Sin embargo la combinación con una dosis sensibilizante de MG132 aumenta el efecto apoptótico de los mismos.

414 (639) STUDY OF THE IMMUNE SYSTEM PARTICIPATION IN TUMOR PROGRESSION USING A 3D CULTURE MODEL OF ADENOCARCINOMA CELLS AND MACROPHAGES. Roldan J.¹; Najenson A.²; Roca F.³; Marino L.⁴; Jasnís M.⁵; Fiszman G.⁶

Instituto de Oncología¹; Area de Investigación, Instituto de Oncología "Angel H. Roffo"^{2 3 4 5 6} <julietasuyay@yahoo.com.ar>

Tridimensional cell culture (3D) as multicellular spheroids, reflect physiopathological *in vivo* conditions of tumor microregions and metastatic sites. Spheroids of the murine LM3 and human MCF-7 mammary adenocarcinoma cell lines were cultured with RAW 264.7 macrophages and human monocytes isolated from peripheral blood from normal volunteers respectively. Spheroids were maintained in culture dishes pre-treated with 1.5% agar. In both tumor models, macrophages/monocytes were added after 10-13 days spheroids growth. Control cultures were maintained as monolayers in normoxic and hypoxic conditions (hypoxic chamber 1% O₂ saturated during 4-6h). A growth curve of the spheroids were performed, reaching a peak of >300 μ m (++) at day 15. In MCF-7 model, cell viability, monocyte distribution inside spheroids and protein expression were determined by hematoxyline-eosine staining and immunohistochemistry with specific antibodies. Results showed that 3D growth followed a concentric organization of proliferant (Ki67+), quiescent (Ki67-/Bcl-2+) and dead cells (CAS+) from periphery towards the hypoxic core (HIF-1+). In LM3 spheroids an enhanced arginase activity (140,64±2,05 vs. 18,17±1,22, p<0,05) and nitric oxide (NO) levels (10,21±1,15 vs 0,55±0,50, p<0,05) were also detected compared to LM3 cells growing as monolayer. It was also detected an increased arginase activity (4 days: 60,19±12,57 vs. 13 days: 79,42±2,2) and decrease NO levels (4 days: 38,7±8,3 vs. 13 days: 10,21±1,15) during spheroids growth. These results show that arginine metabolic pathways, either by NOS or arginase, are both more activated in spheroids than in tumor cell monolayer. In MCF7 and LM3 models, HIF-1 expression was detected by western blot. Culture system in 3D appears to be an ideal model to analyze the role of hypoxia and the mechanisms that modulate interactions between tumor and immune cells.

415 (675) INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS MIELOIDES Y CÉLULAS LP07. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON INDOMETACINA. Karas R.¹; Klein S.²; Diamant M.³

Instituto de Oncología^{1 2 3} <rominah33@yahoo.com.ar>

La progresión del adenocarcinoma de pulmón murino LP07, cursa con una inflamación crónica, que es revertida al tratar los

ratones con un AINE, Indometacina (Indo), que inhibe el crecimiento del tumor primario y las metástasis espontáneas. Nuestro objetivo fue estudiar la modificación de la funcionalidad de las células mieloides (CM) por el crecimiento del tumor LP07 y el tratamiento con Indo. Se utilizaron CM de cavidad peritoneal. Determinamos. MMP-9 (zimografía), CM-N: 19.78±0.32 UA; CM-P: 28.63±0.70 UA y CM-I: 17.38±1.35 UA (CM-P vs CM-I y CM-N: p<0.001). NADPH oxidasa (Ensayo colorimétrico) Absorbancia CM-N: 0,42±0,0; CM-P: 0,90±0,04; CM-I: 0,29±0,0 (CM-N vs CM-P: p<0,001; vs CM-I: p<0,05. CM-P vs CM-I: p<0,01). MPO (ensayo de quimioluminiscencia, x 10⁶CPS): CM-N: 2±0,2; CM-P: 3±0,16; CM-I: 0,9±0,1; (CM-P and CM-I vs CM-N: p<0,01; CM-P vs CM-I: p<0,001). Oxido Nítrico (Reactivo de Griess, uM de Nitrito): CM-N: 6,5±0,85; CM-P: 2,8±0,44; CM-I: 2,47±0,07 (CM-N vs CM-P, CM-I: p<0,001). Capacidad Migratoria de LP07 (Ensayo de herida) (% del control) CM-P: 138±9; CM-I: 96±4; CM-N: 96±6. (CM-P, CM-N, CM-I vs Control=p <0.01). Capacidad Invasiva LP07 (células/campo): CM-P: 12; CM-I: 8.4±0.72, y CM-N 2.2±0.41. Las células tumorales liberan factores que modularían la actividad de las CM, induciendo la respuesta inflamatoria, promoviendo el desarrollo del tumor. Esto se refleja en la actividad de las enzimas estudiadas. Por otro lado, observamos que las CM podrían liberar factores que modifican la actividad de las células tumorales tales como la capacidad invasiva y migratoria. El tratamiento *in vivo* con un AINE, como la Indo, podría revertir parcialmente el efecto inducido por las células tumorales sobre las CM. La interacción entre las CM y las LP07 pueden transformar el comportamiento de ambas poblaciones celulares.

- 416 (438) DESARROLLO DE UNA VACUNA TERAPEUTICA CONTRA EL CANCER DE MAMA UTILIZANDO EL BLOQUEO DE LA PROTEINA TRANSDUCTORA Y ACTIVADORA DE LA SEÑAL 3 (STAT3).** Tkach M.¹; Rosembli C.²; Rivas M.³; Beguelin W.⁴; Proietti C.⁵; Diaz Flaqué M.⁶; Charreau E.⁷; Elizalde P.⁸; Schillaci R.⁹

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3 4 5 6 7 8 9}
<tkach@dna.uba.ar>

Stat3 ha sido vinculada con el desarrollo tumoral ya que promueve la proliferación y supervivencia celular. Además participa en la inmunosupresión tumoral y evasión del sistema inmune inhibiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias necesarias para la diferenciación TH1. En particular, se ha comprobado que un 69% de cánceres de mama tienen activación constitutiva de Stat3. En trabajos previos comprobamos que la proliferación mediada por progestágenos de células del tumor mamario murino C4HD depende de la activación de Stat3 tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente demostramos que la inmunización en ratones con células C4HD irradiadas que tienen bloqueada la activación de Stat3, protege al posterior desafío con el tumor parental. En el presente trabajo desarrollamos un protocolo de inmunizaciones terapéuticas, inoculando las células una vez establecido el tumor. Para ello, se inyectaron s.c. ratones hembra Balb/c con 2x10⁶ células C4HD transfectadas *in vitro* con el vector de expresión dominante negativo de Stat3 (DNStat3), Stat3Y705-F, o con el vector vacío (pcDNA 3.1) e inactivadas por irradiación, a los días 5 y 19 post desafío con el tumor C4HD salvaje (tumor de 0,5mm³). Se monitoreó el crecimiento tumoral y se observó una inhibición del 46,6±9,0% en los ratones inmunizados con las células C4HD-DNStat3 con respecto al grupo vector vacío a los 35 días post desafío (5 animales/grupo, n° experimentos=3). Observamos un aumento en el porcentaje de células T CD8⁺ y células Natural Killer (CD3-DX5⁺) infiltrantes del tumor en el grupo C4HD-DNStat3, determinado por inmunofluorescencia y citometría de flujo. No observamos cambios en los porcentajes de ninguna de estas poblaciones en ganglios drenantes. Nuestros resultados sugieren que la inoculación de células de cáncer de mama que tienen la activación de Stat3 bloqueada fue efectiva para inhibir parcialmente el crecimiento de un tumor de mama establecido.

- 417 (531) REGRESIÓN COMPLETA DE TUMORES MURINOS ESTABLECIDOS POR UNA DOSIS SUBTÓXICA DE CICLOFOSFAMIDA SEGUIDA DE INMUNOTERAPIA A BASE DE TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CÉLULAS DEL GANGLIO DRENANTE DEL TUMOR.** Maglioco A.¹; Machuca D.²; Mundiñano J.³; Camicia G.⁴; Dran G.⁵

ILEX CONICET-Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5}
<afmag313@yahoo.com.ar>

Los tumores suelen afectar el sistema inmune del huésped generando tolerancia inmunológica, la cual no sólo favorece su progresión sino que dificulta las terapias inmunológicas del cáncer. Con el fin de estudiar los mecanismos responsables de la tolerancia, investigamos el impacto del crecimiento de un tumor murino experimental sobre el número, fenotipo y función de células T, B y dendríticas presentes en los ganglios linfáticos drenantes y distales del tumor. El tumor utilizado, MCC, es un fibrosarcoma inducido por metilcolantreno que pasa de ser inicialmente inmunogénico a inducir tolerancia una vez superado un volumen de aproximadamente 500 mm³. En base a los hallazgos, elaboramos tratamientos destinados a reducir los elementos regulatorios (en nuestro sistema, CD4+Foxp3+ -Tregs- y células B productoras de IL10) y a aumentar aquellos antitumorales. Obtuvimos resultados favorables con un tratamiento de tres pasos: una dosis baja de ciclofosfamida (50 mg/kg), la extirpación del ganglio drenante del tumor a partir del que expandimos en cultivo con anti-CD3 e IL2 células efectoras, y la transferencia adoptiva de estas (3x10⁶ e.v.) al animal portador de tumor del que se extrajo el ganglio. Antes de la transferencia, la composición del cultivo fue 78,3±0,02% TCD4⁺ y 22,2±5,4% TCD8⁺, y se observó citotoxicidad MCC-específica *in vitro*. Tratamos con este esquema a ratones portadores de MCC (150 a 300 mm³) obteniendo la regresión completa de 64,7% de ellos, 14 a 25 días post inicio del tratamiento. Las células transferidas mostraron citotoxicidad anti-MCC *in vivo* y fueron detectadas en ganglios y bazo 6 días después. La ciclofosfamida per se no afectó el tamaño tumoral pero disminuyó el 50% de células Tregs y el 60% de linfocitos B dentro del ganglio drenante. La transferencia adoptiva sin ciclofosfamida fue menos eficiente que el tratamiento completo. Consideramos que este tratamiento tiene relevancia clínica dados su condición sistémica, alta eficacia y baja toxicidad.

- 418 (741) INTRATUMORAL INJECTION OF LPS REDUCES MELANOMA GROWTH IN TLR4 DEFICIENT MICE.** Andreani V.¹; Rivero V.²; Maccioni M.³

Depto Bioquímica Clínica. CIBICI-CONICET. Fac. Ciencias Químicas. UNC.^{1 2 3} <vandreami@fq.unc.edu.ar>

Local TLR stimulation has long been considered an attractive approach to induce antitumor immunity. Intra or peritumoral injections of LPS, alone or in combination with other agents, have been reported to induce significant arrest of tumor growth due to the activation of antigen presenting cells present in the tumor. We have previously demonstrated that melanoma B16 cells stimulated *in vitro* with LPS (1 µg/ml) for 48 h prior to their inoculation inhibits tumor growth *in vivo*, increasing the survival of tumor-bearing mice. This inhibition could be seen in mice lacking TLR4 (TLR4^{lps-del}), indicating that this effect depends exclusively on the presence of TLR4 on the tumor cell. To further evaluate the particular contribution of TLR4 present on tumor cells in antitumoral response we set up two different experimental designs. In the first approach (group 1), C57BL/6 and TLR4^{lps-del} mice were inoculated with 1 x 10⁶ B16 cells and on the day after, 1 µg of LPS was injected intratumorally every other day until day 12. In the second (group 2), 1 µg of LPS was injected intratumorally once the tumors had reached a volume of 5 mm³. These injections were repeated 6 times. In both settings, mice were injected with PBS as control. Tumor volume was monitored every day. In both experimental models and mice strains, we observed a reduced tumor growth in animals treated with LPS. Therefore, we conclude that there is an effect mediated by TLR4 present on tumor cell themselves, that could also promote an antitumoral immune response.

419 (563) INMUNOEDICIÓN TUMORAL EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA. Cáceres J.¹; Zacarías Fluck M.²; Rico M.³; Lattante R.⁴; Sacchi L.⁵; Scharovsky O.⁶; Di Masso R.⁷; Rozados V.⁸

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR^{1 2 3}; Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR⁴; 4Patología General y Especial Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario⁵; Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR; CIC-UNR^{6 7}; Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR⁸ <jmccaceres2000@gmail.com>

La inmunoedición comprende el potencial protector del huésped y las características del tumor esculpidas por el sistema inmune durante el desarrollo tumoral y consta de tres fases: equilibrio, eliminación (EI) y escape (Es). El adenocarcinoma de mama M-406 surgió espontáneamente en la línea CBi. CBi/LFS es una línea de ratones producida por apareamiento hermano por hermana a partir de la línea CBi/L, seleccionada por conformación corporal a partir de CBi. Cuando M-406 se inocula en CBi muestra 100% de toma, 0% de regresión y 100% de letalidad, comportamiento homogéneo coherente con su condición de línea con endogamia máxima. En CBi/L FS se observa 100% de toma, crecimiento y luego algunos tumores escapan del equilibrio huésped-tumor y se tornan letales mientras que otros son eliminados, comportamiento asimilable a las tres etapas de la inmunoedición. Con el objetivo de validar la hipótesis de inmunoedición tumoral se desafiaron ratones CBi/L FS (n=8) en forma s.c. con el M-406. Cuando los tumores se encontraban en Es o EI se extirparon y fueron inoculados en animales CBi (n=6/grupo): GI que recibió tumor en EI; GII en Es y GIII M-406 proveniente de CBi. Se determinó el volumen tumoral (Vt) cada tres días. Los datos se ajustaron con un modelo exponencial creciente de la forma $V_t = S \cdot \exp[k \cdot t]$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de crecimiento (k) entre grupos, [intervalos de confianza del 95%: EI: (0,1987-0,2196); ES: (0,2010-0,2305); CBI: (0,1668-0,2259)]. El período de latencia (tiempo transcurrido hasta que el tumor comienza un franco crecimiento exponencial, inversamente proporcional a S) mostró la secuencia GI>GII>GIII [intervalo de confianza del 95% EI: (0,3149-0,8217); ES: (3,008-7,443); CBI: (7,61-5465), P<0,001]. Estos resultados preliminares sugieren la posible inmunoedición de M-406 en CBi/L que se traduce en los diferentes patrones de crecimiento observados posteriormente en la línea de origen del tumor (CBi).

420 635) TUMOR INDUCED SENESCENCE T-LYMPHOCYTES (TIST): PHENOTYPE AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION. Ramello M.¹; Acosta Rodriguez E.²; Montes C.³

CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. UNC^{1 2 3} <cramello@fq.unc.edu.ar>

Senescent T cells are reported to be increased in patients with cancer and are a poor prognostic indicator. Premature senescence is a form of cellular dysfunction that leads to the demise of the cell. Previously we demonstrated that a high percentage of human T cells from healthy donors incubated with different tumor cell lines for short time at a 1:1 Tumor /T cell ratio and then cultured for 7 days, undergo senescence as judged by the incremental loss of CD27 and CD28 expression and telomere shortening. Herein we show that CD4+ and CD8+ T cells from healthy donors were equally susceptible to undergo senescence after co-incubation with Tumor cell lines. By flow cytometry we evaluated the expression of molecules associated with activation, co-stimulation and regulation in TIST lymphocytes. We observed that a 70%±11 of CD8+CD28-CD27- TIST cells expressed CD45 RA while only 25%±13 of CD4+CD28-CD27- expressed this marker. Neither CD4+ nor CD8+ TIST lymphocytes expressed CD62L. CD4+ and CD8+ TIST cells exhibited higher percentage of PD-1+ cells than control (T cells without tumor co-incubation) (CD4: TIST 26%±5,6 vs control 13,5%±0,7; CD8: TIST 20%±1,4 vs control 6,5%±0,7). Evaluation of INF gamma expression by flow cytometry after PMA/

iono stimulation showed a higher percentage of INF gamma+ cells in CD4+ and CD8+ TIST lymphocytes than in control T lymphocytes. Altogether, these results demonstrated that TIST lymphocytes show a typical phenotype of experienced T cells commonly increased in patient with different cancer as well as chronic infections.

421 (394) COOPERACIÓN SINÉRGICA ENTRE INMUNOMODULACIÓN CON CICLOFOSFAMIDA (CY) E INMUNOTERAPIA GÉNICA CON INTERLEUQUINA-12 (IL-12) EN LA ERRADICACIÓN DE TUMORES DE COLON EN UN MODELO EXPERIMENTAL MURINO. Malvicini M.¹; Rizzo M.²; Atorrasagasti C.³; Piñero F.⁴; Alaniz L.⁵; García M.⁶; Aquino J.⁷; Rozados V.⁸; Scharovsky O.⁹; Matar P.¹⁰; Mazzolini G.¹¹

Unidad de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral^{1 2 3 4 5 6 7}; Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario^{8 9 10}; Unidad de Terapia Génica, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral¹¹ <mariana.malvicini@gmail.com>

Previamente demostramos que la combinación de Cy y posterior terapia génica con IL-12 mediante un vector adenoviral (AdIL-12) posee un efecto antitumoral sinérgico en un modelo de adenocarcinoma de colon murino (CT26). El objetivo del presente trabajo fue evaluar los posibles mecanismos inmunológicos involucrados en la mayor potencia terapéutica del tratamiento combinado. Se inocularon células CT26 (5x10⁵) vía s.c. en ratones macho BALB/c (día 0). Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 85 mm³ (día 7) recibieron, de manera individual o combinada, los siguientes tratamientos: Cy (dosis única, 50 mg/kg/i.p) y/o AdIL-12 (dosis única, 10⁹ TCID50/24hs post-Cy/i.t). Se incluyeron controles tratados con Ad-b-galactosidasa (con o sin Cy) y un grupo salino. Se monitoreó la respuesta inmune mediante la determinación de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo en sangre y bazo, y ensayos de citotoxicidad y proliferación celular. La combinación Cy+AdIL-12 produjo una reducción significativa en el porcentaje de linfocitos T reguladores periféricos y esplénicos (7.9% y 6.0%, respectivamente) (p<0.05 vs. grupo salino), e indujo un aumento en el porcentaje de células dendríticas esplénicas activadas (4,8%, p<0,05 vs. Cy y grupo salino) y de linfocitos T CD4+ productores de INF-g(6.3%; p<0.01, vs. Cy, AdIL-12 y grupo salino). Además, el tratamiento combinado incrementó significativamente la tasa de proliferación linfocitaria e indujo una mayor respuesta citotóxica específica respecto a cada tratamiento individual. El examen histológico evidenció extensas zonas de necrosis e infiltrado inflamatorio y un aumento en el número de células apoptóticas en el grupo combinado. Se concluye que el efecto antitumoral sinérgico del tratamiento combinado con Cy y AdIL-12 podría deberse, al menos en parte, a la exacerbación de la respuesta inmune antitumoral, a través de la eliminación de mecanismos supresores y activación de la respuesta inmune celular específica.

422 (137) EXPRESIÓN DE LA ENZIMA PPGALNAC-T6 Y ANTÍGENOS ASOCIADOS A MUCINAS EN EL TEJIDO NORMAL Y LESIONES HIPERPLÁSICAS DEL EPITELIO DE LA CAVIDAD ORAL. Rabassa M.¹; Pereyra L.²; Segaleiras A.³; Croce M.⁴

CINIBA, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP^{1 2 3 4} <mrabassa@atlas.med.unlp.edu.ar>

La O-glicosilación de mucinas se encuentra alterada tempranamente en los tumores malignos y en muchas de las lesiones consideradas premalignas. Esta se inicia por la acción de las ppGalNac transferasas, entre las cuales ppGalNac-T6 se encuentra sobre-expresada en numerosos tumores malignos. Objetivo: Analizar la expresión de la enzima ppGalNac-T6 en tejido normal y lesiones hiperplásicas del epitelio de la cavidad oral y su relación con la expresión de antígenos del grupo T-Tn asociados a mucinas. Materiales y Métodos: Biopsias de epitelio normal de 8 individuos e hiperplasias de 20 pacientes. Cada muestra fue divi-

dida en dos y estudiada por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. Se usaron anticuerpos monoclonales que reconocen las enzimas ppGalNAc T6 y T3, antígenos Tn, sialil Tn, TF y la mucina MUC1. Las líneas celulares KB y MCF7 se emplearon como controles. Se realizó un análisis de componente principal (ACP) para evaluar la relación entre los antígenos en estudio y con las variables de sexo, edad, sublocalización, consumo de tabaco e inflamación. Resultados: ppGalNAc-T3 se expresó en 8/8 (100%) de las muestras normales y 17/20 (85%) de las hiperplasias; ppGalNAc-T6 en 1/8 (13%) y 3/20 (15%), respectivamente; MUC1 en 2/7 (29%) y 4/18 (22%); Tn 2/7 (29%) y 5/18 (28%); sTn 3/7 (43%) y 12/18 (67%) y TF en 4/7 (57%) y 7/18 (39%). No se observaron diferencias significativas de expresión entre muestras normales e hiperplásicas. El ACP demostró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la expresión de ppGalNAc-T6 y MUC1 con biopsias obtenidas de epitelio del carrillo (no queratinizado), mientras que la expresión de los antígenos Tn, sTn y TF no mostró relación con ppGalNAc-T6 y sólo una asociación marginal con el consumo de cigarrillos (Tn, $p = 0,055$). Conclusión: La expresión de ppGalNAc-T6 y MUC1 en la cavidad oral se relacionaría con el tipo de epitelio (no queratinizado) y, por lo tanto, varía según la localización.

423 (678) TYPE I IFN BETA IS HIGHLY UP-REGULATED 24 HOURS AFTER STIMULATION OF MURINE MELANOMA B16 CELLS WITH A TLR4 LIGAND. Nuñez N.¹; Andreani V.²; Rivero V.³; Maccioni M.⁴

Depto. Bioquímica Clínica. CIBICI-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. UNC^{1 2 3 4} <nunuez@fcq.unc.edu.ar>

Stimulation of murine melanoma B16 cells with LPS (1 μ g/ml) via TLR4 for 48 h *in vitro* inhibits subsequent tumor growth *in vivo*. This inhibition is not due to a direct effect of TLR4 signaling on the proliferation or apoptosis of tumor cells; it is not observed in athymic nude mice and remains in TLR4-deficient mice (C57BL/6 TLR4^{lps-def}). This indicates that the immune system is involved in this phenomenon and depends on the presence of TLR4 on tumor cells and not in cells from the host. We hypothesize that activation of the TLR4 pathway *in vitro* in tumor cells induces functional changes in these cells, modifying the local milieu at the site of inoculation of the tumor, and thus changing the type of anti tumoral immune response. To test this hypothesis, the relative mRNA expressions of adaptors and effectors of TLRs and other genes related to TLR-mediated signal transduction were analyzed with a mouse NF κ B Signaling Pathway RT² Profiler™ PCR Array (SA Biosciences). cDNA obtained from B16 cells stimulated with ultrapure LPS at different times (0, 6 and 24 h) was amplified by qPCR and the results were analyzed following the 2- $\Delta\Delta$ C_T method. Whereas more than a 6 fold-induction was observed for the NF κ B mediator genes after 6h stimulation (Nfkb1, Nfkb2, Nfkbia, Nfkbib, RelA, MyD88 and others), most of the effector molecules were induced after 24 h post-stimulation (IL6 400x, CCL2 6x, GM-CSF 6x, TNF α 13x). Interestingly, more than a 450 fold induction of IFN type I beta was observed and also of other genes from the IRF pathway (Cxcl10 160x, Irf1 11x). Since IFN type I has been suggested to be an important modulator of DC activity, we hypothesize that its induction could positively modulate the anti tumoral immune response.

424 (642) RECHAZO DE UN LINFOMA T MURINO TRÁS LA INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS TUMORALES TRANSFECTADAS CON MOLÉCULAS COESTIMULADORAS DEL RECEPTOR T. Di Sciuillo M.¹; Herschlik L.²; Waldner C.³; Mongini C.⁴

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos-CONICET- UBA^{1 2 3 4} <pauladisciuillo@yahoo.com.ar>

La falta de antígenos asociados al tumor definidos y su baja inmunogenicidad ha llevado a que los protocolos de investigación clínica utilicen como fuente de antígenos tumorales a las células neoplásicas irradiadas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial inmunoestimulante de las moléculas coestimuladoras del receptor T en la respuesta inmune antitumoral. Se inocularon por

vía i.p lotes de 5 a 10 ratones BALB/c inmunocompetentes con 1x10⁶ células del linfoma T singeneico LBC, irradiadas con 3000 cGy sin transfectar o transfectadas para expresar CD40, CD40L y la combinación de iguales proporciones de CD40, CD40L y CD80, o con PBS como control. Se siguió un plan de 2 inoculaciones con intervalos de 7 días. A los 7 días de la última dosis se desafió con 1x10⁶ el tumor LBC. Todos los grupos inmunizados rechazaron el tumor. En los grupos inoculados con LBC.CD40L y con la combinación de las 3 moléculas se observó un porcentaje de sobrevida entre el 40 y el 60%, resultando el mejor grupo, el LBC.CD40 con un rechazo entre 70 y el 100%, mientras que el 55 al 70% de los ratones del grupo LBC sin transfectar rechazó el tumor. Los ratones inmunizados con LBC presentaron una diferencia significativa de sobrevida respecto a los desafiados ($p < 0,0374$), al igual que los lotes experimentales LBC.CD40 ($p < 0,0067$) y LBC.CD40L ($p < 0,0499$) (Log Rank test). Además, se observaron niveles superiores de IFN-g en el sobrenadante esplenocitos del grupo inmunizado con LBC.CD40 (473pg/ml), LBC.CD40L (310pg/ml) y la inoculación combinada (266pg/ml) respecto al grupo LBC (49pg/ml), y el normal (44pg/ml). Asimismo, la citotoxicidad específica por el método de Jam fue del 19% para LBC.CD40, 14% para LBC y 7% para los ratones normales. Por lo tanto, la inmunización con células transfectadas con CD40 e irradiadas tiene un efecto protector, prolongando la sobrevida de los ratones inmunizados respecto de los ratones inmunizados con LBC y sin inmunizar.

425 (621) IMMUNOSUPPRESSIVE PROFILE OF A MURINE LUNG ADENOCARCINOMA IS REVERSED BY INDOMETHACIN. Blidner A.¹; Salatino M.²; Karas R.³; Jasniz M.⁴; Rabinovich G.⁵; Diament M.⁶; Klein S.⁷

Instituto de Oncología Angel H Roffo¹; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental²; Instituto de Oncología Angel H Roffo^{3 4}; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental⁵; Instituto de Oncología Angel H Roffo^{6 7} <bioada@hotmail.com>

Tumor -induced immune suppression is widespread in patients and experimental animals with malignant tumors and is likely to be a significant impediment to immunotherapy. Multiple mechanisms are thought to facilitate this suppression, being Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) and T regulatory cells (Treg) major contributors. Our aim was to analyze the immunological status of BALB/C mice bearing LP07(COX⁺) lung tumor (TBM) and treated with Indomethacin, an unspecific COX inhibitor. We determined 1) The content of MDSC and Treg in lymphoid organs (Spleen, Tumor draining lymph nodes-TDLN-) and tumor tissue at different times in tumor development, by FACS; 2) Arginase activity in lung, spleen, liver and tumor measured as μ g Urea/mg protein; 3) Specific DTH response with formalinized LP07 cells by the foot pad swelling assay. Results: the percentage of MDSC (CD11b+ Gr1+) augmented significantly in the spleen in advanced stages of tumor progression (33 days) (Normal: 2,57; TBM 10 days: 2,375; TBM 20 days: 5,6; TBM 33 days :8,33, $p < 0,05$ vs Normal), while this effect was prevented with Indo treatment (4,6%). Tregs (CD25⁺FOXP3⁺CD4⁺) intratumor frequency peaked at 20 days of tumor growth. Moreover, Tregs frequency decreased significantly in TDLN with Indo treatment ($p < 0,05$). Arginase activity increased in every tissue of TBM compared to normal mice. Specific DTH response decreased in late stages of tumor evolution, while Indo treatment reversed this inhibition (TBM: 0,06 \pm 0,045; Indo: 0,14 \pm 0,038). Conclusion: In our model the increase in MDSC along tumor growth correlates with the specific immunosuppression shown by DTH and with increased arginase activity. We suggest Indo treatment reversed immunosuppression by modulating COX activity, which is known to activate MDSC and differentiate Tregs.

426 (648) MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR LIPOARABINOMANANOS DE MICOBACTERIAS EN TERNEROS. Colavecchia S.¹; Jolly A.²; Fortuny M.³; Fernández B.⁴; Fontanals A.⁵; Fernández E.⁶; Mundo S.⁷

Inmunología Facultad de Ciencias Veterinarias UBA^{1 2 3 4 5} ; Clínica de Ruminantes Facultad de Ciencias Veterinarias UBA⁶ ; Inmunología Facultad de Ciencias Veterinarias UBA⁷ <scolave@yahoo.com.ar>

Las micobacterias inactivadas son reconocidas como buenas inductoras de respuesta inmune. Sin embargo, su utilización como adyuvantes de vacunas se encuentra restringida sólo a nivel experimental debido a fuertes reacciones locales y su interferencia en el diagnóstico de tuberculosis en la especie bovina. Hipotetizando que algunos componentes de las paredes de las micobacterias pueden modular la respuesta inmune sin generar reacciones adversas, nuestro objetivo fue caracterizar la inmunomodulación ejercida por el lipoarabinomano (LAM), de *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. Se evaluó la respuesta inmune humoral y celular frente a ovalbúmina (OVA) en 21 terneros (provenientes de campos libres de tuberculosis) inmunizados utilizando adyuvante de Freund incompleto (AFI) (Sigma) con o sin el agregado de LAM. Se inmunizaron los días 0, 21 y 42 con: grupo **G-LAM**: OVA (1mg), en AFI LAM (1mg); **G-NT**: OVA (1mg) en AFI y grupo control **G-C**: PBS en AFI. Se estudió la respuesta linfoproliferativa frente a ConA y OVA. Se identificaron las subpoblaciones linfoides CD4, CD8 y CD25 por citometría de flujo. Los niveles de anticuerpos específicos frente a OVA y la isotipificación se realizaron por ELISA. Se realizó la intradermorreacción (IDR) con PPD_B y OVA. G-LAM mostró mayor respuesta celular frente a OVA ($p=0.001$) comparados con las respuestas detectadas en G-NT y GC. En G-LAM se detectó un porcentaje mayor de linfocitos CD25⁺ periféricos ($p=0.03$). Los niveles de anticuerpos específicos fueron similares en los grupos G-LAM y G-NT y la relación IgG1/IgG2 (G-NT: 1.15 y G-LAM: 0.863) mostró la inducción hacia el perfil Th1. Las IDRs arrojaron resultados negativos en todos los grupos. Nuestros resultados indican que el LAM aumenta la respuesta inmune celular frente a OVA sin interferir con el diagnóstico *in vivo* de tuberculosis en terneros. El efecto modulador producido por LAM podría ser de utilidad en la formulación de vacunas que requieren un aumento de la respuesta inmune celular.

- 427 (202) ELEVADO NIVEL DE PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS DE RESPUESTA INNATA DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE FABRY.** De Francesco P.¹; Fossati C.²; Rozenfeld P.³

LISIN, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP^{1 2 3} <nicolasdefrancesco@gmail.com>

La enfermedad de Fabry (EF) es un desorden genético X-ligado, caracterizado por la deficiencia en la actividad de la enzima lisosomal α -galactosidasa A, que conduce a la acumulación de glicolípidos neutros, siendo la globotriaosilceramida (Gb3) el más importante. Siendo su fisiopatología compleja, se ha sugerido como uno de sus factores la existencia de un estado proinflamatorio crónico, similar al hallado en otras enfermedades de almacenamiento lisosomal. El objetivo del presente trabajo es analizar los niveles de producción de citoquinas proinflamatorias en células de la inmunidad innata de sangre periférica (SP) de pacientes con EF, tanto en un estado basal como ante un estímulo proinflamatorio. Partiendo de SP de pacientes y de individuos normales, se aislaron células mononucleares en gradiente de Ficoll y se las cultivó por 14 hs con el agregado de brefeldina A y en presencia o ausencia de LPS. Posteriormente se marcaron las células con anticuerpos específicos para marcadores de superficie (CD56, CD3, LIN1, HLA-DR, CD14) y para citoquinas intracitoplasmáticas (IL-1b, IL-6, y TNF α), y se analizó finalmente mediante citometría de flujo. Se hallaron niveles basales de IL-1b significativamente aumentados ($p<0,05$) en las células dendríticas de pacientes con EF, con respecto a los controles normales, junto con un leve aumento en los niveles basales de TNF, y una tendencia a una mayor respuesta de las tres citoquinas ante LPS. En monocitos se observó un nivel basal significativamente aumentado de IL-6 ($p<0,05$), un aumento leve de los niveles basales de IL-1by, ante el estímulo de LPS, una tenden-

cia de respuesta exacerbada para IL-6 e IL-1b y disminuida para TNF, respecto de los controles normales. En células NK no pudieron registrarse diferencias significativas. Las alteraciones observadas en la producción de estas citoquinas son compatibles con la presencia de un estado proinflamatorio subyacente a la EF.

- 428 (589) LAS CÉLULAS ESTROMALES DE LOS GANGLIOS LINFÁTICOS INCREMENTAN LA SOBREVIDA IN VITRO DE CÉLULAS T REGULATORIAS CD4+.** Camicia G.¹; Badano M.²; Lorenzo D.³; Maglioco A.⁴; Piazzon I.⁵; Nepomnaschy I.⁶

ILEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5 6} <gabrielacamicia@yahoo.com.ar>

El estroma de los ganglios linfáticos (GL) provee el microambiente apropiado para el funcionamiento y la regulación de las células del sistema inmune. Las células estromales (CE) de los GL sintetizan la matriz extracelular (ECM) y secretan diversas citoquinas y quemoquinas. Con el objeto de investigar el efecto de las CE sobre la apoptosis y proliferación de células T regulatorias CD4⁺, desarrollamos cultivos de CE de GL. Incluimos CE de ratones wild type (wt) y CTL^{nkt/nkt} (nkt), ya que los GL de éstos últimos muestran un aumento en las proteínas de la ECM que correlaciona con un incremento en el número absoluto de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Dado que en los GL el 90% de las células CD4⁺CD25⁺ expresan Foxp3, incubamos por 48 hs células naives de GL en presencia o ausencia de CE y, luego de confirmar la expresión de Foxp3, evaluamos el porcentaje (%) de apoptosis en la población CD4⁺CD25⁺ (Treg). La presencia de CE disminuyó significativamente el % de apoptosis *in vitro* de células Treg, en forma dependiente de la concentración de CE y sin observarse diferencias entre CE nkt y wt: media % anexina V⁺ en Treg \pm DS, n=3: CE_{nkt}: 23 \pm 8; CE_{wt}: 29 \pm 6; sinCE: 59 \pm 3; CE vs sinCE $p<0,001$. Ensayos con células CD4⁺CD25⁺ purificadas arrojaron resultados similares. En presencia de transwells sólo se observó una leve disminución en el % de apoptosis. El aumento en la supervivencia de las células Treg cocultivadas con CE correlacionó con un aumento en la expresión de Bcl-2: media IFM Bcl-2 en Treg \pm DS, n=3: CE_{nkt}: 97 \pm 17; CE_{wt}: 99 \pm 6; sinCE: 65 \pm 3; CE vs sinCE $p<0,001$. No detectamos proliferación basal de células Treg cultivadas con o sin CE. Estos resultados indican que el cocultivo con CE aumenta la viabilidad de las células Treg *in vitro*. Este efecto involucra a la molécula antiapoptótica Bcl-2 y es dependiente del contacto con el estroma. Estos resultados podrían constituir un valioso aporte para el cultivo de células Treg, herramienta de importancia en el desarrollo de terapias inmunológicas.

- 429 (738) PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FLAGELINA.** Hiriart Y.¹; González Maciel D.²; Serradell M.³; Rumbo M.⁴

Laboratorio de Investigaciones en el sistema inmune-LISIN-Fac.Cs Exactas-UNLP^{1 2} ; Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos-CIDCA-CONICET³; Laboratorio de Investigaciones en el sistema inmune-LISIN-Fac.Cs Exactas-UNLP⁴ <yanhiriart@biol.unlp.edu.ar>

Flagelina constituye el flagelo bacteriano y es reconocido por los receptores de inmunidad innata TLR5, Naip5 e IPAF, por lo que resulta un candidato para ser empleado como adyuvante vacunal. Usualmente se purifica a partir de una suspensión bacteriana densa por desprendimiento mecánico de los flagelos y posterior recuperación por ultracentrifugación. Las preparaciones de flagelina pueden resultar contaminadas con LPS u otros productos microbianos activadores de otras vías de la respuesta innata. El objetivo de este trabajo es producir y caracterizar anticuerpos monoclonales (AcMo) anti flagelina, a fin de mejorar los sistemas de purificación disponibles. Se inmunizaron vía s.c. ratones BALB/c con 1 μ g FliC (procedente de *S. typhimurium*) en hidróxido de aluminio en 300 μ l PBS (días 0 y 15). Se aplicó un boost a día 30 con 1 μ g FliC en 300 μ l PBS. Al día 33: se realizó la fusión. Se obtuvieron 4 hibridomas en distintas fusiones que fue-

ron subclonados, producidos en cantidad y purificados en columna de proteína A. Los AcMo 2D11A1 son isotipo IgG2a mientras que 2B3H10, 4C1H7 y 5B4H2 resultaron isotipo IgG1. No se observó reactividad por ELISA contra flagelinas de otras especies microbianas distintas a la de *S.typhimurium*. En ELISA contra FliCD3, una variante carente del dominio antigénico, 2B3H10 y 4C1H7 resultaron positivos. Se evaluó la capacidad de bloqueo de actividad biológica de FliC sobre células caco-ccl20-luciferasa. 2B3H10 y 4C1H7 bloquearon el efecto de flagelina, aunque 4C1H7 lo hizo a concentraciones mayores, indicando diferencias en la interacción. Empleando los AcMo biotinilados en ELISA de competición, no se observó desplazamiento entre los distintos AcMo obtenidos por lo que podría descartarse el reconocimiento de epitopes solapados. En conclusión, se obtuvieron y caracterizaron 4 monoclonales anti-FliC de especificidad adecuada para ser utilizados en cromatografía de afinidad a fin de mejorar las preparaciones de flagelina obtenidas en nuestro laboratorio

METABOLISMO Y NUTRICION 3

- 430 (74) FERRITINA SÉRICA Y RECEPTOR SOLUBLE DE TRANSFERRINA EN UN GRUPO DE VARONES DADORES DE SANGRE. RELACIÓN CON CARACTERÍSTICAS DE LA DIETA.** Langini S.¹; Lardo M.²; Fleischman S.³; Rey J.⁴; Ceballos M.⁵; Lazarowski A.⁶; Río M.⁷

Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)¹; Sección Hematología. Depto Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)²; Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)³; Servicio de Hemoterapia. Htal de Clínicas (UBA)⁴; Sección Hematología. Depto Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)⁵; Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA); CONICET⁷ <slangini@ffyba.uba.ar>

En Argentina la Ley N° 25630/2002 establece la obligatoriedad de fortificar la harina de trigo con diversos micronutrientes, entre estos Hierro (Fe) (30 mg/kg). Debido al alcance masivo de la medida, hemos iniciado un estudio multicéntrico y prospectivo del perfil bioquímico respecto del Fe en individuos adultos de la población. Se presentan datos de ferritina sérica (FS), indicador por excelencia de depósitos de Fe en ausencia de infecciones, procesos inflamatorios, o enfermedades crónicas, y del receptor soluble de transferrina (RsT) que permite estimar la magnitud del déficit funcional de Fe cuando los depósitos se han deplecionado. El estudio se realizó en suero obtenido de 406 varones dadores de sangre (18-64 años) asistentes al Servicio de Hemoterapia, Hospital de Clínicas (UBA) durante 2005, 2007 y 2008. FS se midió por IMMULITE Ferritin, DPC y en un subgrupo (n= 84), RsT por ensayo inmunoensayo (Ramco Laboratories Inc, Houston, TX). Todas las muestras presentaron datos negativos de serología de rutina del Banco de Sangre y Proteína C Reactiva (PCR) (PCR-látex, Wiener lab) negativa. La media±DS y rango para los indicadores estudiados fueron: FS (µg/L) 220 ± 171 (8.9-1197) y RsT (mg/L) 4.5 ± 1.7 (1.6-11.0). FS fue <15 (µg/L) en 0.5% y >300 (µg/L) en 21% de los varones estudiados. RsT presentó valores elevados (>8.3 mg/L) en 2.4% y <2.9 mg/L en 22.9% de los individuos del subgrupo. RsT no correlacionó significativamente con FS (p=0,938) y la relación RsT/FS fue <500 en todos los casos (valor mínimo y máximo 3.2 y 114, respectivamente). Los resultados no indican riesgo de deficiencia de Fe; en cambio, sugieren posible riesgo de sobrenutrición con Fe dada la elevada disponibilidad de carne vacuna que caracteriza la dieta argentina (54.7 kg/capita/año, FAO 2003), asociada a la fortificación de alimentos. Financiado por UBACyT B414 y CONICET (PIP 5068), Argentina.

- 431 (99) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR GABAB EN LA HOMEOSTASIS DE GLUCOSA IN VIVO.** Bonaventura M.¹; Crivello M.²; Ferreira M.³; Libertun C.⁴; Lux V.⁵

IByME^{1 2 3}; IByME; facultad de medicina UBA⁴; IByME⁵ <bonaventura@dna.uba.ar>

El ácido gamma aminobutírico (GABA) está en altas concentraciones en el islote. Sin embargo, poco se conoce sobre su participación en la regulación de la glucemia. Además, agonistas y antagonistas gabaérgicos son ampliamente utilizados en la clínica para el tratamiento de diversas patologías. Objetivo: analizar los efectos de la administración crónica de agonistas y antagonistas del receptor GABAB sobre la homeostasis de glucosa. Se utilizaron ratones BALB/C adultos de ambos sexos, con libre acceso a agua y comida. Se administró una dosis diaria sc de baclofén (BAC, 5 mg/kg, agonista GABAB), 2-hidroxisaclofén (2OH, 10 mg/kg, antagonista GABAB) o salina, durante 15 días. Al final se realizaron tests de tolerancia a la glucosa (TTG, One touch® Ultra™ glucose meter) y secreción de insulina (TSI, ELISA Chrystalchem) y tests de tolerancia a la insulina (TTI) en muestras de sangre de cola. Se evaluaron la ingesta y los pesos durante el tratamiento. TTG y TSI_i luego de 15 hs de ayuno se administró glucosa de 2g/kg (i.p.) y se midió la glucemia e insulinemia en función del tiempo. ITT: luego de 4 hs de ayuno se inyectó 1 U/kg de insulina (i.p.) y se midió la glucemia en función del tiempo. Tanto BAC como 2OH aumentan la glucemia respecto de salina durante el TTG. En hembras, con BAC o 2OH se observan glucemias mayores a los 20 y 30 minutos post-sobrecarga. (ANOVA en dos sentidos, muestras apareadas, interacción p<0,05). En machos las respuestas fueron similares a las de las hembras, siendo más marcado el efecto hiperglucémico con 2OH (ANOVA en dos sentidos, muestras apareadas, tratamiento: p<0,05). No se observaron diferencias en los pesos, ingesta y TTI en ninguno de los sexos. Concluimos que el tratamiento con agonistas y antagonistas del receptor GABAB alteró significativamente la homeostasis de glucosa, modificando la capacidad secretora del páncreas pero sin alterar la sensibilidad a insulina de los tejidos periféricos. (CONICET, UBA, ANCYPT)

- 432 (173) REGULACIÓN POR TUBULINA DE DOS ENZIMAS CLAVES EN DIABETES: NA⁺,K⁺-ATPASA Y ALDOSA REDUCTASA.** Rivelli J.¹; Previtali G.²; Fernandez A.³; Fossati F.⁴; Santander V.⁵; Casale C.⁶

Universidad Nacional de Río Cuarto^{1 2}; Universidad Nacional de Río Cuarto-Hospital Regional Río Cuarto³; Hospital Regional Río Cuarto⁴; Universidad Nacional de Río Cuarto^{5 6} <jrivelli@exa.unrc.edu.ar>

En nuestro laboratorio estudiamos la interacción entre tubulina y la Na⁺,K⁺-ATPasa (NKA) de membrana plasmática. Hemos encontrado que la actividad NKA es modulada por la asociación / disociación de la tubulina acetilada con la enzima. La diabetes mellitas, caracterizada por la hiperglucemia, ocasiona un aumento de la actividad de la enzima Aldosa Reductasa (AR) con una acumulación intracelular de sorbitol y una disminución de la actividad de la NKA en diferentes tejidos. Hipótesis: la alta concentración de glucosa extracelular induce la formación de microtúbulos lo que provoca la activación de la AR y la inhibición de la NKA por la asociación de la tubulina a la membrana. Resultados: 1- la actividad de la NKA en membranas de eritrocitos de pacientes diabéticos (EPD) esta inhibida en un 50% al mismo tiempo que la tubulina total de membrana se encuentra incrementada en más de un 200%. 2- análisis de inmunoprecipitación mostraron que la tubulina acetilada forma un complejo con la NKA en membranas de EPD. 3- la exposición de células COS, CAD y de eritrocitos humanos no diabéticos elevados niveles de glucosa o sorbitol (20 mM) induce la formación de microtúbulos, la asociación de la tubulina a la membrana y la inhibición de la actividad NKA. 4- en membranas de células aisladas de tejidos de ratas con diabetes inducida la tubulina acetilada se asocia a la membrana y la actividad NKA esta disminuida, 5- la AR aislada de cerebro de rata incubada en presencia cantidades crecientes de tubulina produjo una disminución de la actividad enzimática, pero a concentraciones de tubulina mayores a 150 µg / ml la enzima recuperó su actividad. Conclusiones: la tubulina y los microtúbulos

tienen un fundamental en la diabetes regulando las actividades enzimáticas AR y NKA

433 (217) VARIACIÓN EN LA COMPOSICIÓN DEL HUMOR VÍTREO EN PERROS CON GLAUCOMA. Ferreira S.¹; Reides C.²; Moranchel C.³; Weichsler N.⁴; Llesuy S.⁵

Cátedra de Química General e Inorgánica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires.^{1 2 3 4 5} <smferrer@ffyb.uba.ar>

El objetivo de este trabajo fue evaluar la variación en la composición en el humor vítreo de perros con glaucoma comparando frente a perros controles. Para llevar a cabo dicho objetivo se determinaron: los niveles de antioxidantes no enzimáticos, el contenido proteico, los niveles de proteínas oxidadas y parámetros de peroxidación lipídica (TBARS). Todas las determinaciones se realizaron por técnicas espectrofotométricas, en el humor vítreo de perros controles (n=7) y con glaucoma (n=5). La concentración de ácido ascórbico en perros glaucomatosos fue 56 ± 17 mM y en los controles (VC) 143 ± 30 mM; ($p < 0,05$) La concentración de glutatión en perros glaucomatosos fue $1,22 \pm 0,11$ mM (VC $1,17 \pm 0,05$ mM; ns). La concentración de proteínas en el grupo con glaucoma fue $14,1 \pm 1,5$ mg/ mL (VC $1,5 \pm 0,4$ mg/ mL; $p < 0,001$) Las proteínas oxidadas en perros con glaucoma fue $0,145 \pm 0,010$ nmoles/ mg de proteína (VC $0,096 \pm 0,001$ nmoles/ mg de proteína; $p < 0,05$) Los TBARS en perros con glaucoma $0,21 \pm 0,10$ nmoles/ mg de proteína (VC $0,91 \pm 0,10$ nmoles/ mg de proteína; $p < 0,001$) Se observa una disminución significativa en los niveles de ácido ascórbico pero no se observan cambios significativos en la concentración de glutatión entre los vítreos con glaucoma y los controles. Las proteínas y la oxidación de las mismas se encuentran aumentadas, mientras que los TBARS disminuyen significativamente en el glaucoma. Estos resultados tienen importancia en la fisiopatología de la neuropatía óptica glaucomatosa, ya que el estrés oxidativo podría jugar un rol importante en la producción de daño. Esto implica una disminución significativa de las defensas antioxidantes no enzimáticas lo que sugiere un aumento del contenido de prooxidantes que conlleva a un aumento del daño a proteínas. La disminución en el contenido de ácido ascórbico podría deberse a que es utilizado para regenerar la vitamina E, lo que favorecería la protección frente a la peroxidación lipídica en el glaucoma.

434 (221) EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE IN VIVO E IN VITRO DE DIFERENTES MICROEMULSIONES FORMULADAS CON UN EXTRACTO GLICÓLICO DE ROMERO (ROSMARINUS OFFICINALIS L). Reides C.¹; Ferreira S.²; Carlucci A.³; Pasquali R.⁴; Bregni C.⁵; Llesuy S.⁶

Cátedra de Química General e Inorgánica Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2} ; Cátedra de Farmacotecnia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA^{3 4 5} ; Cátedra de Química General e Inorgánica Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA⁶ <creides@ffyb.uba.ar>

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante in vivo e in vitro y el efecto sobre la radiación UVA en distintas microemulsiones a las que se les incorporó un extracto glicólico de romero. Se prepararon 5 microemulsiones (M1-M5) de diferente composición conteniendo, todas ellas, 10 mg/mL del EG. Se evaluó el efecto sobre la oxidación lipídica determinando la concentración inhibitoria 50 (CI50) de la quimioluminiscencia (QL) espontánea de homogeneizados de cerebro de rata con el agregado de las diferentes microemulsiones. El contenido 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. Todos los parámetros se determinaron por técnicas espectrofotométricas, a excepción del TRAP. Los resultados obtenidos fueron: a) ABTS (mmol/g): M1: $1,30 \pm 0,06$, M2: $1,17 \pm 0,10$, M3: $1,56 \pm 0,06$, M4: $1,23 \pm 0,09$, M5: $1,25 \pm 0,08$; b) DPPH (mmol/g): M1: $0,96 \pm 0,06$, M2: $0,95 \pm 0,07$, M3: $1,09 \pm 0,04$, M4: $1,07 \pm 0,04$, M5:

$1,02 \pm 0,05$; c) TRAP (mmol/g): M1: $0,21 \pm 0,02$, M2: $0,27 \pm 0,02$, M3: $0,37 \pm 0,03$, M4: $0,23 \pm 0,01$, M5: $0,23 \pm 0,03$; d) CI50 ($\mu\text{g/mL}$): M1: 14,15, M3: 0,95, M4: 7,14, M5: 1,51. La M3 mostró los mayores valores de ABTS ($p < 0,01$) y TRAP ($p < 0,01$) y la menor CI50 de todas las microemulsiones analizadas, lo que permitió seleccionarla para su evaluación en un modelo animal. Este consistió en someter el dorso afeitado de ratas Wistar de 200 ± 30 g de peso a una fuente de radiación UV A por 30 minutos para luego medir la QL espontánea de la piel previamente topocada con $50 \mu\text{L}$ de la microemulsión. Los resultados mostraron una disminución del 49 % de la QL respecto del control irradiado (110 ± 10 cps/cm²; $p < 0,05$). Estos resultados permiten sugerir que la M3 resultaría ser la de mayor capacidad antioxidante y que protegería a la piel de daño causado por la radiación UVA.

435 (293) MEDIDA EN CIRCULACIÓN DE METALOPROTEASAS 2 Y 9 Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN EN ATROSCLEROSIS SUBCLÍNICA. Muzzio M.¹; Miksztowicz V.²; López G.³; Repetto M.⁴; Basilio F.⁵; Brites F.⁶; Berg G.⁷; Schreier L.⁸

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIUC-UBA^{1 2 3 4} ; División Tocoginecología. Hospital Durand⁵ ; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIUC-UBA^{6 7 8} <mluchim@hotmail.com>

Las metaloproteasas son una familia de enzimas producidas -en parte- en células de la pared arterial, que degradan componentes de la matriz extracelular y participan en el remodelamiento vascular contribuyendo a aumentar la vulnerabilidad de la placa. De hecho, las MMP 2 y 9 se hallan aumentadas en las regiones vulnerables de la placa. Las células endoteliales activadas expresan moléculas de adhesión vascular como VCAM-1, que promueven la infiltración de linfocitos y monocitos circulantes activando el sistema inflamatorio. No se conoce certeramente si estos componentes relacionados con el endotelio, medidos en circulación constituyen un marcador precoz de aterosclerosis. Nuestro objetivo fue evaluar el nivel de VCAM-1, y actividad de MMP 2 y 9 en un modelo de aterosclerosis subclínica formado por mujeres posmenopáusicas aparentemente sanas (MPost) y controles premenopáusicas (MPre). Se estudiaron 23 MPost y 13 MPre que no recibían tratamientos hipolipemiantes u hormonales, se midió perímetro de cintura. Se obtuvo plasma y suero y se determinó perfil lipoproteico, PCR-hs, glucosa e insulina calculando HOMA. La actividad de MMP se midió por zimografía gelatinolítica expresada como áreas relativas y VCAM-1 por ELISA. MMP2 fue mayor en Mpost: $1,1 \pm 0,1$ vs $0,6 \pm 0,05$, $p < 0,02$. MMP-9 se detectó en tres MPost y una MPre. MMP2 correlacionó con col-HDL ($r = 0,51$ $p < 0,02$); triglicéridos ($r = 0,67$ $p < 0,001$); Apo B ($r = 0,47$ $p < 0,02$); PCR ($r = 0,42$ $p < 0,01$); HOMA ($r = 0,53$ $p < 0,02$) y cintura ($r = 0,4$ $p < 0,04$). VCAM-1 no mostró diferencia entre los grupos: $28,7 \pm 5,5$ vs $35,5 \pm 20$ ng/ml, pero correlacionó con MMP2 y PCR ($r = 0,46$ y $r = 0,48$ respectivamente $p < 0,05$). Los hallazgos reflejarían el proceso inflamatorio específico e injurante que acompaña a la aterogenesis aún subclínica e influenciado por el estado de insulinoresistencia. Se propone que MMP2 y VCAM-1 en circulación podrían constituir marcadores precoces.

436 (297) VARIANTES COMUNES EN EL GEN DEL TRANSDUCTOR DE SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 3 (STAT3) SE ASOCIAN CON EL CONTENIDO DEL ADN MITOCONDRIAL. Fernandez Gianotti T.¹; Castaño G.²; Burgueño A.³; Rosselli M.⁴; Sookoian S.⁵; Pirola C.⁶

Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (IDIM) CONICET¹ ; Hepatología Hospital A. Zubizarreta GCBA² ; Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (IDIM) CONICET^{3 4} ; Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (IDIM) CONICET; Hepatología Hospital A. Zubizarreta GCBA⁵ ; Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari (IDIM) CONICET⁶ <tfgianotti@yahoo.com.ar>

STAT3 es un factor de transcripción nuclear que media la respuesta de citoquinas de fase aguda y otras hormonas contribuyendo al desarrollo de insulino resistencia. Recientemente se descubrió un nuevo papel del *STAT3* como regulador de la función mitocondrial. También es sabido que el número de copias de ADN mitocondrial (ADNm) se relaciona con la función mitocondrial, y que distintos factores nucleares intervienen en este proceso, aunque hasta ahora se desconoce si el *STAT3* está involucrado en esta función. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la posible asociación entre el contenido de ADNm y polimorfismos de nucleótido único (SNPs) del gen *STAT3*. Se incluyeron en un estudio de sección transversal 108 pacientes con características del síndrome metabólico y 55 controles; el protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Institución. Del proyecto HapMap se seleccionaron 3 tagSNPs con una frecuencia del alelo menor >10% (rs2293152, C/G, rs6503695, C/T y rs9891119 A/C) los que representan 24 sitios polimórficos del gen *STAT3* ($r^2 > 0.8$), y comprenden una región de 68.6Kb del cromosoma 17. A partir del ADN extraído de leucocitos de sangre periférica se genotipificaron los SNPs mediante PCR alelo específica y se determinó el contenido de ADNm a través de la relación ADNm / ADN nuclear (Rel) utilizando PCR en tiempo real. Los SNPs se encontraron en Equilibrio de Hardy Weinberg. Los genotipos del rs9891119 se asociaron con el log Rel ajustada por HOMA: AA 1.58±0.06; AC 1.34±0.09. y CC 1.15±0.16 (media±ES, ANCOVA, $p < 0.02$). Los restantes SNPs no se asociaron con la Rel, aunque se observó una tendencia de asociación con el rs6503695 ($p = 0.06$). En conclusión, mostramos por primera vez que variantes comunes del *STAT3* podrían tener un rol en el mantenimiento y/o regulación del contenido del ADNm y por lo tanto contribuir a la variabilidad genética en la regulación de la función mitocondrial.

437 (306) PRODUCCIÓN DE VLDL Y ESTEATOSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR INSULINO-RESISTENCIA. Lucero D.¹; Cacciagiú L.²; Zago V.³; Odriozolla A.⁴; Gamba C.⁵; Wikinski R.⁶; Friedman S.⁷; Schreier L.⁸

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-UBA^{1 2 3 4}; Cátedra de Bioquímica Gral. y Bucal. Facultad de Odontología-UBA⁵; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-UBA⁶; Cátedra de Bioquímica Gral. y Bucal. Facultad de Odontología-UBA⁷; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-UBA⁸ <diego_lucero81@hotmail.com>

La esteatosis hepática no-alcohólica es otra manifestación de la insulino-resistencia (IR) que acentuaría las alteraciones de VLDL aumentando su aterogenicidad. Objetivo: evaluar el depósito graso hepático y su papel sobre la composición de VLDL en un modelo de IR. Se estudiaron ratas wistar macho, 180-200g, n=28, alimentadas con dieta estándar. Se dividieron en 2 grupos, a uno se le suministró sacarosa en el agua de bebida (DRS n=14) 12 semanas y se comparó con grupo control (C n=14). A dos subgrupos, n=8 c/u, se les determinó en sangre parámetros metabólicos y se aisló VLDL (d=1,006 g/ml). En hígado se cuantificó la grasa y se realizaron estudios histológicos. En las ratas restantes, n=6 en c/cada grupo, se midió tasa de secreción de VLDL mediante Triton WR-1339. DRS y C no presentaron diferencias en consumo energético ni en aumento de peso, $p = 0.4$, pero sí en contenido de grasa visceral (DRS: 17,8±3,8 vs 34,4±5,4g; $p < 0,01$). DRS presentó mayor insulínemia (15,8±4,1 vs 1,5±0,5ng/ml; $p = 0,003$) sin diferencias en glucemia, aumento de TG (108±51 vs 47±12mg/dl; $p = 0,003$) y ácidos grasos libres (AGL) (0,80±0,18 vs 0,60±0,17mmol/l; $p < 0,05$) y disminución de col-HDL (27±7 vs 38±11mg/dl; $p = 0,007$). En DRS, VLDL presentó mayor masa (99±54 vs 43±11 mg/dl; $p = 0,03$), contenido de TG (74±4 vs 67±7 %; $p < 0,01$) y estimador de tamaño TG/proteínas (19±7 vs 9±2; $p < 0,01$). AGL correlacionó con TG-VLDL ($r = 0,49$; $p = 0,03$). La grasa hepática fue mayor en DRS (174±99 vs 96±49 mg/g; $p = 0,04$), confirmado por la histología (8/12 vs 1/12; $p = 0,009$), y se asoció con TG-VLDL ($r = 0,55$; $p = 0,02$) aún

después de ajustar por AGL e insulina, $\beta: 4,2$; $p < 0,04$. La tasa de secreción de VLDL fue mayor en DRS (105±18 vs 83±12 nmol/min.100g de peso; $p = 0,02$) indicando sobre-secreción de VLDL a pesar del mayor depósito de grasa hepática. El contenido lipídico intrahepático constituiría un importante determinante de secreción de VLDL, la cual presenta alteraciones en su composición que incrementarían su potencial aterogénico

438 407) EFECTOS DE LA HARINA DE SOJA SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL CUANDO SE ADMINISTRA DIETA HIPERCALÓRICA A RATAS MACHO WISTAR. Razzeto G.¹; Frossasco A.²; Escudero N.³; Giménez M.⁴

Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. IMIBIO-SL-CONICET^{1 2 3 4} <grazzet@unsl.edu.ar>

Numerosos estudios sugieren que la soja tiene efectos beneficiosos por su capacidad de disminuir el colesterol sanguíneo y los riesgos de enfermedades cardiovasculares. Muchos de ellos fueron realizados con aislados proteicos de soja (90% de proteína) ya que el efecto hipocolesterolemico podría ser atribuido a otros factores no proteicos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la soja respecto de la caseína sobre el colesterol sérico y hepático cuando se administró dieta hipercalórica. Se trabajó con un lote de 16 ratas que se dividió en dos grupos: uno control con dieta AIN-93M y otro problema con dieta AIN-93M hipercalórica (34,146% sacarosa, 42% de calorías provenientes de grasas) alimentados durante 9 semanas. Luego de este período cada grupo fue dividido en dos y a uno de ellos se le sustituyó caseína por soja, quedando: CC (control caseína), CS (control soja), HC (hipercalórica caseína) e HS (hipercalórica soja). Se alimentaron 45 días y fueron sacrificadas. En suero se determinó Colesterol Total (CT), HDL-C y LDL-C. En hígado, Colesterol total, libre, esterificado, y los niveles de ARNm de HMG-CoA Reductasa (HMGCoAR), SREBP-2, receptor de LDL (RLDL) y Colesterol-7- α -hidroxilasa (CYP7A1) por RT-PCR. Los resultados mostraron que en suero, CT disminuye en CS (75,75 ± 4,86 mg/dL) en relación a CC (95,00 ± 5,66 mg/dL) ($P < 0,05$) y en ambas dietas hipercalóricas existe una tendencia al aumento de HDL. En hígado no hubo diferencias significativas. La expresión de HMG-CoAR mostró disminución en HC vs CC, $P < 0,01$ y HS vs CS, $P < 0,05$. La expresión de RLDL fue menor en HS respecto al resto de las dietas. Se observó aumento de la expresión de CYP7A1 en CS vs CC ($P < 0,05$). La harina de soja provocaría efectos beneficiosos cuando se administra en dietas normales, siendo estos menores cuando la dieta es hipercalórica.

439 (408) EFECTO DE AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO DE RATA EXPUESTA A ETANOL. Lucero López V.¹; Giménez M.²; Escudero N.³

Facultad de Química Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. IMIBIO-SL-CONICET^{1 2 3} <vrllop@unsl.edu.ar>

Amaranthus hypochondriacus (Ah) es un pseudocereal que constituye una fuente de nutrientes y de antioxidantes naturales. El etanol y sus metabolitos causan estrés oxidativo actuando como agentes pro-oxidantes y disminuyendo los niveles de antioxidantes celulares. El objetivo del presente estudio fue evaluar el contenido de lípidos en tejido hepático de ratas macho Wistar tratadas con etanol en el agua de bebida a una concentración del 20%, el daño oxidativo provocado por éste y la posible protección de Ah. Se trabajó con cuatro grupos de 6 individuos cada uno durante 4 semanas. Se emplearon dietas AIN-93 M: en los grupos I y II caseína fue reemplazada por Ah; los grupos I y III fueron tratados con etanol. Se determinaron Colesterol Total (CT), Colesterol Esterificado (CE), Colesterol Libre (CL), Triglicéridos (TG) y Fosfolípidos (FL) en tejido hepático. Se evaluaron la peroxidación lipídica por los niveles malondialdeído (MDA) y las actividades de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y

glutación peroxidasa (GPx), en homogenato de hígado. En el grupo I en relación al grupo III se observa: un menor depósito de CE ($\mu\text{g/g tej}$), 809.38 ± 253.64 (I), 1424.66 ± 335.87 (III) ($p < 0.01$), mientras que los demás lípidos hepáticos no sufrieron cambios. Los niveles de MDA (nmol/g tej) muestran una reducción significativa 0.11 ± 0.03 (I), 20 ± 0.09 (III) ($p < 0.05$). En el grupo I también se observa un aumento de la actividad de CAT en 15,41% y de SOD en 22,40% respecto al III; sin modificarse la actividad de GPx. Se puede concluir que Ah ejerce un efecto beneficioso sobre el contenido de CE y sobre las defensas antioxidantes en hígado de rata bajo la influencia de etanol.

440 (417) LOS CAMBIOS EN LOS MARCADORES ÓSEOS DEL TIPO CTX $-\alpha\alpha$ Y β - RELACIONADOS CON LA EDAD RESPONDEN DE FORMA DIFERENTE AL ESTADO NUTRICIONAL RESPECTO DEL CALCIO. ESTUDIO EN NIÑOS PREPÚBERES DE AMBOS SEXOS. Dupraz H.¹; Río M.²

Ftad. Farm Y Bioquímica¹ ; Universidad de Buenos Aires y CONICET² <hedupraz@ffybu.uba.ar>

Varios marcadores biológicos capaces de estimar el metabolismo óseo han comenzado recientemente a estandarizarse para su uso en pediatría, entre ellos el nuevo $\alpha\alpha$ -CTX. Por otra parte, en la etapa de crecimiento el calcio es fundamental para el normal desarrollo óseo. En trabajos previos (SAIC 2007 y 2008) presentamos resultados que sugerían la posibilidad de que los cambios en los valores de este marcador fueran afectados por ambos, la edad y el estado nutricional (EN) respecto del Ca. Aquí exploramos las diferencias existentes entre $\alpha\alpha$ y β -CTX en relación con los cambios experimentados durante la etapa de crecimiento prepupal, así como la selectividad de cada uno de ellos en respuesta al EN respecto del Ca. Se recolectaron muestras de la segunda orina de la mañana, en ayunas, de 200 niños entre 5 y 9 años de edad, saludables y de ambos sexos. Se evaluaron: a y bCTX ($\mu\text{g/mmol}$) (Nordic Bioscience. Denmark), Ca, por absorción atómica y creatinina según Jaffé. Los resultados, expresados en relación con la creatinina (WienerLab) se analizaron según edad y en función del indicador Ca/Cr: $< 0,07$, deficiente (D); $0,07$ a $0,15$, adecuado (A) y $> 0,15$, elevado (E). En el $\alpha\alpha$ -CTX no se observó la disminución esperada con la edad en D pero sí en A y E siendo la diferencia sig. en el grupo con Ca/C elevado ($* p < 0,05$, entre 5 vs 9 años); además, se encontró correlación lineal negativa con la edad dentro del rango estudiado ($Y = -1,9171x + 18,5$; $R^2 = 0,9473$). En ese mismo rango, el β -CTX no mostró dependencia con la edad ni el estado respecto del calcio. En conclusión, se confirmó que los cambios en el $\alpha\alpha$ -CTX evolucionan de forma diferente interaccionando edad y EN respecto del Ca pero que, en igual rango de edades, la respuesta del β -CTX fue inexistente (UBACyT B/060. HD es becario de Doctorado de la UBA y el trabajo parte de su Tesis).

441 (444) EFECTO PROTECTOR DEL PREACONDICIONAMIENTO CON HIERRO FRENTE AL DAÑO DEPENDIENTE DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN (IR). Galleano M.¹; Araya P.²; Fernández V.³; Varela P.⁴; Puntarulo S.⁵; Tapia G.⁶

Físicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET.¹ ; ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile.^{2 3 4} ; Físicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET.⁵ ; ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile.⁶ <mgallean@ffybu.uba.ar>

El daño hepático por IR está asociado a diversas formas de cirugía hepática. El objetivo de este trabajo es evaluar el posible efecto protector de la administración de hierro (Fe) como agente preconditionante para hígado frente a IR. Ratas Sprague-Dawley macho fueron agrupadas según el siguiente protocolo: (1) salino-sham; (2) salino-IR (1 h isquemia-20 h reperfusión); (3) Fe-sham (Fe: 6 dosis ip de 50 mg/kg durante 15 días previos a IR) y (4) Fe-IR. La oxidación de proteínas hepáticas, como indicador de

estrés oxidativo hepático (EOX) mostró un aumento significativo a las 24 h posteriores a la última dosis de Fe y una normalización a las 72 horas post-Fe, señalando una potencial ventana de preconditionamiento por Fe (PFe) en este período. Los niveles de GPT, como indicador de daño hepático, fueron 42 ± 8 UI/L y 40 ± 1 UI/L para animales controles y PFe (en condiciones pre-IR), respectivamente. El incremento producido post-IR (540 ± 120 UI/L para animales controles y $230 \pm 70^*$ UI/L para animales PFe, $*p < 0,05$), fue significativamente menor en los animales previamente tratados con Fe. Tanto los valores de GOT como la histología hepática mostraron la misma reducción en animales PFe, comparados con los controles. La unión de NFkB a DNA fue determinada por EMSA en extractos nucleares de hígado. Este parámetro fue significativamente disminuido por IR en los animales no preconditionados (105 ± 5 UA vs $60 \pm 10^*$ UA, $*p < 0,05$, en condiciones pre y post IR respectivamente), mientras que no fue afectado en los animales PFe (110 ± 10 UA vs 85 ± 12 UA, en condiciones pre y post IR, respectivamente). Se concluye que la administración subcrónica de Fe ejerce un efecto hepatoprotector frente a la IR en una ventana de 72 h. Esta protección estaría mediada por la normalización de la vía de señalización del factor de transcripción redox-sensible NFkB, efecto del que sería responsable el EOX hepático reversible generado por el PFe. Financiado por UBACyT 105, PIP 01171 y FONDECYT 1080039.

442 (452) ALTERACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE INTRACELULARES Y SISTÉMICOS ASOCIADOS AL DAÑO OXIDATIVO MEDIADO POR HIERRO. Ferrarotti N.¹; Musacco Sebío R.²; Saporito C.³; Repetto M.⁴

Cátedra de Química General e Inorgánica, Departamento de Química Analítica y Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Cátedra de Análisis Clínicos I, Laboratorio de Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica¹ ; Cátedra de Química General e Inorgánica, Departamento de Química Analítica y Físicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{2 3 4} <mrepetto@ffybu.uba.ar>

Uno de los mecanismos involucrados en el daño hepático por toxicidad aguda por hierro (Fe) es la oxidación irreversible de biomoléculas. El objetivo de este trabajo fue evaluar si dicho daño afecta a los sistemas antioxidantes redox intracelulares enzimáticos y no enzimáticos. Se administró FeCl_2 (30 mg/kg) a ratas Sprague Dowley (200-250 g) y NaCl (0.9%) al grupo control (C) por vía intraperitoneal. Se evaluó la cinética de aparición de daño hepático (2-48 horas de tratamiento) mediante la determinación de: Quimioluminiscencia de órgano in vivo (QL), Quimioluminiscencia iniciada por hidropéroxido de terbutilo (QL-BOOOH), especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); glutatión (GSH/GSSG), capacidad antioxidante (TRAP); y antioxidantes enzimáticos: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (Cat) y glutatión transferasa (GT) en homogeneizados de hígado, eritrocitos y plasma. A las 2 hs, se observó en hígado: aumento de 5 veces en la QL ($p < 0,01, C: 23 \pm 7$ cps/cm²), aumento de 2.3 veces de QL-BOOOH ($p < 0,01, C: (21 \pm 2 \times 10^3)$ cpm/mg prot), disminución en 4 veces la relación GSH/GSSG ($p < 0,05, C: 6.5 \pm 0.1$), inhibición de la actividad de SOD (31%, $p < 0,05, C: 2.6 \pm 0.2$ U/mg prot), aumento de Cat en 1.4 veces ($p < 0,01, C: 2.4 \pm 0.2$ pmol/mg prot) y GT 69% ($p < 0,0001, C: 1.7 \pm 0.1$ mU/mg prot x min). En eritrocitos, SOD disminuyó su actividad un 56% ($p < 0,001, C: 4.3 \pm 0.3$ U/mg prot) y Cat un 52% ($p < 0,01, C: 3.2 \pm 0.5$ pmol/mg prot). A partir de las 16 hs, TBARS aumentó 2.6 veces ($p < 0,01, C: 0.28 \pm 0.02$ nmol/g hígado). En plasma, TRAP disminuyó 41% ($p < 0,01, C: 349 \pm 13$ μM) a las 2 hs y TBARS aumentó un 100% ($p < 0,05, C: 1.1 \pm 0.3$ μM) a las 20 hs. El daño hepático por Fe aumenta con el tiempo de tratamiento. La secuencia de eventos oxidativos en hígado indicaría que el consumo hepático de GSH, inhibición de la actividad de SOD y cambios en la actividad de Cat y GT son previos a la peroxidación lipídica. La disminución de los antioxidantes intracelulares estarían involucrados en la génesis del daño oxidativo hepático.

443 (605) ACCIÓN DEL VANADATO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL ALAS EN UN MODELO DE PORFIRIA AGUDA. Nicolás D.¹; Oliveri L.²; Battlle A.³; Gerez E.⁴

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA¹ ; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)-CONICET Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA² ; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA.³ ; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA⁴ <danu1986@hotmail.com>

La Porfiria aguda intermitente (PAI) se caracteriza por un aumento en la expresión de la primera enzima del camino del hemo, la d-aminolevulinato sintetasa (ALAS) y la consiguiente acumulación de intermediarios tóxicos de esta vía. Se ha demostrado la participación de PGC1 α y FOXO1 en el control de la expresión del ALAS. PGC1 α es un coactivador de factores de transcripción como FOXO1. La fosforilación del sustrato 1 del receptor de la insulina (IRS1) lleva a la activación de la vía PI3K/Akt/FOXO. En nuestro laboratorio, demostramos que el vanadato (V) inhibe el aumento transcripcional del ALAS hepática actuando a través de esta vía. En base a estos resultados, se decidió investigar los efectos del V en la regulación del ALAS en un modelo de PAI inducida con alisopropilacetamida (AIA) y la vinculación con la vía PI3K/Akt. Los animales se dividieron en tres grupos: Control (C), AIA y AIA+V. El V (0,2 mg/ml) se administró en el agua de bebida durante 6 días antes del sacrificio. El AIA (170mg/kg ip), se administró en una dosis, 16h antes del sacrificio. El grupo C se trató solo con vehículo. En el grupo AIA la actividad del ALAS aumentó un 250% (VC:0,220 U/mg \pm 0,136) y el contenido de proteína de ALAS mitocondrial aumentó siete veces respecto al control. El V previno el aumento de actividad del ALAS y llevó los niveles de proteína a 2,6 veces el nivel control. La fosforilación de IRS1 (Tyr632) no se modificó significativamente en el grupo AIA, mientras que en el grupo AIA+V aumentó un 90%. El AIA tampoco afectó la fosforilación de Akt (Ser243) mientras que el V causó un incremento del 33%. Tanto en AIA como AIA+V el nivel de FOXO nuclear disminuyó (75% y 74%, respectivamente) mientras que PGC1 α se mantuvo inalterado en ambos grupos. Conclusiones: la vía PI3K/Akt no participaría en el aumento de ALAS provocado por el AIA mientras que el V inhibe dicha inducción, alentando una mayor investigación de su uso como posible agente terapéutico en los ataques de PAI.

444 (718) POLIMORFISMO GLY482SER DEL COACTIVADOR-1 α DE PPAR γ (PGC-1 α) Y RIESGO DE SÍNDROME METABÓLICO. INTERACCIÓN CON PRESIÓN ARTERIAL.

Tellechea M.¹; Aranguren F.²; Pérez M.³; Cerrone G.⁴; Gomez Rosso L.⁵; Penas Steinhart A.⁶; Frechtel G.⁷

Cátedra de Genética y Biología Molecular. FFyB UBA¹ ; División de Diabetología. Hospital de Clínicas. Universidad de Buenos Aires² ; Cátedra de Genética y Biología Molecular. FFyB UBA³ ; 3Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires⁵ ; Instituto de Inmunología de la Inmunidad Humoral (IDEHU, CONICET/UBA)⁶ ; Cátedra de Genética y Biología Molecular. FFyB UBA⁷ <marianatellechea78@hotmail.com>

El síndrome metabólico (SM) constituye una constelación de factores de riesgo cardiometabólicos, que se asocia a un riesgo elevado de diabetes tipo 2 y enfermedad coronaria. El polimorfismo Gly482Ser del coactivador-1 α de PPAR γ (Receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas), PGC-1 α , ha sido asociado de manera no concluyente a Resistencia a la Insulina (RI), SM e hipertensión. No existe información al respecto en población adulta argentina. Objetivos: explorar asociaciones entre Gly482Ser (rs8192678), el SM y mediciones de RI. Material y métodos: reclutamiento de 605 adultos sanos no emparentados,

donantes de sangre, exámenes antropométricos y bioquímicos, y genotipificación de rs8192678 por RFLP-PCR. El SM fue diagnosticado utilizando los criterios del NCEP/ATPIII (National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III) e IDF (International Diabetes Federation). La RI fue evaluada con la insulinemia de ayuno y el HOMA-IR. Resultados: la prevalencia de SM fue 27,6 (NCEP/ATPIII) y 39,2% (IDF). rs8192678 no fue asociado a SM-NCEP/ATPIII (p=0,5) ni a SM-IDF (p=0,4). En obesos (IMCe \geq 30 kg/m²) con presión arterial elevada (PAE, sistólica e \geq 130 mmHg y/o diastólica e \geq 85 mmHg), rs8192678 se asoció a SM-NCEP/ATPIII (p=0,007) y a SM-IDF (p=0,015). Los portadores de Ser482 tenían riesgo de SM-NCEP/ATPIII (OR=3,2 [IC 95% 1,17-8,68], p=0,02) y de SM-IDF (OR=5,14 [IC 95% 1,46-17,85], p=0,007). ANOVA confirmó una interacción entre rs8192678 y PAE para riesgo de SM-NCEP/ATPIII (p=0,035) y de SM-IDF (p=0,048). Los portadores de Ser482 tenían mayores niveles de insulinemia (12,8 vs. 10,8 μ U/ml, p=0,005) y de HOMA-IR (1,79 vs. 1,59, p=0,039) en individuos con PAE e insulinemias bajo el percentilo 75 (<20 μ U/ml), y un diámetro de cintura elevado (97 vs. 94,9 cm, p<0,0001). Conclusiones: el alelo Ser482 (rs8192678) de PGC-1 α se asoció, interaccionando con PAE, a SM y RI en hombres adultos argentinos obesos, hallazgos apoyados por el carácter funcional de rs8192678.

445 (730) EXPRESION DE MARCADORES DE PROLIFERACION Y CRECIMIENTO DURANTE UNA DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC. Biaggio V.¹; Salvetti N.²; Gomez N.³; Gimenez M.⁴; Ortega H.⁵

Universidad Nacional de San Luis; Laboratorio de Biología Molecular; CONICET; IMIBIO¹ ; Cátedra de Biología Celular; Facultad de Ciencias Veterinarias; Universidad Nacional del Litoral; Esperanza; Santa Fe; CONICET² ; Universidad Nacional de San Luis; Laboratorio de Biología Molecular; CONICET; IMIBIO³ ; 4 ; Cátedra de Biología Celular; Facultad de Ciencias Veterinarias; Universidad Nacional del Litoral; Esperanza; Santa Fe; CONICET⁵ <vbiaggio@gmail.com>

Numerosas investigaciones remarcan la importancia del Zinc en el metabolismo celular, por lo que un desbalance en la concentración del mismo contribuye a diferentes patologías. Por otro lado, en trabajos previos hemos demostrado que la deficiencia de zinc (DZ) produce un incremento del estrés oxidativo y nitrosativo en pulmón de ratas DZ, situación que no es revertida con la suplementación. El objetivo fue determinar la expresión de marcadores de crecimiento y proliferación y su relación con un posible cuadro de fibrosis pulmonar en DZ, además analizamos si la situación se revertía con la realimentación. Para ello se usaron ratas Wistar de (200 \pm 20g) separadas en tres lotes: Grupo Control (Co) con un contenido de Zn de 30mg/Kg de dieta, un lote deficiente en zinc (DZ) 5 mg/Kg dieta y un tercer lote (Ral) que recibió dieta DZ y se realimentaron luego por 10 días con dieta Control. Usando inmunohistoquímica se estudió la expresión de c-erb-2, Citoqueratinas, Pan-caderinas, Vimentina y Desmina en pulmón. Se determinó marcación positiva tanto en células, citoplasma, núcleo o ambos, según el patrón de expresión de cada anticuerpo. Los resultados muestran en el grupo DZ una inmunomarcación positiva para c-erb-2 (p<0.05), como también una tendencia al aumento en Vimentina, comparado con el grupo Co. La expresión de Pan-caderinas, Citoqueratinas y Desmina no mostró diferencias significativas. En el período de suplementación el factor c-erb-2, Citoqueratinas y Vimentina incrementó significativamente (p<0.05) comparado al Co. Previamente hemos demostramos cuadros inflamatorios en el estroma pulmonar, por lo tanto, la menor proliferación del tejido epitelial y un incremento del tejido conectivo contribuiría al desarrollo de un posible cuadro de fibrosis en la DZ, lo cual no sería revertido, durante el periodo de suplementación.

446 (806) ROL DE LA MTNOS EN EL METABOLISMO DE LOS ADIPOCITOS DE RATONES OB-/-. Holod S.¹; Finocchietto P.²; Barreyro F.³; Allype Y.⁴; Pagnini C.⁵; Giovambattista A.⁶; Carreras M.⁷; Poderoso J.⁸

Laboratorio Metabolismo del Oxígeno^{1 2 3 4 5}; IMBIC⁶; Laboratorio Metabolismo del Oxígeno^{7 8}
<silviaholod@yahoo.com.ar>

El aumento del tejido adiposo visceral se asocia con inflamación y anomalías mitocondriales. El óxido nítrico (NO), molécula de señalización celular y mitocondrial, modula la transferencia de electrones y el consumo de oxígeno. En nuestro laboratorio demostramos que los ratones Ob^{-/-} (deficiencia de leptina) presentan aumento de la actividad y expresión de mtNOS en el tejido adiposo. Objetivo: estudiar el efecto de la mtNOS sobre el metabolismo de los adipocitos de ratones Ob^{-/-} (deficientes de leptina). Métodos: Se utilizaron ratones Ob^{-/-} y C57BL/6 (6-9 meses). Se realizaron cultivos primarios de adipocitos a partir de la grasa periepididimaria. Las células fueron transfectadas por método de lipofectamina con siRNA nNOS y siRNA OBR (resistencia a leptina). La presencia de NO se determinó por colocalización con DAF-FM y Mitotracker en microscopía confocal. La oxidación de ácidos grasos se determinó con ácido palmítico [C₁₄], el uptake con ácido palmítico [H₂] y la síntesis con acetil-CoA [C₁₄]. Resultados: 1) Los adipocitos de los Ob^{-/-} transfectados con siRNA nNOS presentaron disminución de la colocalización de DAF-FM y Mitotracker, disminución de la mtNOS y aumento (3 veces) de la oxidación de palmítico con respecto a los Ob^{-/-} (p < 0.05). 2) Los adipocitos de los controles silenciados contra el OB receptor presentaron intensa colocalización de DAF, baja capacidad oxidativa (20%) y síntesis normal. Conclusiones: a) Altas concentraciones de NO mitocondrial en adipocitos de Ob^{-/-} y controles transfectados con siRNA OBR conducen a reducción del consumo de oxígeno contribuyendo a la síntesis y acumulación de lípidos. b) Leptina y el siRNA nNOS producen similares efectos sobre el metabolismo de los adipocitos incrementando la capacidad oxidativa, disminuyendo la síntesis de ácidos grasos e impidiendo el desarrollo de obesidad.

447 (537) ESTABILIDAD TÉRMICA Y ACTIVIDAD DE LA PORFOBILINÓGENO SINTETASA HUMANA. L S Varela¹, J P Rossi², A M C Batlle³, E Gerez³

¹Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA, ²Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB)-CONICET, UBA, ³Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porfirias (CIPYP)- CONICET-Hospital de Clínicas José de San Martín-UBA. <sabina@qb.fcen.uba.ar>

El paso común para todos los organismos en la biosíntesis del hemo es la condensación asimétrica de dos moléculas de ácido δ-aminolevulónico catalizada por la porfobilinógeno sintetasa (PBG-S). Esta enzima de 280 kDa, tiene ocho subunidades idénticas aunque se postula que cada sitio catalítico podría funcionar independientemente. Se cree que la estructura activa mínima es un homodímero cuyas subunidades son funcionalmente distintas en la síntesis de porfobilinógeno. El objetivo de este trabajo es estudiar los estados de oligomerización de la PBG-S y su relación con los cambios en actividad. La PBG-S humana (PBG-Sh) se clonó, se sobreexpresó en E. coli cepa BL21 y se purificó como una proteína de 62 kDa fusionada a un fragmento de 26 kDa de la glutatión-S-transferasa. La actividad enzimática se determinó a 45, 55 y 65 °C. Cuando se incubaron 10 µg de enzima a 45 °C, su actividad se mantuvo estable con el tiempo (172,36 ± 40,5 U/mg proteína), mientras que a 55 y 65 °C durante 1h disminuyó su actividad en 16 y 75% respectivamente. Al incubar durante 2 horas 3 µg de PBG-Sh a 45 °C la actividad disminuyó un 70%. Para correlacionar las variaciones en la actividad de la PBG-Sh con posibles cambios en su estructura oligomérica se realizaron geles nativos de poli(acrilamida). La incubación de la enzima durante 1-2 h produjo la aparición de oligómeros cuya estabilidad dependía de la temperatura, del tiempo de incubación y de la concentración de enzima. A 45 °C se observó la aparición de 1, 2, 4, 6 y 8 unidades de PBG-Sh mostrando su asociación en función del tiempo de incubación. La enzima podría existir como un octámero de alta actividad, un hexámero de baja actividad y un dímero. La interconversión del octámero y el hexámero involucraría la disociación a dímeros, fenó-

meno que se evidencia en la variabilidad de la actividad enzimática tras incubarse a diferentes tiempos y temperaturas mostrando un complejo fenómeno de activación-inhibición.

ONCOLOGIA 5

448 (499) MECANISMO DE ACCIÓN INVOLUCRADO EN LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y CELECOXIB (CEL) EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA DE RATÓN. Mainetti L.¹; Rozados V.²; Rico M.³; Gervasoni S.⁴; Giordano R.⁵; Scharovsky O.⁶

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Cs. Médicas, UNR^{1 2 3 4}; Laboratorio Cibic⁵; Instituto de Genética Experimental, Facultad de Cs. Médicas, UNR⁶
<leandromainetti@gmail.com>

La quimioterapia metronómica (QTM) consiste en la administración crónica de dosis bajas y no tóxicas de agentes quimioterápicos, a intervalos regulares, sin períodos de descanso prolongados. Anteriormente, demostramos el efecto antitumoral de QTM con Cy y Cel sobre el adenocarcinoma mamario de ratón M-406. Con el objeto de evaluar los mecanismos de acción involucrados en el efecto observado, ratones CBI fueron desafiados con M-406 s.c. (Día 0) y se distribuyeron en grupos que recibieron desde el día 8: I) Testigos (sólo vehículo); II) Cy (25-30 mg/kg peso/día p.o.); III) Cel (30 mg/kg p.o., 5 días/semana); IV) Tratamiento II + III. Se extrajo sangre en los días 0 y 28 para evaluar la concentración sérica de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y el % de células T reguladoras. El desafío tumoral y el esquema terapéutico se repitió en ratones atímicos. Los valores de VEGF séricos mostraron un aumento significativo en el grupo I (día 28) con respecto al día 0 (p < 0,001), mientras que los de los grupos II, III y IV presentaron valores menores a los testigos (p < 0,01) y similares a los del día 0. Los valores de VEGF en los grupos II y IV fueron los menores, pero no difirieron de los del grupo III. Las células Treg no mostraron diferencias en el día 28 con respecto al día 0 en los 4 grupos experimentales. La velocidad de crecimiento de M-406 en los ratones atímicos fue mayor en los testigos que en los animales tratados con Cy (p < 0,05). No hubo diferencias en el crecimiento de M-406 entre los testigos atímicos y eutímicos. La inmunohistoquímica en muestras de tumor para marcadores: de proliferación Ki-67 y endotelial CD34, mostró diferencias no significativas entre grupos. La QTM con Cy y Cel, en un modelo murino de cáncer de mama, ejercería su efecto terapéutico inhibiendo la angiogénesis tumoral, al disminuir los niveles de VEGF. Según los parámetros estudiados, la respuesta inmune no fue modulada, a diferencia de lo encontrado en otros tipos de tumores.

449 (503) ESTUDIO DEL MECANISMO DE PROTECCIÓN GENERADO POR LA VACUNACIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON CÉLULAS APOPTÓTICAS DE MELANOMA. Mac Keon S.¹; Gazzaniga S.²; Mallerman J.³; Ruiz M.⁴; Bravo A.⁵; Mordoh J.⁶; Wainstok R.⁷

Laboratorio de Biología Tumoral, Depto de Quím. Biol., FCEyN, UBA; Fundación Instituto Leloir¹; Laboratorio de Biología Tumoral, Depto de Quím. Biol., FCEyN, UBA^{2 3 4}; Laboratorio de Patología Molecular, Htal. Eva Perón⁵; Fundación Instituto Leloir⁶; Laboratorio de Biología Tumoral, Depto de Quím. Biol., FCEyN, UBA; Fundación Instituto Leloir⁷ <solemac@yahoo.com>

Células del melanoma murino B16 en apoptosis (ApoNec), cocultivadas con células dendríticas (CDs) constituye la vacuna CD/ApoNec, que induce una respuesta anti-tumoral dependiente de células CD4+ y CD8+ y genera memoria inmunológica. El objetivo de este trabajo fue analizar la respuesta sistémica a la inmunización con CD/ApoNec, la generación de anticuerpos específicos, y la posibilidad de que micrometástasis que se hayan desarrollado por el desafío tumoral con B16 puedan manifestar-

se al alterar el equilibrio inmunológico. Ratonos C57BL6 recibieron 4 dosis de 2×10^5 CD/ApoNec en el mismo flanco, y el desafío tumoral con 13.000 B16 en el flanco contrario. Nueve semanas después del desafío tumoral se determinó un 90% de supervivencia libre de tumor, comparable a la de animales que recibieron la vacuna alternadamente en ambos flancos ($p=0,12$), pero significativamente diferente a la de animales no vacunados ($p<0,01$). En concordancia con este resultado se determinaron anticuerpos anti-B16 en los sueros de animales vacunados con 4 dosis de CD/ApoNec (título>500), mientras que no se detectaron en los que recibieron una sola dosis. La vacunación con CDs inyectadas conjuntamente con ApoNec pero sin previo cocultivo, que no produce protección, genera niveles de anticuerpos menores (título=200). No se detectaron anticuerpos al administrar ApoNec solas. Los animales protegidos por la vacuna CD/ApoNec no desarrollaron tumores cuando, 3 meses después de realizado el desafío tumoral, se los depletó de linfocitos TCD4 ó TCD8 utilizando anticuerpos específicos. Estos resultados nos permiten concluir que la protección producida por la vacunación con CD/ApoNec es sistémica, con producción de anticuerpos específicos anti-melanoma B16. Para la generación de altos niveles de anticuerpos específicos es necesario el previo cocultivo de las CDs con Apo/Nec. La protección no se revierte por depleción de linfocitos TCD4 ó TCD8, por lo que podría concluirse que no existen micrometástasis "latentes".

445 (523) TERAPIAS COMBINADAS EN LÍNEAS CELULARES LEUCÉMICAS: QUIMIOTERAPIA Y TERAPIA FOTODINÁMICA BASADA EN ALA. Díez B.¹; Cordo Russo R.²; Ernst G.³; Teijo M.⁴; Hajos S.⁵; Battlle A.⁶; Fukuda H.⁷

Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porphirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA ; Cátedra de Inmunología, IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA y CONICET² ; Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porphirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA FCEN, UBA.⁴; Cátedra de Inmunología, IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA y CONICET⁵; Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porphirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA⁶; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA; Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porphirinas (CIPYP), CONICET, Hospital de Clínicas, UBA⁷ <bdiez@qb.fcen.uba.ar>

La aplicación de terapias combinadas con diferentes mecanismos de acción contribuye a incrementar la efectividad y minimizar los efectos adversos en el tratamiento del cáncer. El trasplante de médula ósea asociado a quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas para el tratamiento de la leucemia; una limitación importante es la presencia de células malignas remanentes y la aparición de fenotipos resistentes a multidroga. La Terapia Fotodinámica (TFD) basada en ácido 5 aminolevulico (ALA) es efectiva para erradicar células malignas mediante la fotoactivación de porfirinas endógenas sintetizadas a partir de su precursor ALA. En este trabajo se estudian los efectos de la TFD-ALA combinada con doxorubicina (DOX) y vincristina (VCR), en la línea celular de leucemia murina LBR- sensible a drogas de quimioterapia. Las células se incubaron con DOX 0,05 ug/ml o con VCR 0,01 ug/ml (LD₅₀) durante 20 hs, luego se agregó ALA 1 mM y se continuó la incubación durante 4 hs. Se irradiaron durante distintos tiempos y al cabo de una hora se determinó la viabilidad celular mediante el método de MTT. La supervivencia de las células tratadas con la combinación de ambas terapias fue menor que para las tratadas con las terapias en forma independiente (Tabla I). Utilizando las terapias combinadas, a los 10 min de irradiación se observa una mortalidad superior a la obtenida con el doble de dosis de DOX y VCR. Los resultados obtenidos sugieren que la combinación de TFD y quimioterapia podría constituir una alternativa terapéutica beneficiosa, generando la posibilidad de disminuir las dosis de quimioterapia, minimizando así sus limitaciones y los efectos adversos de la misma.

Tabla I. Supervivencia de células tratadas con TFD, DOX, VCR y la combinación de ambas terapias

% supervivencia (vs a células no tratadas)		5 min	10 min	20 min
Sólo TFD		49,1±3,6	38,2±4,1	30,2±3,4
Sólo DOX	48,6±5,4			
Sólo VCR	45,6±9,8			
TFD y DOX		35,2±2,6	24,0±3,3	23,8±3,5
TFD y VCR		12,0±2,4	16,3±4,1	1,6±0,02

451 (525) EFECTO SINÉRGICO DE TERAPIA FOTODINÁMICA Y β-LAPACHONA EN MODELOS IN VITRO DE CÁNCER DE MAMA. Rumie Vittar N.¹; Lamberti M.²; Ferreira V.³; Da Silva F.⁴; Rivarola V.⁵

Universidad Nacional de Rio Cuarto, FCEFQyN, Dpto Biología Molecular¹ ; Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Dpto de Química Orgánica² ; Universidad Nacional de Rio Cuarto, FCEFQyN, Dpto Biología Molecular⁵ <nrumievittar@exa.unrc.edu.ar>

Las células tumorales, por su metabolismo activo, generan alto nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS), desarrollando respuestas adaptativas antioxidantes. Se ha demostrado que los tumores que sobreexpresan la enzima NAD(P)H quinona oxidoreductasa1 (NQO1) lo hacen como un mecanismo de adaptación a la producción endógena de ROS. La terapia fotodinámica (PDT) contra el cáncer consiste en la aplicación de fotosensibilizadores (PS) que se acumulan preferentemente en tejidos tumorales, y que al ser irradiados producen un aumento desmedido en el nivel de ROS, lo que lleva a la muerte celular. Por otro lado, el quimioterapéutico natural β-lapachona (β-Lap) posee toxicidad selectiva sobre tumores que sobreexpresan la enzima NQO1, señalada como el principal determinante de su citotoxicidad. Nuestra hipótesis consistió en que la producción de ROS como consecuencia de PDT con Me-ALA como PS, induciría la expresión de NQO1, por lo que la actividad citotóxica de β-Lap se vería incrementada, observándose un efecto sinérgico entre ambas terapias. Al realizar los tratamientos de manera independiente sobre tres líneas celulares de adenocarcinoma mamario (MCF-7c3, T47D y LM2), se observó que la LD50 para el tratamiento con β-Lap fue: LM2=3,5uM, MCF-7c3=2,5uM, T47D=1,5 uM; y para MeALA (0,5mM)-PDT: T47D=2,5J/cm², MCF-7c3=2J/cm², LM2= 0,5J/cm²; evidenciando que las líneas celulares que presentaron mayor resistencia a PDT (T47D>MCF-7c3>LM2) resultaron ser más sensibles a β-Lap (T47D>MCF-7c3>LM2). La aplicación de las terapias conjuntas sobre células MCF-7c3, utilizando la LD50, mostró efectos sinérgicos en aquellos casos en que se aplicó una terapéutica a continuación de la otra, siendo el tratamiento más eficiente PDT seguido de β-Lap con una LD100. Estos resultados pueden aplicarse al diseño de una nueva terapia combinada, tendiente a incrementar la eficacia de ambos tratamientos, aplicando dosis mínimas y disminuyendo los efectos no deseados.

452 (550) LA HISTAMINA INHIBE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO M1/15 A TRAVÉS DEL RECEPTOR H4. Massari N.¹; Medina V.²; Brenzoni P.³; Cricco G.⁴; Bergoc R.⁵; Rivera E.⁶

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ARGENTINA²; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³ ; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), ARGENTINA⁵; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁶ <nmassari@ffybu.uba.ar>

El melanoma maligno es un tipo de cáncer de piel que se caracteriza por su alta capacidad invasiva. La histamina actúa como un factor de crecimiento en esta neoplasia y se ha reportado la presencia de los receptores a histamina H1, H2 y H3 en diversas líneas celulares de melanoma humano. Previamente demostramos la presencia del receptor H4 (RH4) en células de melanoma humano primario (WM-35). En ellas, la histamina inhibe la proliferación y la migración e induce diferenciación y senescencia celular a través de la activación del RH4. Por lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia del RH4 en una línea de melanoma humano de alta capacidad metastásica (M1/15) y evaluar las respuestas biológicas mediadas por el mismo. Con este propósito, se investigó en primer lugar, su expresión por RT-PCR e inmunocitoquímica. Asimismo, se evaluó el efecto de agonistas y antagonistas del RH4 sobre: la proliferación celular mediante el ensayo clonogénico e incorporación de BrdU; la senescencia a través de la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia y la diferenciación celular analizando la expresión y la actividad de la enzima tirosinasa responsable de la melanogénesis. Los resultados indican que las células M1/15 expresan el RH4 tanto a nivel del ARNm como a nivel de la proteína. En estas células, el tratamiento con histamina (10 mM) y con los agonistas específicos del RH4 inhibe la proliferación celular (78% de inhibición), reduciendo la incorporación de BrdU (24,8% vs 58,4%, $P < 0.001$) y produciendo una acumulación de las células en la fase G0/G1. Asimismo, la activación del RH4 aumenta el porcentaje de células senescentes, efecto que podría estar asociado a la inhibición de la proliferación celular. En base a los resultados presentados, podemos concluir que el RH4 está involucrado en la regulación de la proliferación celular, proceso clave en la progresión del melanoma maligno.

453 (551) EXPRESIÓN DE GALECTINA-1 (GAL-1) EN CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO-PEQUEÑAS (NSCLC) ESTADIO I Y II. Carlini M.¹; Roitman P.²; Pallota G.³; Lastiri J.⁴; Dallurzo M.⁵; Salatino M.⁶; Bal De Kier Joffe E.⁷; Lauria L.⁸; Rabinovich G.⁹; Puricelli L.¹⁰

Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹ ; Hospital Italiano de Buenos Aires^{2 3 4 5} ; Instituto de Biología y Medicina Experimental⁶ ; Instituto de Oncología Ángel H. Roffo⁷ ; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales⁸ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental⁹ ; Instituto de Oncología Ángel H. Roffo¹⁰ <jopicarlini@yahoo.com.ar>

El NSCLC es el cáncer pulmonar más frecuente, con un riesgo de mal pronóstico de 20% y 30% para pacientes EI y EII, respectivamente. Por lo tanto, la detección de biomarcadores tiene una relevancia clínica significativa. Gal-1 es una proteína de unión a glicanos capaz de modular la angiogénesis y el escape inmune y en consecuencia la progresión tumoral. Nuestro objetivo fue evaluar el posible valor pronóstico de Gal-1 en NSCLC EI y EII (n=66). La expresión de Gal-1 se determinó por inmunohistoquímica, registrándose el porcentaje de inmunopositividad en parénquima, estroma y endotelio, tanto en el tumor como en el tejido "normal" peritumoral. La expresión de Gal-1 se correlacionó con los parámetros clínico-patológicos de los pacientes (prueba Chi-cuadrado) incluyendo la supervivencia global (log-rank test y modelo Cox). El parénquima no tumoral fue siempre negativo para Gal-1. Las células tumorales presentaron distinto grado de tinción, siendo 25/66 (37,9%) casos positivos en más del 10% de las células. El estroma tumoral mostró alta positividad, con sólo 12,1% de casos negativos. El endotelio mostró inmunopositividad en 24/66 (36,4%) y 13/58 (22,4%) casos en las zonas tumoral y peritumoral, respectivamente. No se encontraron asociaciones entre la expresión de Gal-1 y los parámetros edad, T, N, histopatología y hábito tabáquico. El análisis de supervivencia (método Kaplan-Meier) no mostró diferencias asociadas con el nivel de expresión de Gal-1. Sin embargo, estratificando los pacientes según sus características clínico-patológicas, el estudio univariado mostró que la expresión de Gal-1 en las células tumorales se asoció con un peor pronóstico en pacientes con tumores pequeños (T1) ($p < 0,05$). En conclusión, nuestro estudio mostró que Gal-1 se encuentra sobreexpresada en NSCLC, sugi-

riendo su participación en la progresión del cáncer pulmonar humano. Esta observación alienta la evaluación de Gal-1 en una cohorte mayor de pacientes a fin de ahondar en su rol pronóstico.

454 (553) LA SOBRE-EXPRESIÓN DE HEMO-OXIGENASA-1 (HO-1) ANULA LA ANGIOGÉNESIS EN LA LÍNEA DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANA PC3. Ferrando M.¹; Colombo L.²; Gueron G.³; Elguero B.⁴; Meiss R.⁵; De Siervi A.⁶; Vazquez E.⁷

Departamento de Química Biológica, FCEN – UBA, Buenos Aires, Argentina¹ ; Instituto Angel H. Roffo, Buenos Aires, Argentina² ; Departamento de Química Biológica, FCEN – UBA, Buenos Aires, Argentina^{3 4} ; Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina⁵ ; Departamento de Química Biológica, FCEN – UBA, Buenos Aires, Argentina^{6 7} <mercedesf@qb.fcen.uba.ar>

La angiogénesis, creación de nuevos vasos a partir de vasos preexistentes, es muy importante para que un tumor crezca y de metástasis. El factor de crecimiento endotelial (VEGF) es uno de los factores más importantes (aunque no el único) en este proceso. La Hemo oxigenasa-1 (HO-1) posee capacidad anti-angiogénica en ciertos modelos. En trabajos previos demostramos *in vitro*, que cuando la línea de cáncer de próstata humana PC3 sobre-expresa HO-1 disminuye su proliferación, su invasión y muestra una disminución de los niveles del ARNm de VEGF. Con el objetivo de estudiar el rol de HO-1 en la angiogénesis del cáncer de próstata *in vivo*, se inyectaron *intra-dérmico* 2×10^5 células PC3, PC3 transfectadas establemente con HO-1 (PC3HO-1) y su control (PC3Bgal) en el flanco izquierdo de ratones nude junto al colorante azul tripán para localizar el sitio de la inoculación. Contralateralmente se inyectó sólo medio con colorante. Los ratones fueron sacrificados 6 días después, las pieles se fotografiaron bajo lupa y se contaron los vasos sanguíneos pequeños (v.s.p.) por mm² en la zona circundante al sitio de inyección. En cada ratón se relativizó el número de v.s.p./mm², respecto a su lado contralateral. Los datos se presentan como Mediana (rango) aportando cada ratón 1 solo dato: PC3 0,5 (0,17 - 1,6), PC3Bgal 0,5 (-0,5 - 0,77), PC3HO-1 -0,37 (-0,99 - 1,08); PC3HO-1 vs controles $P < 0,05$ (Test de Fisher). Se demuestra claramente que la sobre-expresión de HO-1 evitó la formación de nuevos vasos. Estos resultados si bien preliminares claramente indican que HO-1 es un modulador de la angiogénesis en este modelo de cáncer de próstata.

455 (570) LA SOBREEXPRESIÓN DE RSPO3 INDUCE LA DESREGULACIÓN DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA SUPERVIVENCIA EN FIBROBLASTOS MURINOS NIH3T3. Zimmerlin M.¹; Rubinstein N.²; Coso O.³; Kordon E.⁴

IFIBYNE-CONICET y Dptos. de Qca. Biológica y de Fisiología y Biología Celular, FCEN, UBA^{1 2 3 4} <popizeta@gmail.com>

Hemos demostrado previamente que la sobre-expresión del gen *rspo3* está asociada a la inducción y progresión de tumores mamarios murinos. Además, reportamos que fibroblastos murinos NIH3T3 transfectados en forma estable con un vector de expresión conteniendo el cDNA completo de Rspo3 (línea denominada 3T3-RSPO) son capaces de formar focos de transformación mostrando además niveles elevados de fosforilación de proteínas señaladoras como AKT y p38. El objetivo de este trabajo fue avanzar en el análisis de los mecanismos involucrados en la capacidad oncogénica de Rspo3. Primero, se verificó la actividad transformante de este gen al determinarse la mayor capacidad de las 3T3-RSPO comparadas con las NIH3T3 "naif" de formar colonias en agar blando. Además por tinción con el colorante de cristal violeta hallamos que las primeras eran más resistentes a la privación de suero, pero que su supervivencia mostraba una disminución significativa en presencia del inhibidor farmacológico LY # 294002 (LY) que bloquea la fosforilación de AKT. Para determinar qué proteínas podrían estar asociadas con estos efectos, realizamos ensayos de Western blot y encontramos que las

células 3T3-RSPO expresan mayores niveles de Ciclina D1, Bcl-xL (de actividad anti-apoptótica) y menores niveles de las proteínas BAD y BAX (de actividad pro-apoptótica). Además encontramos que el tratamiento con LY alteró el patrón de expresión de miembros de la familia de proteínas Bcl, sugiriendo que la activación de la cascada PI3K/AKT podría estar involucrada en el balance entre proteínas pro y anti-apoptóticas en las células 3T3-RSPO. Por lo tanto, estos resultados indican que la sobre-expresión de Rspo3 provoca alteraciones en la expresión de diversas proteínas involucradas en la supervivencia y proliferación celular, lo cual es sin duda relevante en su actividad transformante. Además, hallamos evidencias de que al menos parte de los efectos oncogénicos de Rspo3 estarían mediados por la activación de AKT.

456 (571) EL COMPUESTO JNJ7777120, LIGANDO DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H4, INHIBE LAS METÁSTASIS PULMONARES DE TUMORES MAMARIOS HUMANOS TRANSPLANTADOS EN RATONES INMUNODEFICIENTES. Medina V.¹; Croci M.²; Martinel Lamas D.³; Cricco G.⁴; Bergoc R.⁵; Rivera E.⁶

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)¹; Instituto de Inmunooncología, Av. Córdoba 3200, Buenos Aires²; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)⁵; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁶ <vmedina@ffyba.uba.ar>

Previamente reportamos la expresión de los receptores a histamina H3 (RH3) y H4 (RH4) en lesiones benignas y malignas de la glándula mamaria humana. El RH4 se detectó en el 50 % de las lesiones malignas que correspondían a metástasis o tumores altamente invasivos. Los RH3 y RH4 son los principales responsables de las respuestas biológicas mediadas por histamina en las células MDA-MB-231. El objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión del RH4 y examinar los efectos del compuesto JNJ7777120 sobre la sobrevida, tasa de crecimiento tumoral, capacidad metastásica y patrón de expresión molecular de un tumor mamario *in vivo*. Para ello se realizaron xenoinjertos de tumores desarrollados en ratones nude a través de la inoculación de las células MDA-MB-231 derivadas de un carcinoma mamario humano altamente invasivo. Los resultados demuestran que el RH4 se detectó en los tumores que también exhibieron elevada inmunoreactividad para histidina decarboxilasa (HDC) y marcadores de proliferación. Los animales del grupo no tratado mostraron una sobrevida media de 53 días, y un tiempo de duplicación exponencial del tumor de 8.2±0.8 días. Los tumores desarrollados son altamente indiferenciados e invasivos y todos los animales mostraron numerosas metástasis ganglionares y pulmonares (n° metástasis: 18±3). Un 50% de los animales tratados con JNJ7777120 (10 mg/Kg.día, p.o.) no desarrolló metástasis pulmonares mientras que el otro 50% presentó un menor número (7±2, T-test, ***P=0.0005). El tratamiento no modificó significativamente la sobrevida, el tiempo de duplicación del tumor o sus características histológicas. Los tumores de los animales tratados mostraron una reducida inmunoreactividad para el RH4 y HDC. Los resultados demuestran que el compuesto JNJ7777120 es capaz de inhibir significativamente las metástasis pulmonares lo que podría ofrecer un novedoso potencial terapéutico para este ligando del RH4 como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

457 (576) GLIPICANO-3 (GPC3) COMO MARCADOR TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA. Lago Huvelle M.¹; Rodrigues Gomes L.²; Labriola L.³; Armanasco E.⁴; Buchanan C.⁵; Cresta C.⁶; Sogayar M.⁷; Puricelli L.⁸; Peters M.⁹

Instituto de Oncología Angel H. Roffo¹; Nucleo de Terapia Celular y Molecular (NUCEL); Instituto de Química. Univer-

sidad de San Pablo. San Pablo, Brasil.²; Nucleo de Terapia Celular y Molecular (NUCEL) Universidad de San Pablo. San Pablo, Brasil³; Departamento de Patología Mamaria. Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"⁴; Área Investigación; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"⁵; Departamento de Patología Mamaria. Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"⁶; Nucleo de Terapia Celular y Molecular (NUCEL); Instituto de Química. Universidad de San Pablo. San Pablo, Brasil.⁷; Área Investigación; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo"⁸ <mariano86@gmail.com>

Nuestro grupo demostró que la reexpresión de GPC3, un proteoglicano downregulado en cáncer de mama, en células del adenocarcinoma mamario murino LM3 inhibe la formación de metástasis, sugiriendo su rol como supresor metastático. Creemos que la identificación temprana de tumores propensos a metastatizar permitiría una mejor clasificación y tratamiento de los pacientes, reduciéndose así la mortalidad por cáncer de mama. Postulamos que GPC3 sería un marcador capaz de predecir metástasis, por lo que decidimos estudiar su expresión en tumores mamarios, patologías benignas y tejido peritumoral adyacente. Este fue un estudio multiétnico, incluyendo pacientes de Argentina y Brasil. Se analizó la expresión de GPC3 a nivel de proteína mediante IHQ en 56 tumores de mama de bajo estadio (E1 n=14 y EII n=42) y 23 patologías benignas. El número de casos positivos fue muy bajo (20% para las patologías benignas y 10% para los tumores), no superando el 20% de células positivas para cada muestra. Se decidió entonces estudiar la expresión de GPC3 a nivel de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa en Tiempo Real (qPCR). Se analizaron 17 muestras tumorales y 7 de tejido peritumoral. Se determinó que el tejido tumoral presenta menor expresión de GPC3 [(Md (rango): Tumor: 0,06 (0,0008-25,00) vs Control (1,8 (0,08-4,00), Test de Mann-Whitney p=0,007]. Encontramos que en 6/7 casos los tumores expresan menos GPC3 que su correspondiente tejido normal (p=0,013). Este comportamiento se observó en ambas poblaciones. Mediante análisis univariado se estableció que la expresión de GPC3 (ARNm y proteína) no está asociada a los parámetros clínicos-patológicos. En conclusión, establecimos que qPCR es un método más sensible y adecuado para cuantificar GPC3 en tejidos mamarios. Corroboramos que la expresión de GPC3 está disminuida en los tumores de mama. Confiamos que futuros estudios nos permitirán ampliar la población estudiada, a fin de determinar la utilidad de GPC3 como marcador pronóstico.

458 (583) PAPEL DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA H3 Y H4 EN LAS RESPUESTAS BIOLÓGICAS MEDIADAS POR HISTAMINA EN LAS CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO MCF-7. Brenzoni P.¹; Martinel Lamas D.²; Massari N.³; Mondillo C.⁴; Pignataro O.⁵; Bergoc R.⁶; Rivera E.⁷; Medina V.⁸

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires¹; Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)²; Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)³; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)⁴; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)⁵; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)⁶; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)⁷ <vaninamedina78@yahoo.com.ar>

La histamina es una amina biogénica que participa en la regulación de la proliferación y diferenciación celular durante el desarrollo de la glándula mamaria. En el presente trabajo se investigó el papel de los receptores a histamina H3 (RH3) y H4 (RH4) en la regulación de las respuestas biológicas mediada por histamina en la línea celular de cáncer mamario, MCF-7. La ex-

presión de los receptores se investigó por RT-PCR, inmunofluorescencia y ensayos de unión. La proliferación se evaluó mediante el ensayo clonogénico, recuento celular e incorporación de BrdU. La apoptosis se determinó mediante el ensayo de TUNEL, Anexina-V y el potencial de membrana mitocondrial con el colorante DiOC6. La senescencia se estudió a través de la actividad de β -galactosidasa asociada a senescencia. Los resultados muestran que las células MCF-7 expresan los RH3 ($K_d=3,3\pm 0,6$ nM) y RH4. La histamina reduce la proliferación de las células MCF-7 en forma dosis dependiente a partir de una concentración 1 nM, aumentando el tiempo de duplicación de 31,3 h a 41,5 h. Mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos, determinamos que la histamina disminuye la proliferación a través de los RH3 y RH4 (50% y 60% de inhibición, respectivamente). Este efecto inhibitorio sobre la proliferación se asocia con la inducción de apoptosis observándose un aumento significativo del porcentaje de células Anexina-V positivas ($14,6\pm 3,4$ vs. $5,0\pm 0,9$, $P<0,01$), TUNEL-positivas ($10,5\pm 1,5$ vs. $3,6\pm 0,5$, $P<0,01$) y una disminución del potencial de membrana mitocondrial luego de 72 h de tratamiento. Además, el tratamiento con histamina incrementa el porcentaje de células senescentes ($14,4\pm 0,4$ vs. $7,8\pm 0,5$, $P<0,01$). Los resultados demuestran que los RH3 y RH4 son los principales receptores involucrados en la regulación de la proliferación, apoptosis y senescencia celular mediada por histamina en las células MCF-7 siendo éstos, procesos claves en la carcinogénesis mamaria.

459 (590) MECANISMOS ASOCIADOS A LOS EFECTOS ANTIPROLIFERATIVOS DE UN NUEVO ANÁLOGO DE VASOPRESINA SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO HUMANO. Orlando U.¹; Garona J.²; Duarte A.³; Ripoll G.⁴; Maloberti P.⁵; Podestá E.⁶; Gomez D.⁷; Alonso D.⁸

Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas (IIMHNO) Dpto de Bioquímica Humana. Fac. Medicina. UBA.¹; Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes²; Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas (IIMHNO) Dpto de Bioquímica Humana. Fac. Medicina. UBA.³; Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes⁴; Instituto de Investigaciones Moleculares de Enfermedades Hormonales, Neurodegenerativas y Oncológicas (IIMHNO) Dpto de Bioquímica Humana. Fac. Medicina. UBA.⁵; Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes⁶; ⁸ <ulises_orlando@yahoo.com.ar>

La desmopresina (DDAVP) es un buen agente antitumoral en modelos murinos de cáncer mamario y en ensayos veterinarios en caninos. Este péptido se une al receptor V2 de vasopresina presente en el endotelio vascular, elevando los niveles plasmáticos del factor von Willebrand, factor VIII de la coagulación y de activadores del plasminógeno mediante la activación de la proteína G y la inducción de altos niveles de AMPc. V2 se expresa en algunos tipos tumorales, incluyendo cáncer mamario y su expresión ha sido asociada con mecanismos antiproliferativos. Introduciendo racionalmente cambios en la estructura de la molécula DDAVP se ha sintetizado un nuevo análogo denominado VQ (1-desamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina) buscando un compuesto con mayor actividad que la molécula parental. En este trabajo, evaluamos la capacidad antiproliferativa del análogo VQ sobre células de carcinoma mamario MCF7. La incubación de VQ (100-1500 nM) sobre monocapas en crecimiento exponencial de células MCF7 durante 72 h redujo significativamente la proliferación celular ($p<0,001$) mostrando ser aún más eficiente que la molécula parental DDAVP en el rango de dosis de 500-1500nM ($p<0,05$). La inhibición en la proliferación también se puede observar incubando las células con el análogo del AMPc, el 8Br-cAMP ($18,3\pm 3,5$; $25,2\pm 6,8$ y $39,3\pm 7,7$ % de inhibición respecto del control para concentraciones de 0,1, 0,3 y 0,5 mM de 8Br-cAMP respectivamente). El tratamiento con 8Br-cAMP en presencia de la mínima concentración de VQ que genera una respuesta per se (100 nM) produce un efecto inhibitorio sinérgico ($p<0,01$) ($17,4 \pm 2,5$ vs $35,3 \pm 2,3$, 0,1mM 8Br-cAMP vs 0,1mM

8Br-cAMP + VQ). Este sinergismo también se observa cuando se inhibe la proliferación con inhibidores de quinasas río arriba de PKA tal como MAPK. Estos resultados sugieren que VQ estaría operando a través de procesos de fosfo-defosforilación de proteínas en el efecto antiproliferativo sobre la línea celular MCF7.

460 (602) INFLUENCIA DE LA OBSTRUCCIÓN VASCULAR EN EL DESARROLLO DE METÁSTASIS EXPERIMENTALES EN PULMÓN. Cresta Morgado P.¹; Vanzulli S.²; Lodillinsky C.³; Eiján A.⁴; Colombo L.⁵

Instituto A. H. Roffo. UBA¹; Inst. Invest. Oncológicas, Fund Maissa, Acad. Nac. Medicina.²; Instituto A. H. Roffo. UBA³ ^{4 5} <pablo_crestam@hotmail.com>

Objetivo: Nos preguntamos si la obstrucción vascular es un fenómeno que podría contribuir a la implantación y/o crecimiento de las metástasis. Material y Metodos: Utilizamos esferas de 20 a 50 micrones de diámetro de un componente inerte (Sephadex G-25-50, Sph) como obstruccionadores de vasos pulmonares luego de su inoculación endovenosa (iv). Evaluamos el efecto sobre el desarrollo de las metástasis experimentales en pulmón (MtsExp) de la línea de cáncer de mama LM3, inoculadas iv 7 días más tarde. 13 ratones BALB/c son inoculados iv con 0.3ml de solución fisiológica (SF), 15 con 50.000 Sph (Sph50) y 9 con 100.000 Sph (Sph100). 7 días más tarde todos son inoculados iv con 100.000 células LM3, sacrificándolos 21 días después. Sus pulmones, fijados en Bouin fueron analizados bajo lupa estereoscópica registrándose el número y tamaño de las MtsExp superficiales (MtsExpSup). Para el análisis de MtsExp internas (MtsExpInt) 4 pulmones representativos de cada grupo fueron analizados en cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-Eosina. Resultados: El número de MtsExp aumentó significativamente en el grupo inoculado con Sph100 ($p<0,001$) (mediana (rango)) SF: 52 (13-152), Sph50: 59 (37-229) y Sph100: 176 (82-284), pero no se detectó variación en el tamaño de las metástasis. Por análisis histológico se determinaron MtsExpInt y MtsExpSup; SF: 3 (0-12) y 8 (6-25), Sph50: 3 (0-23) y 11 (5-54); Sph100: 23 (13-34) y 38 (26-52), respectivamente. En el grupo Sph100 observamos mayor incremento en el número de MtsExpInt (7,7 veces) que en las MtsExpSup (4,7 veces). Conclusiones: La inoculación iv de 100.000 esferas de Sephadex 25-50 favorecería el arresto de células LM3 en el pulmón, sin afectar su velocidad de crecimiento. Este modelo podría ser útil para estudiar la relevancia de las obstrucciones vasculares mecánicas en el proceso metastático.

461 (633) SEÑALES INVOLUCRADAS EN LA PROLIFERACIÓN CELULAR AUMENTAN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE RAC3 POR ACCIÓN DIRECTA A NIVEL DE SU PROMOTOR. Alvarado C.¹; Micenmacher S.²; Fernandez Larrosa P.³; Rubio M.⁴; Ruiz Grecco M.⁵; Costas M.⁶

IDIM-CONICET^{1 2 3 4 5 6} <cevra8@hotmail.com>

Demostamos que el coactivador de receptores nucleares RAC3, es también coactivador de NF- κ B y que tiene actividad protectora de la apoptosis y participa en la regulación de proteínas clave del ciclo celular. Aunque sus niveles son limitantes en células normales, su sobre-expresión se asocia al desarrollo de tumores tanto hormono-dependientes como independientes. Demostamos previamente que la citoquina TNF- α y el factor de transcripción NF- κ B modulaban positivamente la expresión proteica de RAC3 en células no tumorales HEK293 (con bajos niveles del mismo). Con el objetivo de analizar si esta vía u otras señales desreguladas en tumorigénesis como el supresor tumoral P53 o condiciones de hipoxia previas a la angiogénesis podrían actuar en etiquetas blanco del promotor del gen de RAC3 y su efecto modulador sobre el mismo, se amplificó mediante PCR con primers específicos sobre ADN genómico la región de 967pb conteniendo el primer exon del gen y fue clonada en el plásmido pGL3-basic río arriba del gen de luciferasa. La construcción fue transfectada en células HEK293, sola o simultáneamente con vector de expresión de los distintos factores: NF- κ B, I κ B-ss y P53. Se observó un aumento de actividad luciferasa de un 300 +/-20%

en cotransfección con la subunidad RelA de NF- κ B respecto de condiciones basales, que disminuyó un 200 +/-20% en presencia de I κ B-ss super-represor que impide la activación de NF- κ B y un aumento de 50 +/-5% al ser estimuladas con TNF- α por 24hs. Por cotransfección con P53 se vió un aumento del 450+/-30% mientras que al ser llevadas a condiciones de anaerobiosis 1%O₂ por 3h se apreció una disminución de la actividad de 10+/-2%. Resultados similares se observaron a nivel proteico mediante *western blot*. De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que las señales habitualmente involucradas en la proliferación celular y el desarrollo tumoral pueden ser responsables directas del aumento en los niveles de expresión de RAC3.

- 462 (644) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE NANOFIBRAS DE POLIANILINA EN LARVAS DE RHINELLA ARENARUM Y EN RATONES BALB/C PARA SU APLICACIÓN EN TERAPIA FOTOTÉRMICA.** Yslas I.¹; Ibarra L.²; Peralta D.³; Barbero C.⁴; Rivarola V.⁵; Bertuzzi M.⁶

Dpto Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto; Dpto Química, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto¹; Dpto Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto²; Dpto Química, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto³; Dpto Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto⁴; Dpto Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto⁵; <eyslas@exa.unrc.edu.ar>

Los nanomateriales de polianilina han alcanzado significativo interés en los últimos años, por su fácil proceso de síntesis, estabilidad ambiental, bajo costo y potencial aplicación. Dichos nanomateriales al ser irradiados con pulsos de luz del infrarrojo cercano, absorben la radiación y la liberan como calor provocando la regresión tumoral. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Evaluar la toxicidad de polianilina nanoestructurada y dispersada en polivinilpirrolidona mediante el test de toxicidad en larvas de *Rhinella arenarum*, la cinética de incorporación y la excreción. 2) Realizar estudios, en ratones Balb/c de posibles efectos tóxicos por pruebas de funcionalidad hepática GPT (transaminasa glutámico pirúvica), creatinina y urea en suero. Los estudios de toxicidad en larvas indicaron que a concentraciones entre 0-400 mg/l las nanofibras no provocaron daños letales. Por otra parte se comprobó la internalización y se determinó la cinética de incorporación de la droga durante 96 hs mediante absorbancia UV-visible. Además se observó diferencias en cuanto a coloración de la materia fecal de larvas incubadas con nanofibras con respecto a sus controles, indicando su tránsito por el aparato digestivo (espectroscopia UV-visible e IR). Por otro lado, en ratones Balb/c tratados a una concentración de 3 mg de nanofibras/Kg peso corporal por vía intraperitoneal no se observaron signos de toxicidad. Por todo lo expuesto se concluye que la administración de las nanofibras de polianilina son biocompatibles y por tal motivo podrían ser aplicadas en Terapia fotoasistida anticancerígena.

ONCOLOGIA 6

- 463 (667) ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE C-SRC/HER1 Y DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS α EN GLÁNDULA MAMARIA Y EN TUMORES MAMARIOS EN RATA.** Peña D.¹; Pontillo C.²; García M.³; Cocca C.⁴; Alvarez L.⁵; Lux-lantos V.⁶; Frahm I.⁷; Bergoc R.⁸; Kleiman D.⁹; Randi A.¹⁰

Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Depto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3}; Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Depto de Fisicomatemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴; Laboratorio de Efectos Biológicos de Con-

taminantes Ambientales, Depto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁵; Laboratorio de Neuroendocrinología, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET⁶; Departamento de Patología, Sanatorio Mater-Dei, Buenos Aires.⁷; Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Depto de Fisicomatemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁸; Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Depto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{9 10} <delfispitonisa@hotmail.com>

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado promotor tumoral en hígado, tiroides y glándula mamaria de rata. Demostramos que el HCB aumenta el número de tumores mamarios y el volumen tumoral. Los E2 activan la vía del HER1 por medio del receptor de estrógenos α (RE α) y c-Src. Esta proteína fosforila al RE α en Tyr537 y su asociación activa al ERK1-2. La interacción c-Src-HER1 induce proliferación, migración y metástasis. Nuestro objetivo fue estudiar la acción del HCB sobre las vías de señalización de c-Src/HER1 y del RE α en glándula mamaria (GM) y tumores mamarios (T) inducidos por NMU en rata. Grupos: Control, HCB (100 mg/kg) por 60 días, NMU, 3 dosis de 50 mg/kg y NMU-HCB. Los análisis de expresión y actividad de proteínas se realizaron por inmunoprecipitación e inmunoblot. Se realizaron estudios histopatológicos y las concentraciones séricas de E2 y P4 se determinaron por RIA. Los resultados mostraron que el HCB indujo: 1) en GM un aumento en la hiperplasia, proliferación ductal, en la activación de c-Src (67%) y en fosforilación de Tyr845-HER1 (472%), así como en la asociación c-Src/HER1 (322%) y en la actividad de ERK1-2 (83%). Asimismo, incrementa la fosforilación Tyr537-RE α (54%) y su interacción con c-Src (101%); 2) en T, un incremento en el grado tumoral, necrosis y número de mastocitos, en la actividad de c-Src (57%), así como de pTyr845-HER1(490%) y en la interacción de ambas moléculas (147%). En cambio, aumenta la expresión del RE α y disminuye tanto la pTyr537-RE α (153%) como su asociación con c-Src (68%); 3) aumento en niveles de E2 (100%) y disminución en P4 (41%) en ratas HCB, mientras que tuvo el efecto contrario en ratas NMU-HCB. Demostramos que el HCB presenta un efecto proliferativo y estrogénico en la GM, estimulando la vía de señalización de c-Src/HER1 así como la actividad del RE α . En cambio, en T induce el camino c-Src/HER1, pero disminuye la actividad del RE α , transformando a los tumores hacia un fenotipo de mayor malignidad.

- 464 (669) PROGRESIÓN TUMORAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA: PAPEL DE GLIPLICANO-3 (GPC3) Y DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT.** Buchanan C.¹; Lago Huvelle A.²; Bal De Kier Joffe E.³; Peters M.⁴

Área de Investigación, Instituto de Oncología^{1 2 3 4} <buchanancecilia@hotmail.com>

Glipecano-3 (GPC3) es un proteoglicano presente en tejidos mamarios normales, cuya expresión se reduce en los tumores. Demostramos que la reexpresión de GPC3 en células del adenocarcinoma mamario murino LM3 inhibe la formación de metástasis, sugiriendo su rol como supresor metastático. Nuestros datos previos y los reportados por otros grupos indican a la vía Wnt como la cascada principal en la señalización de GPC3. Por eso realizamos un estudio exhaustivo de los componentes de la vía Wnt canónica que se encuentra inhibida en las células LM3-GPC3. Con este objetivo, extrajimos ARN total de células LM3-GPC3 y LM3-vector, obtuvimos AdNc que fue utilizado como template en arrays de PCR en tiempo real. De los 84 genes analizados, ninguno resultó upregulado, 83 fueron downregulados (entre ellos: axina1, dishveed 1 (DVL1), proteína asociada a catenina-cadherina 1 (Ctnnb1), ciclina D3 (CCND3), glicógeno sintetasa kinasa 3 Beta (GSK3B), casein kinasa 1 (Csnk1d), factor de morfogénesis 1 asociado a DVL (Daam1) y proteína transmembrana que contiene Kringle (Kremen) y la expresión de 1 no fue modificada por GPC3 (Wnt5b). Hipotetizamos que GPC3 podría actuar como antagonista de los factores Wnt canónicos,

resultando en la inhibición de esta vía. Por su parte, la baja expresión de Ctnnb1, Daam1 y DVL explicaría la reversión de la TEM detectada previamente en las células que expresan GPC3. Así, los clones que reexpresan GPC3 serían menos migrantes, más adhesivos célula-célula y más senescentes que los controles. Concluimos que GPC3 es capaz de regular a la vía canónica de Wnt de manera genómica y no genómica. Las alteraciones en la expresión de los genes estudiados justifican la modificación del comportamiento de las células LM3. El entendimiento de estos mecanismos nos ayudará a comprender cómo GPC3 inhibe la metástasis *in vivo*, siendo esto último de potencial aplicación en la terapia del cáncer de mama

465 (700) EL TRATAMIENTO CON UN DERIVADO DE LA VITAMINA A (ATRA) MODULA LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA ISOFORMA DELTA DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN CÉLULAS MAMARIAS MURINAS. Berardi D.¹; Díaz Bessone M.²; Bal De Kier Joffé E.³; Urtreger A.⁴; Todaro L.⁵

Instituto A. H. Roffo^{1 2 3 4 5}

<dami_emi_berardi@hotmail.com>

Los retinoides ejercen algunos de sus efectos sobre la diferenciación celular y reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con isoformas de PKC. En este trabajo nos propusimos: A) estudiar el rol del ATRA sobre el crecimiento de las líneas celulares mamarias murinas LM3 (tumoral) y NMuMG (normal). B) evaluar el efecto del tratamiento retinoideo sobre la expresión y distribución subcelular de la PKCδ. C) Valorar la importancia de PKCδ en la actividad de los receptores retinoideos. El tratamiento con ATRA (1μM, 72h) indujo la inhibición del crecimiento celular. Este fenómeno se asoció a una reducción en pERK (80±9% y 40±5% en LM3 y NMuMG resp.) y a un aumento en los niveles del inhibidor del ciclo celular p27 en fracción nuclear, sin alterar la expresión de Ciclina D1 en ambas líneas celulares. Por WB determinamos que el tratamiento con ATRA (72h) indujo un aumento en los niveles de PKCδ tanto en núcleo (4 veces) como en citoplasma (2 veces) en la línea LM3. La línea NMuMG sólo mostró modulación citoplasmática (50±7% de reducción). En el caso de LM3 estos resultados fueron corroborados por inmunofluorescencia. El silenciamiento farmacológico de PKCδ en LM3, impidió la activación de los receptores retinoideos por ATRA, evidenciado a través de un ensayo con un gen reportero (RARE-Luciferasa). Nuestros resultados indican que el tratamiento con ATRA inhibe el crecimiento de las células mamarias murinas. Además, el ATRA fue capaz de modular la expresión y localización subcelular de PKCδ y el efecto del ATRA, ejercido a través de la activación de sus receptores nucleares, dependería al menos en parte de la traslocación al núcleo de esta isoforma de PKC.

466 (724) MODULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK POR ÁCIDO HIALURÓNICO (AH) Y OLIGOSACÁRIDOS DE ÉSTE (OAH) EN UNA LÍNEA CELULAR DERIVADA DE UN LINFOMA T MURINO. IMPLICANCIA EN LA APOPTOSIS. Lompardía S.¹; Cordo Russo R.²; Papademetrio D.³; Álvarez é.⁴; Hajos S.⁵

Cátedra de inmunología-IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET^{1 2 3 4 5}
<sil_escalada@hotmail.com>

El AH es un glucosaminoglicano componente de la matriz extracelular cuyos niveles se hallan aumentados en los tumores debido a un desbalance en su cantidad y calidad. El AH, a través de su interacción con receptores como CD44, modularía el crecimiento y metástasis tumoral por activación de diferentes vías de señalización. La perturbación de estas señales por o-AH (fragmentos de AH) impediría el crecimiento tumoral por inhibición de vías de sobrevivencia como PI3K/Akt e inducción de la apoptosis. Erk es una proteína activada principalmente por Map kinasas, involucrada en la supervivencia celular, que se encuentra sobreactivada en diversos tipos tumorales. En este trabajo se utilizó una línea ce-

lular resistente a multidrogas (LBR-D160) derivada de un linfoma T murino, con el objetivo de evaluar la capacidad de AH y o-AH de modular la apoptosis así como la activación de Erk. La apoptosis se analizó por tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio observándose que o-AH indujeron un aumento significativo de la apoptosis tanto en dosis de 150 μg/ml (13.5% ± 3.1%) como de 300 μg/ml (18.9% ± 4.5%) respecto del basal (p<0.001) sin observarse ese efecto con AH en dosis de 50 y de 200 μg/ml (5.5% ± 5.2% y 6.4% ± 6.1% respectivamente, p>0.05). La activación de Erk se evaluó a través de los niveles de p-Erk analizados por western blot. Se observó en las células tratadas con o-AH (300 μg/ml) por 10, 30 y 60 minutos una disminución de p-Erk de 70, 62 y 66% respecto del control, mientras que AH (200 μg/ml) incrementó los niveles de p-Erk en 122% a los 10, 119% a los 30 y 109% a los 60 minutos. De lo expuesto concluimos que o-AH, pero no AH, inducen la apoptosis en LBR-D160 hecho que podría relacionarse con la disminución de p-Erk. Postulamos que dada la capacidad de o-AH de inhibir el mecanismo de sobrevivencia mediado por Erk, o-AH podría ser utilizado en combinación con otras drogas en la terapia de patologías oncohematológicas.

467 (742) ACCIÓN DIFERENCIAL DOSIS DEPENDIENTE DEL HEXACLOROBENCENO SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y LA MUERTE CELULAR EN LA LÍNEA MCF-7. Gaido V.¹; Pontillo C.²; García M.³; Alvarez L.⁴; Kleiman D.⁵; Rivera E.⁶; Randi A.⁷; Cocca C.⁸

*Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física. Departamento de Fisicomatemática. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*¹; *Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina, UBA.*^{2 3 4 5}; *Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física. Departamento de Fisicomatemática. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*⁶; *Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina, UBA.*⁷; *Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física. Departamento de Fisicomatemática. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*⁸
<vir18gaido@hotmail.com>

Los factores ambientales cumplen un importante papel en la etiología del cáncer mamario. El hexaclorobenceno (HCB) es un fungicida organoclorado persistente en el medioambiente, que tiene efectos perniciosos para la salud humana. En animales el HCB es un promotor de tumores hepáticos y tiroideos. Hemos demostrado su acción como agente co-carcinogénico en la inducción de tumores mamarios en ratas. Objetivos: evaluar el efecto del HCB sobre el ciclo, la proliferación y la muerte en la línea celular MCF-7 receptor a estrógeno α (REα) positiva derivada de un carcinoma mamario humano. Evaluamos las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo, la proliferación mediante el recuento de colonias en placa y el análisis de incorporación de BrdU. Además estudiamos la apoptosis por el ensayo del TUNEL. Analizamos la expresión de proteínas involucradas en dichos procesos, mediante inmunoblot. Resultados: el HCB 0.005 y 0.05 μM induce proliferación celular, lo que se traduce en un aumento del porcentaje de células en fase S del ciclo (p<0.05), y un aumento del 50% del número de colonias y 70% del número de células BrdU positivas (p<0.001). A estas dosis, el tóxico induce un aumento del 50% en la activación de la proteína oncogénica c-Src (p<0.05) y del 200% en la fosforilación de la Tyr537 del REα asociada a la activación de este receptor (p<0.001). En cambio, 0.5 y 5 μM de HCB producen un incremento del 50% del número de células apoptóticas y del 20% en la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax y 15% en la proteína p27 que inhibe la progresión del ciclo celular (p<0.05). Conclusiones: nuestro estudio muestra que el HCB, en bajas dosis, estimula la proliferación celular aumentando el porcentaje de células en la fase S. La activación de c-Src y del REα a estas concentraciones sugiere que esta vía estaría involucrada en el mecanismo de acción del tóxico. El aumento de la apoptosis a dosis mayores se correlaciona con el aumento de la proteína Bax y la p27.

468 (761) EXPRESIÓN DE HEMOXIGENASA-1 EN CARCINOMAS COLORRECTALES HUMANOS Y EN UN MODELO ANIMAL DE INDUCCIÓN CON 1,2-DIMETILHIDRAZINA.

Gandini N.¹; Andres N.²; Lang C.³; Fermento M.⁴; Salomon D.⁵; Gonzalez Donna M.⁶; Ferro A.⁷; Facchinetti M.⁸; Curino A.⁹

Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca, INIBIBB, CONICET^{1 2 3 4 5}; Servicio de Oncología, Hospital Italiano Regional Sur, Bahía Blanca, Argentina.^{6 7}; Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca, INIBIBB, CONICET^{8 9} <ngandini@uns.edu.ar>

En el cancer colorrectal (CCR), tumores histopatológicamente idénticos pueden presentar importantes diferencias en la progresión y respuesta al tratamiento, lo cual refleja la necesidad de hallar nuevos marcadores moleculares para este tipo de cáncer. Recientemente se ha visto que la hemoxigenasa-1 (HO-1) está relacionada con mecanismos antiapoptóticos y proliferativos, así como también se ha demostrado su rol en la angiogénesis y en la metástasis. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la expresión de HO-1 en biopsias quirúrgicas de pacientes de CCR metastásico, e investigar el rol de HO-1 en la carcinogénesis y progresión del CCR utilizando un modelo animal. Para los estudios en biopsias humanas, se emplearon 25 muestras de CCR (estadios I a III) a los cuales se les realizó inmunohistoquímica (IHQ) para determinar la expresión de HO-1. Para los estudios con animales, 30 ratas Wistar fueron inducidas con 1,2-dimetilhidrazina. Los animales fueron sacrificados escalonadamente, obteniéndose pólipos y carcinomas, los cuales se utilizaron para estudiar la expresión de HO-1 por IHQ y por western blot (WB). El 76% (19/25) de las muestras humanas fueron positivas (>10% de células inmunomarcadas) para HO-1. La zona adyacente con histología normal mostró marcación a nivel del epitelio apical y ausencia de expresión a nivel basal. Además, la comparación de la intensidad de marcación mostró diferencias entre el epitelio tumoral y la mucosa normal ($p=0,02$). En el modelo animal, la expresión de HO-1 fue positiva en 15/15 (100%) de los tumores de rata, mostrando similitud con el patrón de expresión observado en humanos. Se detectó, tanto por WB como por IHQ, un aumento de HO-1 con la progresión tumoral. La sobreexpresión de HO-1 en los tumores con respecto a los tejidos normales refuerza la hipótesis de su importancia en cáncer y el modelo animal estudiado corrobora los resultados obtenidos en tumores humanos e indica que el mismo será adecuado para futuros estudios.

469 (770) PROGRESIÓN TUMORAL EN CÁNCER DE MAMA: ACCIÓN DE LA HEMOXIGENASA-1. Gandini N.¹; Fermento M.²; Lang C.³; Salomon D.⁴; Facchinetti M.⁵; Curino A.⁶

Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca, INIBIBB, CONICET^{1 2 3 4 5 6} <ngandini@uns.edu.ar>

Estudios recientes muestran que la Hemoxigenasa-1 (HO-1) es un importante regulador de los procesos neoplásicos. En cáncer de mama, la enzima ha sido relacionada con la proliferación celular y la invasión tisular. El objetivo de este estudio fue investigar el rol de HO-1 en el cáncer de mama. Con este fin se procesaron por inmunohistoquímica 60 muestras de carcinomas mamarios humanos (estadios I-IV) observándose expresión en el 73% de las mismas. Los niveles de expresión fueron marcadamente más elevados en el epitelio tumoral que en el área adyacente histológicamente normal (Mann-Whitney U Test; $p<0,05$). Sorprendentemente, en el 22 % de los tumores en los que se detectó HO-1 la enzima presentó expresión nuclear además de citoplasmática. La expresión nuclear fue confirmada en células LM3 por purificación de núcleos en gradientes de sacarosa y Western Blot. Utilizando el método de Kaplan Meier se detectó una asociación entre la expresión de la proteína y la supervivencia de los pacientes (Log rank test, $p<0,05$). Seguidamente se investigó el rol de HO-1 en la supervivencia/proliferación y en la migración celular utilizando cultivos primarios de tumores mamarios provenientes de ratas inducidas con 7,12-DMBA y la línea celu-

lar LM3. El aumento de la actividad HO-1 inducido por hemina condujo a una reducción del 22% en la supervivencia/proliferación celular ($p<0,05$) mientras que la inhibición de su actividad por SnPP mostró un 75% de aumento ($p=0,007$). Sin embargo, no observamos cambios significativos en la expresión de las ciclinas D y E después del tratamiento con estos moduladores de la acción de la enzima. La modulación de la actividad de la enzima por SnPP y hemina mostró que HO-1 es un inhibidor de la motilidad celular. Los resultados de este estudio muestran que la proteína HO-1 se encuentra sobreexpresada en cáncer de mama y sugiere que HO-1 podría estar participando en la progresión tumoral modulando la proliferación y la migración celular.

470 (781) DETECCIÓN DE HO-1 EN GLIOMAS HUMANOS. Gandini N.¹; Salomon D.²; Fermento M.³; Zenklusen J.⁴; Robles A.⁵; Curino A.⁶; Facchinetti M.⁷

Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca, INIBIBB, CONICET^{1 2 3}; Office of Cancer Genomics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD.⁴; Laboratory of Human Carcinogenesis, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD.⁵; Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca, INIBIBB, CONICET^{6 7} <ngandini@uns.edu.ar>

Estudios en líneas celulares tumorales indican que la enzima hemoxigenasa 1 (HO-1) tiene efectos citoprotectores y antiapoptóticos. Dos reportes previos realizados con bajo número de muestras informan sobreexpresión de HO-1 en gliomas. El objetivo del este trabajo fue estudiar la expresión de esta enzima en gliomas humanos y correlacionarla con datos clínicos. Se utilizó un microarreglo de tejidos con 18 astrocitomas (ASTRO, WHO grado II y III), 29 oligodendrogliomas (OLIGO, WHO grado II y III), 12 mixtos (WHO grado II y III), 57 glioblastomas multiformes (GBM, WHO grado IV) y 18 muestras de tejido cerebral normal. HO-1 presentó expresión citoplasmática y en el 10% de los ASTRO y de los OLIGO de grado III se detectó también expresión nuclear. Esta inusual localización fue confirmada en dos líneas celulares, T98 y U87. La enzima fue detectada en el 62 % de ASTRO, 61 % de OLIGO, 42 % de mixtos, 51 % de los GBM y en el 22 % de las muestras de tejido normal, aunque en este último caso con baja intensidad. Se detectaron diferencias significativas en la frecuencia de expresión entre el tejido normal y oligodendrogliomas ($p=0,012$) y astrocitomas ($p=0,027$). No se observó asociación entre el grado del tumor y la expresión. La presencia de la enzima en estos tumores fue confirmada mediante la detección de su mRNA por RT-PCR en 5 muestras. El estudio de Kaplan Meier reveló una disminución significativa de la supervivencia global de los pacientes con ASTRO ($p=0,03$). El tratamiento con SnPP (inhibidor de HO-1) indujo una disminución del 21% en la proliferación/supervivencia celular en las células U87 ($p=0,011$). El tratamiento con hemina (activador de la HO-1) indujo la expresión de la enzima sin alterar los niveles de ciclina D. En conclusión, nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de HO-1 en gliomas con respecto al tejido cerebral normal, una correlación negativa con la supervivencia de los pacientes y un efecto de la enzima sobre la proliferación celular.

471 (784) EFECTO DEL SELENIO SOBRE LA ACCIÓN DE TGF- β EN UNA LÍNEA DE CÉLULAS DE CÁNCER FOLICULAR DE TIROIDES HUMANAS Y EN CÉLULAS DE CÁNCER IN-DIFERENCIADO DE COLÓN. Oglio R.¹; Thomasz L.²; Perona M.³; Juvenal G.⁴; Pisarev M.⁵

Centro Atómico Constituyentes^{1 2 3 4 5} <oglio@cnea.gov.ar>

Diversas observaciones sugieren que los efectos de TGF- β podrían ser mediados por el aumento de especies reactivas del oxígeno (EROs). Actualmente, no hay información sobre la participación de EROs en la señalización inducida por el TGF- β en tiroides. El objetivo del trabajo es estudiar el efecto del Selenio (Se) en la disminución de la viabilidad celular inducida por el TGF-

β , sobre líneas de carcinoma folicular y de cáncer indiferenciado de colon y su correlación con las EROs. Resultados y Metodología: 1) La viabilidad se determinó por ensayo de MTT. Las células se trataron por 72hs con dosis crecientes de TGF- β . Independientemente de la isoforma utilizada (TGF- β 1, β 2 y β 3), en células tiroideas se observó una inhibición del 20% con 0,5ng/mL y del 30-40% con 5 y 10ng/mL ($p < 0,01$); en células de colon la inhibición fue del 10% con 0,5ng/mL y del 20-35% con 5 y 10ng/mL ($p < 0,01$). 2) Se estudió el efecto del Se sobre la inhibición de la viabilidad celular inducida por 5ng/mL de TGF- β ; 0,01 μ M de Se revierte el efecto de TGF- β en un 20% ($P < 0,001$) en células tiroideas, en tanto que en colon se observa la reversión total ($P < 0,01$). 3) El efecto de TGF- β sobre el contenido intracelular de glutatión reducido (GSH) se determinó por el método Anderson (1985); al exponer la línea tiroidea, se observa una disminución de GSH entre las 48hs y 72hs de incubación con TGF- β 2 y β 3 ($P < 0,01$). Sin embargo, con TGF- β 1, se observa un decremento a las 24hs ($P < 0,05$) y una recomposición del GSH a partir de las 48hs. 4) El aumento de EROs en células tiroideas se detectó con la sonda fluorescente intracelular DCFH-DA. El efecto observado fue dependiente del tiempo estudiado (24hs). El máximo se observó a los 45min con TGF- β 1 y a las 3hs con TGF- β 2 y β 3 ($P < 0,01$). Conclusión: El efecto de TGF- β puede revertirse parcialmente en tiroides y totalmente en colon bajo la influencia del Se. Los resultados obtenidos sugieren que la disminución de la viabilidad celular en tiroides podría ser por los EROs.

472 (194) EFECTO BIFASICO DE UN TUMOR PRIMARIO SOBRE EL CRECIMIENTO DE IMPLANTES TUMORALES SECUNDARIOS. Bruzzo J.¹; Chiarella P.²; Meiss R.³; Ruggiero R.⁴

ILEX-CONICET^{1 2 3 4} <juanbruzzo@yahoo.com.ar>

El fenómeno de hormesis se caracteriza por una dosis-respuesta bifásica, que exhibe efectos opuestos en dosis bajas y altas. La evidencia acumulada en los últimos años sugiere que este modelo de dosis-respuesta es más común de lo que se pensó previamente. Para saber si este fenómeno describe las interacciones entre dos tumores implantados en un mismo organismo, estudiamos los efectos de un linfoma no inmunogénico (LB, iniciado con un inóculo de 10⁶ células) sobre el crecimiento de implantes secundarios del mismo tumor (10⁵ células LB en el flanco contralateral) realizados a los días 0, 1, 2, 3, 4, 6 y 9 del crecimiento primario. En todos los grupos el n° de ratones fue 6 y se midió el crecimiento tumoral al día 15 después del inóculo secundario. El crecimiento del tumor control, inoculado con 10⁵ células LB, equivale a 100%. El tumor primario produjo efectos diferentes sobre el crecimiento de un tumor secundario dependiendo del día en el cual éste fue implantado. Cuando se implantó al día 0 ó 2 no hubo diferencias significativas con respecto al control (72,8% y 93,6% respectivamente). Cuando el tumor secundario se implantó al día 1 se detectó un aumento significativo (146,8% $p < 0,05$). Finalmente, cuando se implantó a partir del día 3 hubo una inhibición que se hizo mayor a medida que el tumor primario era más grande al tiempo del 2° inóculo (día 3: 54,1% $p < 0,05$; día 4: 40,1% $p < 0,01$; día 6 y 9: 0% $p < 0,001$). Teniendo en cuenta que una metástasis puede ser considerada como un implante secundario natural, este fenómeno puede tener implicancias clínicas, ya que podría predecir ventanas inhibitorias o estimuladoras, por ejemplo si un paciente portador de tumor está en la ventana inhibitoria, la extirpación tumoral podría aumentar el crecimiento de las metástasis y recíprocamente, si está en la zona estimuladora, la extirpación podría no sólo resultar en una disminución de la carga del tumor primario, sino también en una inhibición del crecimiento de las metástasis.

473 (751) EFECTO TERAPÉUTICO ANTITUMORAL DE UNA CEPA DE SALMONELLA TYPHI EN UN MODELO MURINO DE TIMOMA. Vendrell A.¹; Gravisaco. M.²; Rodríguez C.³; Herschlik L.⁴; Mongini C.⁵; Waldner C.⁶

CEFyBO¹; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria²; CEFyBO^{3 4 5 6} <claudiawaldner@yahoo.com

Previamente demostramos el efecto antitumoral de una cepa de *Salmonella Typhi* en un modelo murino de un adenocarcinoma mamario. El objetivo de este trabajo es evaluar la eficacia terapéutica de esta cepa de *Salmonella* para el tratamiento de un tumor de diferente origen histológico (timoma). Diseñamos un protocolo de inmunización combinando inoculaciones de la bacteria en forma intratumoral y en el tejido s.c próximo a los ganglios drenantes, en animales portadores de tumores s.c. Los resultados mostraron que el tratamiento con *Salmonella* fue capaz de reducir significativamente el volumen medio de los tumores del grupo experimental (0.2cm³) respecto del grupo tratado con PBS (0.6 cm³), $p < 0.01$, a los 5 d del inicio del tratamiento. La reducción en el volumen medio de los tumores se correlacionó con una disminución en el peso promedio de la masa tumoral: 0.3 g (tratado) vs 0.8 g (control), $p < 0.01$. Además, los animales tratados con la bacteria tuvieron un leve aumento en el tiempo medio de sobrevivencia respecto de los controles: 28 d vs 26 d, $p < 0.05$. Estos resultados demuestran el efecto beneficioso de la administración terapéutica de *Salmonella* al inducir una respuesta antitumoral en el huésped que fue eficiente para controlar el crecimiento de un tumor primario. Esta estrategia de inmunoterapia podría tener potencialidad para ser utilizada en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

474 (111) ESTUDIO DE EXTRACTOS DE PLANTAS REGIONALES: ACTIVIDAD CITOTÓXICA PER SE Y FOTOSENSIBILIZANTE EN LA TERAPIA FOTODINÁMICA DEL CÁNCER. Mamone L.¹; Casas A.²; Rodríguez L.³; Battlle A.⁴; Di Venosa G.⁵

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) - CONICET - Hospital de Clínicas J. de San Martín^{1 2 3 4 5} <leandro_mamone@hotmail.com>

Dentro de los antineoplásicos empleados existen productos naturales, sintéticos o semisintéticos. Aunque existen algunos productos naturales empleados para el tratamiento del cáncer, existe una inimaginable diversidad de metabolitos secundarios vegetales, de los cuales la mayoría no han sido estudiados. De hecho, se estima que sólo el 15% de las plantas han sido investigadas en busca de constituyentes farmacológicamente activos. A su vez, para el tratamiento de tumores superficiales o de acceso por vía endoscópica la luz puede ser empleada por medio de la Terapia Fotodinámica (TFD), combinándola con fotosensibilizantes. Algunos compuestos encontrados en las plantas han sido usados como fotosensibilizantes en la TFD. El objetivo de este trabajo es continuar la investigación de una colección de extractos de plantas autóctonas para buscar nuevos fotosensibilizantes de uso en el tratamiento del cáncer, y paralelamente evaluar las propiedades citotóxicas *per se* de estos extractos. Se estudiaron extractos metanólicos de 20 nuevas especies vegetales. Se encontró que los extractos de flor de las especies *Collaea argentina* y *Macfadyena unguis cati* presentaron propiedades fotoactivas. Luego de 24 h de exposición de la línea celular tumoral murina LM3 a 0,05 mg/ml de extracto metanólico crudo, se indujo un 50% de muerte celular, determinada por el ensayo de MTT, al aplicar las siguientes dosis lumínicas: 0,43 J/cm² para *Collaea argentina* y 0,53 J/cm² para *Macfadyena unguis cati*. Los extractos metanólicos crudos de 3 especies resultaron citotóxicos *per se*, induciendo en células LM3, un 50% de muerte luego de 24 de exposición a: 0,025 mg/ml de *Jacarandá mimosifolia flor*; 0,07 mg/ml de *Solanum verbascifolium flor* y 0,08 mg/ml de *Collaea argentina hoja*. La investigación de nuevos extractos está en constante desarrollo en nuestro grupo, esperando obtener así más resultados prometedores tanto para su uso como antineoplásico como para fotosensibilización en la TFD del cáncer.

475 (305) ROL DE AKAP350 EN EL MANTENIMIENTO DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS LEUCÉMICAS. Mattaloni S.¹; Calvo K.²; Ferretti A.³; García F.⁴; Larocca M.⁵

Instituto de fisiología experimental (IFISE-CONICET), Fac. Cs. Bioq. Farm., UNR¹; Instituto de Inmunología, Fac. Cs.

Médicas, UNR²; Instituto de fisiología experimental (IFISE-CONICET)³; Instituto de Inmunología, Fac. Cs. Médicas, UNR⁴; Instituto de fisiología experimental (IFISE-CONICET)⁵ <mattaloni@ifise-conicet.gov.ar>

Los centrosomas modulan la segregación de los centrosomas y la citoquinesis. En la mitosis cada célula hija recibe un centrosoma, que se duplica sincrónicamente con el ciclo celular. El inicio de la duplicación es gatillado por una quinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) reclutada a centrosomas por AKAP350 en la fase G1 tardía. Nucleofosmina (NPM) es una proteína blanco de CDK2, cuya variante NPMc+ es mutación primaria en el 30 % de las leucemias mieloides agudas (LMA). La fosforilación de NPM en su Thr199 por CDK2, induce su disociación de centrosomas, permitiendo la separación de los centriolos. En estudios previos, mostramos que la disminución en la expresión de AKAP350 en las células Oci (LMA, NPMc+) induce un aumento en la poliploidía. Nuestro objetivo fue analizar si AKAP350 interviene en la regulación de la duplicación centrosomal. Generamos células Oci y THP1 (LMA, NPMwt) con disminución en la expresión de AKAP350 (A350-) por RNA de interferencia. Estudiamos la morfología centrosomal en células controles (C) y A350- en imágenes obtenidas por microscopía confocal. Analizamos por inmunoblotting los niveles de expresión de NPM y fosforilación de NPM por CDK2, con anticuerpos que reconocen NPM y NPM(T199)P. Las células Oci A350- mostraron una disminución en la separación de los centrosomas: centrosomas separados: C:17±4%, A350-:6±3%*; centrosomas juntos C:11±3%, A350-:26±4%*. Las células THP1 A350- no mostraron cambios en la morfología centrosomal. En ambos tipos celulares, el "knock down" de AKAP350 indujo disminución en los niveles de NPM (Oci: C: 100%, A350- 68±6%*; THP1: C 100%, A350- 75±8%*) y de NPM(T199)P (Oci: C 100 %, A350- 49±8%*; THP1: C 100%, A350- 32±3%*). Este efecto no se observó en las células HepG2 A350-. Estas observaciones sugieren que AKAP350 tiene un rol importante en la regulación de la función de CDK2 y NPM en las células LMA, que se evidencia con alteraciones en la función centrosomal en las células LMA NPMc+. *p<0,05

476 (328) MACRÓFAGOS ACTIVADOS POR BACILO CALMETTE GUERIN (BCG) INDUCEN ACTIVACIÓN DE FIBROBLASTOS EN UN MODELO DE CANCER DE VEJIGA MURINO. Langle Y.¹; Lodillinsky C.²; Sandes E.³; Góngora A.⁴; Casabé A.⁵; Eiján A.⁶

Instituto de Oncología Angel H Roffo^{1 2 3}; IByME⁴; Instituto de Oncología Angel H Roffo^{5 6} <yanielangle@yahoo.com.ar>

BCG es el tratamiento estandar para prevenir recidivas y progresión del cáncer vejiga (CaV) superficial de alto grado histológico. Anteriormente observamos que BCG inhibe el crecimiento sc del tumor de vejiga MB49, generando depósito de fibras colágenas y que los macrófagos (MAC) peritoneales de ratones portadores de MB49 tratados con BCG aceleran la cicatrización en un ensayo de herida in vivo. OBJETIVO: Estudiar la actividad de MAC en respuesta a BCG y su rol sobre los fibroblastos (FB). Para ello se utilizó la línea de MAC RAW 264.7 tratados o no con BCG (1mg/ml) en cuanto a su capacidad de inducir a) Proliferación sobre los FB NIH-3T3 mediante recuento celular y MTS, b) Diferenciación a mio-fibroblastos mediante producción de colágeno I y Actina de Músculo Liso-alfa (alfa-SMA) por Western blot e Inmunofluorescencia, c) Determinación de bFGF, d) Determinación de TGF-beta en MC de RAW e in vivo en ensayo de reparación de heridas en presencia de MAC peritoneales provenientes de ratones portadores de tumor tratados o no con BCG por Inmunohistoquímica. RESULTADOS: El medio condicionado (MC) de RAW 264.7 tratados con BCG (1 mg/ml) induce la expresión de colágeno I 12hs post-tratamiento y la de alfa-SMA medida a 24 hs. Este MC también induce la proliferación de FB (En % del CRL, CRL: 100; BCG: 120) (p<0.01). BCG induce en RAW la expresión de bFGF medido por inmunofluorescencia. La secreción de TGF-beta de la línea RAW (medido por ELISA) se encontraba disminuida 24 hs post-tratamiento con BCG. El TGF-beta de encontró aumentado en las heridas de los

ratones tratados con los MAC de portadores de tumor tratados con BCG. Conclusión: Nuestros resultados sugieren que el mecanismo de acción de BCG implica la activación de MAC, que a su vez pueden inducir proliferación y diferenciación de FB. El bFGF y el TGF-beta podría ser uno de los responsables de esta activación. La remodelación del estroma inducida por MAC formaría parte del mecanismo antitumoral en respuesta a BCG.

477 (526) INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE PILOMATRICOMAS POR EL VIRUS POLIOMA MURINO Y DETECCIÓN DE ANTIGENOS VIRALES EN PREPARADOS HISTOLÓGICOS DE PILOMATRICOMAS HUMANOS. Sanjuan N.¹; Simula S.²; Casas J.³; Woscoff A.⁴

Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA^{1 2}; Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA³; Servicio de Dermatología, Hospital Naval Buenos Aires⁴ <nasanjuan@gmail.com>

Los virus Polioma (Py) son un prototipo de virus pequeños con DNA que inducen neoplasias en ratones. Recientemente se describió la asociación de un nuevo Py humano con el carcinoma de Merkel de la piel. Ya habíamos reportado que los tumores de foliculo piloso inducidos por Py en el ratón eran Pilomatricomas. Esas neoplasias también se observan en el humano. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los tumores del ratón y también detectar la presencia del antígeno VP-1 de Py en cortes histológicos de Pilomatricomas humanos, comparando ambos grupos. Los Pilomatricomas fueron inducidos por la cepa viral A2 en ratones C3H BiDa y se estudiaron por métodos histológicos, ultraestructurales (ME) inmunocitoquímicos (PAP) y virológicos. En paralelo se seleccionaron cortes histológicos de archivo de 10 Pilomatricomas humanos, que fueron tratados con PAP para detectar VP-1 de Py. Se usó como control interno suero normal de conejo aplicado en cortes adyacentes a los tratados con el suero de conejo anti-VP-1, y controles positivos y negativos ya conocidos. Las neoplasias murinas fueron similares a las de origen humano y consistieron en la proliferación de células matriciales que maduran hacia células "sombra" y concluyen en una masa amorfa que rellena la estructura quística de los tumores. En los tumores murinos se detectó VP-1 por PAP y Western blot y virus por ME y aislamiento. En 5/10 tumores humanos se observaron sectores aislados de células con marcación intranuclear positiva para VP-1, hecho no detectado en los cortes adyacentes tratados con suero preimmune. Se concluye que el ratón es un excelente modelo para estudiar la génesis de Pilomatricomas y que la presencia de VP-1 de Py en 5/10 Pilomatricomas humanos estudiados podría indicar una eventual asociación entre Py y este tipo de neoplasias.

478 (342) ESTUDIOS RADIOBIOLÓGICOS IN VITRO PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS DOSIMÉTRICO DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT). Rossini A.¹; Dagrosa M.²; Carpano M.³; Pozzi E.⁴; Torph S.⁵; Casal M.⁶; Juvenal G.⁷; Pisarev M.⁸

Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Centro Atómico Constituyentes^{1 2 3}; Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Reactor centro atómico ezeiza⁴; Comisión Nacional de Energía Atómica, Dosimetría, centro atómico ezeiza⁵; Instituto Oncológico A. Roffo⁶; Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Centro Atómico Constituyentes⁷; Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Centro Atómico Constituyentes; Facultad de Medicina, UBA⁸ <rossini@cnea.gov.ar>

Actualmente el melanoma puede tratarse quirúrgicamente, a través de vacunas o por radioterapia. Aunque, cuando el melanoma se encuentra en estadios avanzados, los tratamientos pasan a ser paliativos, por lo que un tratamiento alternativo y de mayor eficacia sería de suma importancia. Conjuntamente la CNEA y el Instituto Oncológico A. Roffo han aplicado la captura neutrónica en boro (BNCT) con este objeto, terapia basada en la reacción que ocurre al irradiar ¹⁰B bajo un flujo de neutrones térmicos, lo que dispara a su vez una fisión liberadora de radiación

de alto LET circunscripta al medio intracelular de las células tumorales. Sin embargo es frecuente ver que tumores con similar histopatología presenten diferente radiosensibilidad, por lo que uno de los objetivos fundamentales es el cálculo de la efectividad biológica relativa (RBE) del haz de neutrones y la efectividad biológica del compuesto transportador de ^{10}B (CBE) de diferentes líneas celulares de melanomas humanos como una primera aproximación a la optimización de la dosimetría de BNCT. Se utilizaron 3 líneas diferentes de melanomas humanos: M8, A375 y Mel-J. Los cultivos celulares fueron irradiados con neutrones en el reactor nuclear 3 (Ezeiza) y con rayos gamma en el Instituto A. Roffo. Se estudió la sobrevida a través de ensayos clono-génicos para el cálculo de los factores de efectividad biológica. Los datos para las 3 líneas celulares fueron calculados eligiendo dos end points diferentes: 30% y 7% de sobrevida celular.

RBE(s.f 0,3): M8: 1,39; A375: 1,58; Mel-J: 1,9
 RBE(s.f 0,07): M8: 1,35; A375: 1,53; Mel-J: 1,59
 CBE(s.f 0,3): M8: 2,6; A375: 2,75 Mel-J: 4,2
 CBE(s.f 0,07): M8: 2,3; A375: 2,37 Mel-J: 3,28

Estos son los primeros datos de RBEs y CBEs obtenidos para líneas de melanomas humanos, que se utilizarán para la optimización de los análisis de dosimetría en los tratamientos por Terapia de Captura Neutrónica en Boro (BNCT) de melanomas cutáneos de extremidades, en Argentina.

HEMATOLOGIA 2

479 (809) PROHEPCIDINA Y ERITROPOYETINA EN RIÑÓN DE RATAS BELGRADE. Veuthey T.¹; Wessling-resnick M.²; Roque M.³

Laboratorio de Fisiología Humana¹ ; Harvard School of Public Health, Boston. USA² ; Laboratorio de Fisiología Humana³ <tveuthey@uns.edu.ar>

El rol crítico del transportador de metales divalentes -DMT1- en la ruta del Fe fue evidente por la severa desregulación en la movilización de Fe inducida por la mutación del gen de DMT1, causando en ratas Belgrade anemia microcítica e hipocrómica con elevada Hepcidina hepática y abundante reservorios de Fe. Se propuso estudiar la expresión de Prohepcidina en riñón de ratas Belgrade y evaluar si la respuesta de Eritropoyetina (EPO) es apropiada o no a la anemia y su relación con Hepcidina. Se usaron Ratas Belgrade heterocigotas (b/+) y homocigotas (b/b). El tejido renal en Formol 10% se procesó para inmunohistoquímica: anti-Prohepcidina, anti-Epo. Epo sérica se evaluó por ELISA. Prohepcidina renal en ratas b/b y b/+ mostró expresión intracelular en segmentos corticales con morfología de Túbulo Distal y de Asa de Henle. En ratas b/+ la expresión intracelular de Prohepcidina fue notoria en médula interna, en segmentos con morfología de Túbulo Colector. En ratas b/b, Prohepcidina mostró débil expresión citoplasmática en médula interna, y se vio similar expresión citoplasmática en médula externa de ratas b/b y b/+. Se observó inmunomarcación de EPO en uniones inter-tubulares y/o espacios intersticiales de médula externa y en la unión cortico-medular, sin diferencias entre ratas b/b y b/+. La EPO-s fue muy elevada en ratas b/b y no se detectó ratas b/+. El principal hallazgo fue identificar síntesis de Prohepcidina en riñón de ratas Belgrade. Otro aporte novedoso surgiría de interpretar la débil inmunomarcación de Prohepcidina en médula renal interna de ratas b/b como un mecanismo regulatorio que facilitaría la captación de Fe para compensar la anemia. La coexistencia de altos niveles de EPO-s, junto con elevados niveles de Hepcidina hepática y de Fe, descrito por otros autores, en ratas b/b, evidenciaría la regulación independiente de ambas proteínas. Nuestra hipótesis avalaría que Hepcidina responde principalmente a la señal Fe, y la EPO principalmente a la señal anemia

480 (199) CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE UNA NUEVA DISFIBRINOGENEMIA. Arín A.¹; De Panis D.²; Sttinger K.³; Kordich L.⁴; Lauricella A.⁵

Laboratorio de Hemostasia y Trombosis - Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires^{1 2} ; Instituto de Medicina transfusional e Inmunohematología, Frankfurt, Alemania.³ ; Laboratorio de Hemostasia y Trombosis - Departamento de Química Biológica - Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires^{4 5} <lht@qb.fcen.uba.ar>

Paciente de 61 años, sin episodios de sangrado ni trombosis, con antecedentes familiares de trombosis, presentó el siguiente estudio prequirúrgico: APTT=60", TP=60", TT=28" (todas corrigen con plasma normal). Tiempo de Reptilase=Normal. Fibrinógeno (Fbg) funcional=50 mg/dl; Fbg inmunológico=230 mg/dl. Objetivos: Realizar estudio genotípico del fibrinógeno y caracterizar la fibrina resultante. Materiales y Métodos: Se evaluó: a) la secuencia completa que codifica para las tres cadenas del fibrinógeno. b) La cinética de fibrinoformación realizada con trombina (0,05 U/ml) y CaCl_2 (20 mM), registrando la densidad óptica ($\text{DO}_{405\text{ nm}}$) en función del tiempo. c) La lisis posterior fue activada con estrepto-quinasa (175 U/pocillo) registrando $\text{DO}_{405\text{ nm}}$ vs tiempo. d) La permeabilidad se determinó en un sistema de perfusión, midiendo gravimétricamente el flujo de solución fisiológica por unidad de tiempo. e) La estructura de la fibrina por microscopía electrónica y de campo oscuro. Control: Plasma Normal (PN_1 : Fbg= 345 mg/dl, PN_2 : Fbg= 230 mg/dl). Resultados: a) El análisis genético reveló una mutación en el exón 8 del Fbg con adenina en lugar de citosina, lo que se traduce con Glu en lugar de Asp en la posición 318 de la cadena α del Fbg, no descrita previamente. El Asp 318 participa en la susceptibilidad a la degradación por plasmina. b) La cinética de fibrinoformación mostró menor densidad óptica máxima que la del PN_1 : ($0,925 \pm 0,03$ vs $1,170 \pm 0,06$), aunque semejante a la del PN_2 ($0,895 \pm 0,05$). c) El tiempo de lisis medio (min) resultó prolongado respecto al PN ($\text{Pac } 360 \pm 15$; PN_1 290 ± 10 ; PN_2 320 ± 10). d) La fibrina resultó más permeable que la del PN_1 ($\text{Ks} \times 10^{-8} \text{ cm}^2$: $\text{Pac}=3,7 \pm 0,5$; $\text{PN}_1=2,2 \pm 0,2$). e) La estructura resultó levemente más abierta que la del PN_1 y más ramificada que la obtenida con PN_2 . Conclusiones: La mutación encontrada produce una fibrina más resistente a la lisis.

481 (541) CARACTERIZACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE FACTOR VON WILLEBRAND INTRAPLAQUETARIO. Etulain J.¹; Romaniuk A.²; Benzadón R.³; Schattner M.⁴

Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires^{1 2} ; Banco de sangre CEMIC³ ; Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires⁴ <juliaetulain@hotmail.com>

El factor vonWillebrand (FvW) se encuentra en células endoteliales, en el subendotelio y en los gránulos α de megacariocitos y plaquetas. A través de su unión a las Glicoproteínas Ib α y IIb/IIIa plaquetarias media la interacción plaqueta-subendotelio y plaqueta-plaqueta fundamentalen la hemostasia. Si bien la liberación del FvW endotelial ha muy sido estudiada, su secreción de las plaquetas es menos conocida. En este trabajo caracterizamos la liberación del FvW plaquetario. La estimulación de plaquetas lavadas (dadores sanos) con trombina o con los péptidos sintéticos TFLLR-NH2 y AYPGK-NH2 que activan los receptores de alta y baja afinidad de trombina PAR-1y PAR-4 respectivamente, produjo de manera concentración dependiente un aumento significativo del porcentaje de plaquetas positivas (citometría de flujo) para el FvW en su superficie. Resultados similares se obtuvieron en la liberación de FvW inducida por la estimulación con TFLLR-NH2 y AYPGK-NH2, alcanzando valores máximos de FvW de 259 ± 52 ng/ml para TFLLR-NH2 ($10\mu\text{M}$) y 320 ± 47 ng/ml para AYPGK-NH2 ($100\mu\text{M}$) ($n=3$). Sin embargo, la liberación de FvW mediada por trombina presentó un efecto dual que los niveles de FvW fueron mayores con respecto a las plaquetas en reposo utilizando bajas concentraciones disminuyendo hasta alcanzar los valores control con concentraciones

mayores (Tabla 1). Este efecto fue más marcado en condiciones de agitación sugiriendo que la pérdida de FvW frente a estímulos potentes podría estar asociada al secuestro del mismo en los agregados plaquetarios. Estos resultados plantean una liberación diferencial del FvW intraplaquetario por la trombina que podría ser relevante en las distintas etapas de la formación del trombo plaquetario.

Tabla 1. *P<0.05 vs. 0U/ml Trombina (n=3).

Trombina (U/ml)	FvW (ng/ml)
0	50 ± 22
0,005	58 ± 8
0,05	116 ± 10*
0,5	138 ± 31*
5	72 ± 18

482 (554) EFECTO DE LA HIPERTERMIA EN LA ACTIVACIÓN DE LA GPIIb/IIIa Y LIBERACIÓN DE MOLÉCULAS PROINFLAMATORIAS DE LOS GRÁNULOS ALFA PLAQUETARIOS. Etulain J.¹; Pozner R.²; Romaniuk A.³; Schattner M.⁴

Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires^{1 2 3 4} <juliaetulain@hotmail.com>

Las plaquetas además de ser elementos claves en la hemostasia y la trombosis también participan en procesos de inflamación y tumores debido a la expresión y liberación de citoquinas y moléculas proinflamatorias incluyendo P-selectina, factor von Willebrand (FvW) y factor 1 derivado de estroma (SDF-1) que se encuentran depositadas en los gránulos alfa. Uno de los signos que caracterizan a los procesos inflamatorios es el aumento de la temperatura. En este trabajo evaluamos el efecto de la hipotermia en la fisiología plaquetaria analizando respuestas hemostáticas (activación de la GPIIb/IIIa: unión de PAC-1 y de fibrinógeno por citometría de flujo) e inflamatorias (expresión de P-selectina: citometría) y liberación de FvW y de SDF-1 al medio extracelular (ELISA). Los ensayos fueron realizados en plaquetas lavadas (dadores sanos) estimuladas con trombina (0.06 U/ml) a temperatura ambiente (TA), 37°C y 40°C. La Tabla 1 muestra que la activación de la GPIIb/IIIa y la expresión de P-selectina fueron inhibidas por la hipotermia mientras que la liberación de FvW y SDF-1 no se vio afectada.

Tabla 1

	TA	37 °C	40 °C
% células positivas restando el basal *P<0.05 vs. TA (n=3)	70 ± 3	49 ± 8*	37 ± 6*
PAC-1			
Unión del Fibrinógeno	62 ± 8	45 ± 12	11 ± 10*
P-Selectina	59 ± 8	41 ± 15	26 ± 13*
ELISA_% liberación respecto al basal (n=6)			
FvW	268 ± 35	299 ± 59	201 ± 49
SDF-1	160 ± 23	183 ± 47	156 ± 34

Estos hallazgos indican que el aumento de temperatura regularía negativamente la capacidad hemostática de las plaquetas. Además sugieren que modularía selectivamente la liberación de sustancias proinflamatorias de los gránulos alfa afectando los mecanismos implicados en la fusión de los gránulos con la membrana plaquetaria y en consecuencia la expresión de P-selectina, sin alterar la liberación de su contenido.

483 (768) MODULACION DUAL DE HEPCIDINA POR HIERRO Y ANEMIA. Veuthey T.¹; Danna M.²; Giorgi G.³; Roque M.⁴

Laboratorio de Fisiología Humana^{1 2 3 4} <tveuthey@uns.edu.ar>

Hepcidina controla el Fe extracelular uniéndose al exportador Ferroportina, disminuyendo la captación de Fe intestinal y reteniéndolo en el Sistema Reticuloendotelial. La anemia inhibe la síntesis de hepcidina aumentando el Fe eritropoyético disponible. Se propuso estudiar la respuesta de hepcidina a un estímulo dual y antagónico como es el exceso de Fe y la demanda eritropoyética en la anemia, relacionándola con eritropoyetina (EPO). Modelo Acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia. Ratonas hembras CF1 (n=16/grupo) agrupados: 1) Sobrecarga de Fe+Anemia: Fe-Dextrán (días:0-10) + 60 mg/FHZ/Kg (días:20,22); 2) Sin Sobrecarga de Fe+Anemia: SF (días:0,10) + 60 mg/FHZ/Kg (días:20,22); 3) Sobrecarga de Fe: Fe-Dextrán (días:0,10) + SF (días:20,22); 4) Sin Sobrecarga de Fe: SF (días:0,10,20,22). Se determinó: Hb, Reti, Ferremia, Fe-hepático, Epo (ELISA). Valores significativos P<0.05. El hígado se procesó para inmunohistoquímica: anti-Prohepcidina; En Vision+System-HRP(DAB). El Fe tisular se valoró por Perls. En Sobrecarga de Fe: Fe plasmático y hepático aumentó (0-20 días). En Anemia con y sin Sobrecarga de Fe: Ferremia bajó, tardíamente en sobrecarga. En Anemia con y sin exceso de Fe el rango temporal de reducción de Hb fue similar (día 23-25). La recuperación de la Anemia sin Sobrecarga de Fe se evidenció por Hb y Reticulocitos. En Anemia con Sobrecarga la recuperación de la eritropoyesis fue tardía (día 30) respecto a la Anemia sin Sobrecarga de Fe (día 26-28). La Ferremia mostró un comportamiento similar. EPO aumentó en Anemia con y sin Sobrecarga. En Anemia con Sobrecarga de Fe, Prohepcidina citosólica mostró un sostenido aumento, con localización vascular. Concluimos que la recuperación tardía de la anemia en exceso de Fe, ocurriría por la limitada disponibilidad del Fe eritropoyético causada por aumento de Prohepcidina Fe-dependiente. Frente a señales antagónicas, Prohepcidina respondió al Fe, aumentando su expresión, y no a la demanda eritropoyética mediada por EPO.

484 (469) MODULACIÓN DEL MRNA DEL FACTOR DE VON WILLEBRAND POR ESTRÓGENOS EN MODELO MURINO.

Zapata V.¹; Kempfer A.²; Paiva-palomino J.³; Powazniak Y.⁴; Lazzari M.⁵; Sánchez-luceros A.⁶

Academia Nacional de Medicina¹; CONICET²; Academia Nacional de Medicina^{3 4}; CONICET^{5 6} <viazad@yahoo.es>

La función endotelial es dirigida a través de sus genes por factores de transcripción que modulan la respuesta de las células endoteliales (CE) a estímulos diversos. CE estimuladas por estrógenos podrían estar involucradas en la modulación del VWF en el embarazo. Tratamientos anteriores de nuestro grupo con estrógenos y progesterona en ratones BALB/c no mostraron aumento del VWF plasmático. Métodos: Se estudiaron hembras vírgenes BALB/c, de 8 semanas y 25-30 g, sometidas a: Estradiol (E2) 50, 150, 300 y 500 µg/d vía oral; E2 150 µg/día + fulvestrant (F, antiE2) 100 µg/día vía oral; E2 150 µg/día + F 50 µg/día; F 100 µg/d; F 50 µg/d; vehículo. A las 8hs se recolectó el plasma y muestras tisulares de hígado y pulmón. Se determinó el VWF: Ag (UI/dL, ELISA), y mRNA de VWF y ADAMTS13 por real time PCR (Cuantificación relativa, incremento de los mRNA VWF y ADAMTS13 respecto a γ -actina). Resultados: VWF: Ag: no hubo diferencias entre los grupos (media 96 ± 7,1). mRNA VWF en pulmón: E2 50 µg/d: 2.15; E2 150 µg/d: 3.8; E2 300 µg/d: 3.1; E2 500 µg/d: 1.67 (E2 vs. vehículo P= 0.005); E2 150 µg/día + F 50 µg/d: 1.46 (vs. vehículo p= 0.04); E2 150 µg/día + F 100 µg/d: 0.9 (vs. vehículo p= ns.); F 100 µg/d: 1.0 (vs. vehículo p= ns.); F 50 µg/d: 0.68 (vs. vehículo p= ns.); vehículo: 0.76; mRNA ADAMTS13: no amplificó en endotelio pulmonar. mRNA VWF y ADAMTS13 en hígado: no se encontraron diferencias en las muestras tratadas respecto al grupo control. Conclusión: En modelo murino, no se observan cambios en el VWF plasmático asociados al tratamiento con E2. La hormona ejercería una modulación positiva a nivel de transcripción del VWF, dosis-dependiente, expresada en mRNA VWF en endotelio pulmonar. A nivel del endotelio hepático, E2 parece no ejercer acción sobre la síntesis de los mRNA VWF y ADAMTS13.

NEFROLOGIA 2

- 485 (92) LA ANGIOTENSINA-(1-7) REDUCE LA PROTEINURIA Y DISMINUYE EL DAÑO ESTRUCTURAL EN TEJIDO RENAL DE RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA CON TENDENCIA A DESARROLLAR ACCIDENTE CEREBROVASCULAR (SHR/SP) SOMETIDA A DIETA HIPERSÓDICA.** Giani J.¹; Muñoz M.²; Burghi V.³; Turyn D.⁴; Toblli J.⁵; Dominici F.⁶

IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4}; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina⁵; IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁶ <jorgegiani@hotmail.com>

Introducción: La inflamación crónica favorece el desarrollo de proteinuria, fibrosis y disminuye los niveles glomerulares de nefrina, un proteína estructural de la barrera de ultrafiltración renal. Por otro lado, la angiotensina (Ang)-(1-7) disminuye la proteinuria en ratas SHR, aunque, los mecanismos moleculares detrás de estos efectos no se conocen. **Objetivo:** Evaluar, a nivel molecular, los efectos crónicos de la Ang-(1-7) en riñón de ratas SHR/SP sometidas a sobrecarga salina, modelo animal de hipertensión y nefropatía. **Métodos:** Se utilizaron ratas SHR/SP y sus respectivos controles Wistar-Kyoto (WKY) que recibieron una sobrecarga de NaCl (1,5% en el agua de bebida durante 2 meses). En los últimos 14 días, a la mitad de los animales de cada grupo se les administró 580 mg/kg/día de Ang-(1-7) por vía intraperitoneal [SHR/SP-Ang-(1-7)] y [WKY-Ang-(1-7)]. A la otra mitad se le administró solución salina [SHR/SP-salina] y [WKY-salina]. Al día 7 y 14 de tratamiento con Ang-(1-7), se realizaron determinaciones de proteinuria y de presión arterial sistólica (PAS). Al final del tratamiento, se evaluó el grado de fibrosis renal (tinción de Masson). Además, mediante inmunohistoquímica se determinaron los niveles de IL-6, TNF- α , NF κ B y nefrina en el glomérulo renal. **Resultados:** Al final del experimento, el grupo SHR/SP-salina presentó niveles de PAS y proteinuria mayores que el grupo WKY-salina ($p < 0,01$). La administración de Ang-(1-7) redujo ambos parámetros. Además, el grupo SHR/SP-salina mostró fibrosis glomerular, acompañada por una mayor cantidad de IL-6, TNF- α y NF κ B en la corteza renal ($p < 0,01$). El tratamiento con Ang-(1-7) revirtió estas alteraciones. Además, el grupo SHR/SP-salina mostró una disminución en el contenido glomerular de nefrina que se restauró luego del tratamiento con Ang-(1-7). **CONCLUSIONES** En conjunto, estos hallazgos sugieren que la Ang-(1-7) posee un efecto renoprotector en un modelo animal de hipertensión y nefropatía.

- 486 (127) EFECTOS DE UN INHIBIDOR DE LA SINTESIS DEL RECEPTOR GB3 DE LA TOXINA SHIGA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SINDROME UREMICO HEMOLITICO EN RATAS.** Silberstein C.¹; Lucero M.²; Zotta E.³; Repetto H.⁴; Ibarra C.⁵

Laboratorio de Fisiopatología, Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA^{1 2 3}; Servicio de Pediatría, Hospital Nacional "Prof. Alejandro Posadas", Provincia de Buenos Aires, Argentina⁴; Laboratorio de Fisiopatología, Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA⁵ <csilber@fmed.uba.ar>

Las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (Stx) pueden producir diarrea acuosa y sanguinolenta y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). La base patogénica del SUH está determinada por el daño que produce Stx cuando se une al receptor globotriaosil-ceramide (Gb3). Recientemente, hemos observado que el C-9, un inhibidor específico de la glucosilceramide sintasa, disminuye significativamente la expresión del Gb3 e impide los efectos citotóxicos de Stx2 en cultivos primarios de células epiteliales renales humanas. El objetivo del trabajo fue estudiar los efectos *in vivo* del C-9 en un modelo experimental de SUH

en ratas. Para ello se evaluó la sobrevida de los animales y los cambios histopatológicos en riñón, intestino delgado y colon. Ratas macho, Sprague-Dawley (4 semanas) fueron inyectadas por vía i.p. con un sobrenadante filtrado de cultivo de *E. coli* recombinante que expresa Stx2 (sStx2: 1ml/100g peso, 1×10^4 DC₅₀ en células Vero, LPS: 30ng/ml) o que no lo expresa (sCtrl). Otras ratas fueron tratadas por vía oral con C-9 (10-15 mg/100g peso/día) desde 48 hs previo a la inyección de sStx2 o sCtrl. Las ratas inoculadas con sStx2 murieron luego de 48-72 hs de la inyección. El tratamiento con C-9 desde 48 hs antes de la inyección con sStx2 produjo una sobrevida del 50% de los animales. El 50% restante murió entre las 72 y 120 hs del tratamiento con la toxina. Las ratas tratadas solamente con C-9 tuvieron una sobrevida similar a las ratas controles. Luego de 24 hs de la inyección con sStx2 se observó necrosis tubular y glomerular en el riñón, edema y necrosis en las vellosidades del intestino delgado y reducción de las células calciformes en colon. El tratamiento con C-9 disminuyó el daño renal y revirtió totalmente los efectos de la toxina en intestino delgado y colon. El uso de inhibidores de la síntesis del receptor Gb3 podría ser una nueva estrategia terapéutica para neutralizar los efectos de Stx2 y prevenir el desarrollo del SUH.

- 487 (188) LA DIETA HIPERSÓDICA INDUCE HIPOXIA Y ESTIMULA FIBROGENESIS RENAL EN RATAS NORMALES, ASOCIADA AL ESTRÉS OXIDATIVO.** Della Penna S.¹; Rosón M.²; Cao G.³; Gorzalczy S.⁴; Pandolfo M.⁵; Cerrudo C.⁶; Fernández B.⁷; Toblli J.⁸

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2}; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán³; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁴; Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁵; Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{6 7}; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán⁸ <silvanadellapenna@gmail.com>

La ingesta de una dieta hipersódica en ratas sal-sensibles incrementa la expresión de angiotensina II (Ang II) intrarrenal, responsable de hipoxia y estrés oxidativo. Nuestro objetivo fue estudiar si este mecanismo también ocurre en ratas normales. Para lo ello, se estudió la expresión de los marcadores de hipoxia HIF-1 α y profibrogenesis TGF- γ 1 y α -actina de músculo liso (α -SMA) en riñón de ratas alimentadas crónicamente con dieta hipersódica y su asociación con la expresión de angiotensina II (Ang II) renal y el estrés oxidativo. Se utilizaron 4 grupos (n=5) de ratas macho Sprague Dawley alimentadas durante 3 semanas con dieta normosódica (NS, NaCl 0,4%), hipersódica (HS, 8%NaCl), con y sin administración de tempol (T) en el agua de bebida (NS-T y HS-T respectivamente). Se midió presión arterial media (PAM), clearance de creatinina (CC), flujo urinario (VU) y excreción urinaria de sodio (VU_{Na}) y potasio (VU_K). Se evaluó por inmunohistoquímica la expresión de TGF- γ 1 y α -SMA, Ang II y HIF-1 α . En el grupo HS aumentó la PAM (mmHg, NS: 96 \pm 2; HS: 107 \pm 3; $p < 0,05$) y la VU_{Na} (μ mol.min⁻¹.kg⁻¹, NS: 0,4 \pm 0,1; HS: 3,5 \pm 0,6; $p < 0,05$) y se observó sobre-expresión de TGF- α , en el nefrón distal ($p < 0,001$) y de α -SMA en corteza y médula renal ($p < 0,001$). La inmunotinción de HIF-1 α se incrementó a lo largo de todos los túbulos renales ($p < 0,001$) pero la expresión de Ang II solo aumentó en túbulo proximal ($p < 0,001$). La administración de T previno estos cambios en los marcadores, normalizó la PAM (NS-T: 100 \pm 2; HS-T: 95 \pm 3; $p < 0,05$) y aumentó el CC (mL.min⁻¹, NS-T: 1.22 \pm 0,4; HS-T: 3,09 \pm 0,69, $p < 0,05$) y la VU_{Na} (NS-T: 0,4 \pm 0,2; HS-T: 13,0 \pm 1,5; $p < 0,05$). Los resultados muestran que una dieta hipersódica induce hipoxia renal y una respuesta profibrótica precoz en el riñón de ratas normales, asociada al estrés oxidativo, pero no relacionada con el aumento de la expresión de Ang II local y explican los efectos beneficiosos de la reducción de la ingesta de sal para la prevención del daño renal.

- 488 (504) ANÁLISIS IN SILICO DE LA PATOGENICIDAD DE SUSTITUCIONES EN EL GEN PKD2 DE LA POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSÓMICA DOMINANTE (ADPKD).** Azurmendi P.¹; Erlic Z.²; Fraga A.³; Arrizurieta E.⁴; Neumann H.⁵; Martin R.⁶

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA-CONICET¹; Medizinische Universitätsklinik, Freiburg University, Alemania²; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA-CONICET^{3, 4}; Medizinische Universitätsklinik, Freiburg University, Alemania⁵; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA-CONICET; Hospital Universitario Austral, Universidad Austral.⁶ <pazurmendi@lanari.fmed.uba.ar>

Numerosas variantes moleculares en los genes PKD1 y PKD2 han sido investigadas como candidatas a mutaciones para ADPKD. En PKD2, las sustituciones han sido clasificadas como polimorfismos (23%), patogénicas (4%), e indeterminadas (73%), respectivamente. Ante esta incertidumbre, resulta importante precisar la frecuencia de estos cambios en Argentina y usar otras herramientas que permitan predecir con mayor precisión su carácter patógeno. Trataremos de asignar un carácter patógeno a sustituciones codificantes en el gen PKD2 encontradas en nuestro laboratorio y en las bases de datos internacionales disponibles, analizando la conservación evolutiva y cambios en la estructura. Se utilizaron los programas de evaluación/predicción *Polyphen* (Polymorphism Phenotyping; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>), *SIFT* (Sorting Intolerant from Tolerant; <http://sift.jcvi.org/>) y *Align GVGD* (Grantham variant and distance calculation; <http://agvgd.iarc.fr/index.php>). Las variantes genéticas fueron consideradas como patogénicas ó benignas si dos de esos programas coincidían en el resultado. Estudiamos 43 familias ADPKD argentinas y 23 sustituciones descriptas en las bases de datos disponibles. De las 4 sustituciones (873+57C/T, 844-22G/A, 1034A/G y 2398A/C) encontradas en nuestra población, 2 se ubican en áreas codificantes (1034 A/G y 2398 A/C), que con el análisis *in silico* propuesto fueron caracterizadas como patogénica y benigna, respectivamente. En las 23 sustituciones ya descriptas, este algoritmo brindó un resultado concluyente en 21/23 (91%), con valor predictivo negativo 100% y valor predictivo positivo de 60%. La interpretación de variantes genéticas por programas que hacen un análisis estructural y evolutivo de alta capacidad y sensibilidad mejora las chances de adjudicar los resultados a una mutación o a una variante no patogénica.

- 489 (522) REGULACION DEL SISTEMA KALLIKREINA KININA (SKK) POR ALDOSTERONA EN RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS (SHR).** Corbera N.¹; Azurmendi P.²; Toro A.³; Martin R.⁴; Ibarra F.⁵; Oddo E.⁶; Arrizurieta E.⁷

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA¹; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA; CONICET²; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA³; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA; CONICET⁴; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA^{5, 6}; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA; CONICET⁷ <ilanari@pinos.com>

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que el SKK aumenta su actividad tras la gonadectomía (Gx) en hembras y machos SHR y que este proceso se acompaña de un incremento de la aldosterona observándose, además, diferencias de género. Con el objeto de dilucidar los mecanismos involucrados en los cambios mencionados se estudió en ratas SHR de distinto sexo el efecto que pudiera ejercer el tratamiento con espirolactona (E), inhibidor del receptor de aldosterona, sobre la síntesis (KLK), contenido renal (KR) y excreción de kallikreína urinaria (KU), marcadores del SKK. La excreción de KU (nkat/d/g R) en ratas SHR Gx macho y hembra disminuyó por efecto de la E a 23.36 ± 3.92 y 22.83 ± 2.43 (un 35.6 y un 44.7%) respecto de los animales Gx no tratados (36.29 ± 2.41 y 41.26 ± 6.5 , NS y $p < 0.001$, respectivamente). Por su parte el contenido

tisular renal (nkat/g R) no se modificó en las ratas Gx macho y hembra tratadas por E (18.34 ± 0.56 y 17.09 ± 3.27 a 18.96 ± 1.24 y 17.59 ± 2.02 , respectivamente). KLK, por su parte, descendió por el tratamiento con E en ratas Gx de 0.70 ± 0.02 y 0.73 ± 0.01 a 0.54 ± 0.02 ($p < 0.001$) y 0.68 ± 0.03 (NS) en machos y hembras, respectivamente. Estos datos muestran que la Aldosterona regula la excreción del SKK dado que la inhibición de su receptor impide la excreción de KU e inhibe su síntesis.

- 490 (641) EVIDENCIAS DE SÍNTESIS RENAL DE PREGNENOLONA.** Pagotto M.¹; Roldán M.²; Pagotto R.³; Rojic G.⁴; Monzón C.⁵; Molinas S.⁶; Trumper L.⁷; Pignataro O.⁸; Monasterolo L.⁹

IFISE-CONICET. Farmacología. Facultad de Cs. Bioq. y Farm. UNR.¹; Farmacología.²; IBYME-CONICET^{3, 4, 5}; IFISE-CONICET. Farmacología. Facultad de Cs. Bioq. y Farm. UNR.⁶; CIUNR. Farmacología⁷; IBYME-CONICET, FCEN-UBA⁸; CONICET. Farmacología⁹ <melina.pagotto@gmail.com>

Existen evidencias del rol de hormonas esteroideas en la susceptibilidad renal en distintas patologías. En riñón de rata se ha descrito la expresión de citocromo P450_{scc} en las primeras semanas de vida y de otras enzimas de vía esteroideogénica y metabolización de progesterona en tejido adulto. Sin embargo, aún no se ha probado la capacidad esteroideogénica renal a partir de la síntesis de pregnenolona (P5). El objetivo de este trabajo fue estudiar en riñón la expresión de proteínas involucradas en transporte de colesterol a membrana mitocondrial interna (MMI): proteína reguladora de esteroideogénesis aguda (StAR) y proteína translocadora de 18 kDa. (TSPO); expresión de P450_{scc} y capacidad biosintética de P5. En riñón de ratas Wistar macho adultas se evaluó i) expresión de ARNm de StAR y TSPO por RT-PCR ii) expresión por Western Blot de StAR en mitocondrias y de P450_{scc} en MMI. iii) Se incubaron mitocondrias de corteza y médula en presencia (22R-HO) o ausencia (C) de 22R-hidroxil-colesterol, derivado que atraviesa fácilmente membranas. Se evaluó por RIA síntesis de P5. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM de 4-5 observaciones, * $p < 0.05$. Se detectó expresión de ARNm de StAR y TSPO; la expresión de StAR en médula resultó 2.5 veces mayor que en corteza. StAR fue detectada en mitocondrias y confirmada mediante inmunofluorescencia en tejido. P450_{scc} se detectó en MMI. La síntesis de P5 (porcentaje de cambio de corteza de grupo C) fue significativamente mayor en 22R-HO que en C (Corteza, 22OH-R: 482.15 ± 71.73 , C: 99.91 ± 33.18 , Médula 22OH-R: 5204.2 ± 1599.3 , C: 140.0 ± 53.1). La síntesis de P5 en médula resultó 10 veces mayor que en corteza renal. La síntesis de P5 obtenida a partir de mitocondrias incubadas con 22R-OH es la primera evidencia de actividad del citocromo P450_{scc} a nivel renal. Los nefrosteroides generados localmente a partir de P5 podrían actuar en forma autócrina o parácrina modulando la función del órgano en condiciones normales o patológicas.

- 491 (791) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK EN LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NHE1 ASOCIADA APOPTOSIS EN OUU.** Bocanegra V.¹; Rinaldi Tosi M.²; Benardon M.³; Valles P.⁴

Area de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo; IMBECU^{1, 2}; Area de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo³; Area de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo; IMBECU⁴ <mvbocanegra@gmail.com>

La injuria mecánica resultante de la obstrucción ureteral unilateral (OUU) induce incremento de la presión intraluminal con consecuente dilatación de la luz tubular. NHE, es vital para la regulación del volumen celular y su actividad involucra la vía de las MAPKs. El RAS interviene en la progresión de la injuria renal por OUU. Objetivos: Evaluar la participación de NHE₁ y la rela-

ción existente con la vía de señalización que involucra a ERK en la regulación de la apoptosis en OUU neonatal y la modificación inducida por el tratamiento con Losartan. Materiales y métodos: Ratas de 48 hs de vida fueron sometidas a OUU u operación simulada y posteriormente sacrificadas a los 14 días. Se les administró como tratamiento inhibidor AT₁, Losartan, 10mg/kg/d (C+Los y O+Los) o vehículo (C+H₂O y O+H₂O). Se realizó TUNEL, western blot (AT₁, NHE₁, p-ERK, Bax, Bcl2, Procaspasa3, Caspasa3) y actividad de Caspasa 3. Resultados: Ausencia de expresión de AT₁ en fracción de membrana en los grupos C+Los y O+Los. En los grupos O+H₂O y O+Los se observó aumento del número de células apoptóticas en colectores corticales con respecto a los controles (p<0.001) e incremento del ratio Bax/Bcl2, disminución de Procaspasa 3 y aumento de la expresión y actividad de Caspasa3. Demostramos disminución de la abundancia de NHE₁ en corteza obstruida vs control (p<0.001) con persistencia de niveles descendidos de NHE₁ en O+Los (p<0.001). Incremento de la activación de p-ERK1/2 en O+H₂O y O+Los (p<0.01), sin modificaciones en la expresión de p-ERK total en los grupos controles fue observado. Conclusión: La disminución en la expresión de NHE₁ en los grupos sometidos a OUU sugiere su participación en la respuesta apoptótica por vía mitocondrial, con persistencia de esta respuesta luego de la administración de Losartan. El incremento en la activación de p-ERK podría relacionarse con la disminución en la expresión de NHE₁ en nefropatía obstructiva

NEUROCIENCIAS 3

- 492 (449) ESTRÉS, CALIDAD DE SUEÑO, SOMNOLENCIA DIURNA Y ALERTA EN CONDUCTORES DE COLECTIVO DE CORTA DISTANCIA.** Díez J.¹; Vigo D.²; Cardinali D.³; Perez Chada D.⁴

Universidad Austral, Departamento de Fisiología¹ ; UBA, CONICET² ; UBA, UCA, CONICET³ ; Hospital Austral⁴ <diezjoaquinjose@gmail.com>

El estrés conduce a patrones alterados de sueño, en desmedro de su calidad y cantidad, generando cansancio, somnolencia y disminución del alerta. En los conductores profesionales esto aumenta el riesgo de accidentes. Nuestro objetivo es explorar la asociación entre el estrés, la somnolencia diurna, la calidad de sueño y el alerta en conductores profesionales de colectivos. En 48 conductores profesionales varones (turno mañana [TM]: n= 18; turno tarde [TT]: n= 30) se evaluó durante 7 días mediante actimetría las horas de sueño, la calidad del mismo mediante la escala de Pittsburgh (PQSI), y la somnolencia (SD) mediante la escala de Epworth (ESS). El estrés se evaluó mediante la subescala de agotamiento emocional de Maslach (AE). Se midió la diferencia de reacción psicomotora entre el principio y el final de la jornada mediante un test vigilancia psicomotora (PVT). En cada turno la muestra fue dividida en dos grupos por la mediana de la subescala AE. Se evaluaron diferencias de las variables analizadas entre los distintos grupos (turnos y grado de estrés) mediante el test U de Mann - Whitney. Los valores son expresados como media ± error estándar. Los conductores del TM durmieron menos que los del turno TT (TM: 5.43 ± 1.13; TT: 6.41 ± 0.83 p = 0.005). Los conductores del TM que tuvieron mayor AE refirieron mayor SD (Mayor AE: 14.86 ± 0.96, Menor AE: 9.20 ± 1.10; p = 0.002), y un mayor entencimiento psicomotor (Mayor AE: 0.05 seg ± 0.01, Menor AE: 0.01 seg ± 0.01; p = 0.008). Los conductores del TT que tuvieron mayor AE mostraron peor calidad de sueño por la PQSI (Mayor AE: 6.25 ± 0.55, Menor AE: 4.55 ± 0.59; p = 0.026). Los conductores que trabajan en la mañana duermen una hora menos que los de la tarde. En ellos, el agotamiento emocional se asoció a mayor somnolencia y disminución del alerta.

- 493 (120) HIPOTERMIA PREVIENE ANGIOGÉNESIS EN LA RETINA INDUCIDA POR ASFIXIA PERINATAL SEVERA.** Rey Funes M.¹; Ibarra M.²; Martínez A.³; Dorfman V.⁴; Loidl C.⁵

Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof. Eduardo De Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2} ; Instituto Cajal, Madrid, España³ ; Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof. Eduardo De Robertis, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{4 5} <manuel.reyfunes@gmail.com>

La adrenomedulina (AM) es una hormona angiogénica que se expresa frente a hipoxia. Previamente hemos demostrado que la asfíxia perinatal induce angiogénesis en la retina interna. La hipotermia es efectiva para la protección del sistema nervioso ante la hipoxia. Nuestro objetivo fue evaluar la hipotermia como posible tratamiento para prevenir el desarrollo de neovascularización en la retina. Utilizamos ratas macho (n=5 por grupo) de 7, 15, 21, 30 y 60 días de edad que habían sido sometidas a asfíxia perinatal severa (20 min 37 °C AP) para evaluar la neovascularización de la retina estudiando la expresión de AM por inmunohistoquímica (IHQ) y Western-Blot (WB), y el número de vasos mediante histoquímica con lectina de tomate. La acción de la hipotermia se evaluó en animales sometidos a asfíxia en hipotermia (20 min 15°C HYP). Animales nacidos a término fueron utilizados como grupo control (CTL). El análisis por WB mostró aumento creciente en la expresión de AM a partir de los 21 días en CTL y de los 15 días en AP, con aumento significativo de 97±5% a los 21d y 165±11% a los 60d (p<0,01) en AP. En cada edad se observó aumento significativo de la expresión de AM en AP vs CTL (33±4% 21d, 35±6% 30d, 38±3% 60d, p<0,05). Por IHQ se observó inmunoreactividad positiva para AM en los procesos internos de las células de Müller y en la retina interna con aumento de la densidad óptica relativa en AP vs CTL (90±3% 21d, 97±2% 30d, 112±6% 60d, p<0,05). AM en retina HYP mostró un comportamiento similar al CTL, con un patrón de expresión similar en el tiempo. El estudio del número de vasos de la retina interna mostró aumento significativo en AP vs CTL con valores similares para todas las edades (AP:10,5±1,3 y CTL:4,6±1,1 por campo, p<0,01), mientras que HYP no varió respecto al CTL. De acuerdo a estos resultados concluimos que el tratamiento hipotérmico previene la angiogénesis en la retina inducida por asfíxia perinatal.

- 494 (582) PARTICIPACION DE LA AUTOFAGIA EN EL MECANISMO DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUEMICO EN LA RETINA DE RATA.** Bordone M.¹; De Zavalía N.²; Chianelli M.³; Rosenstein R.⁴

Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFyBO-CONICET.^{1 2 3 4} <melina_bordone@yahoo.com>

La isquemia retiniana es un componente central de diversas enfermedades que pueden producir ceguera. Aunque no se dispone de estrategias eficaces para el tratamiento de la isquemia retiniana, se ha demostrado la efectividad de la activación de un mecanismo endógeno de protección contra el daño isquémico a través del preconditionamiento isquémico (PCI), que consiste en un breve insulto isquémico inocuo *per se* y que se aplica en forma previa a una isquemia prolongada y deletérea. La autofagia es un proceso que involucra la autodegradación de material celular dañado, que ha sido asociada tanto a mecanismos de protección como de daño celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de la autofagia en la tolerancia isquémica inducida por PCI en la retina. La isquemia (Isq) se indujo por aumento de la presión intraocular a 120 mm Hg durante 40 min, y el PCI por la aplicación de una isquemia de 5 min, 24 h antes de la isquemia prolongada. A los 14 días de la isquemia se analizó la función (por electrorretinografía) y la histología retinianas. Se utilizaron 4 grupos experimentales: control, PCI, Isq y PCI + Isq. La isquemia disminuyó la amplitud de las ondas a y b del electrorretinograma (p< 0.01 vs. control) y provocó alteraciones histológicas, ambos efectos fueron revertidos por PCI (p< 0.01 vs. isquemia). A las 24 h de la Isq los niveles proteicos (determinados por *Western blot*) de un marcador de autofagia (beclina 1) aumentaron significativamente sólo en el grupo PCI + Isq, en tanto que los niveles de bax no difirieron entre los grupos Isq y PCI +

Isq, aunque fueron mayores que en los grupos control y PCI. La administración intravítrea de un inhibidor de autofagia (wortmanina) bloqueó la protección funcional e histológica del PCI ($p < 0.01$ vs. PCI + Isq + vehículo). Estos resultados sugieren la participación de la autofagia, pero no de la apoptosis, como parte de los mecanismos de protección frente al daño isquémico retiniano inducida por PCI.

495 (66) EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA METABOLIZACIÓN DE 2-ARAQUIDONOILGLICEROL Y ARAQUIDONOILETANOLAMIDA EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA. Gaveglio V.¹; Giusto N.²; Pasquaré S.³

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS-UNSONICET^{1 2 3} <vgaveglio@criba.edu.ar>

El 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la araquidonoiletanolamida (AEA), son moléculas lipofílicas que actúan como neuromoduladores. El 2-AG es degradado enzimáticamente por la monoacilglicérido lipasa (MAGL) y la AEA por la ácido graso amido hidrolasa (FAAH). Hemos caracterizado la actividad de MAGL y FAAH en sistema nervioso central (SNC) de ratas adultas (SAIC, 2007 y 2008). El objetivo del presente trabajo fue evaluar las actividades MAGL y FAAH en el envejecimiento fisiológico y el rol de agonistas colinérgicos en este proceso. Para ello se trabajó con sinaptosomas provenientes de corteza cerebral (CC) de ratas adultas (4 meses) y seniles (28 meses). Los sinaptosomas fueron obtenidos por centrifugación diferencial y purificados por gradiente de ficoll. Las actividades de MAGL y FAAH se ensayaron empleando como sustratos 2-araquidonoil[³H]glicerol y araquidonoil[³H]jetanolamina, respectivamente. La reacción enzimática se frenó con el agregado de cloroformo:metanol (1:1). Los productos [³H]glicerol y [³H]jetanolamina 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. El empleo de URB-602, inhibidor específico de MAGL, inhibió la actividad enzimática (24%). URB-597, inhibidor específico de FAAH, inhibió la actividad de esta enzima (75%) en sinaptosomas controles. En el envejecimiento se observó un estímulo del 100% y del 55% a nivel de MAGL, empleando como sustratos 2-AG y MAG, respectivamente. La actividad de FAAH se vio disminuida en un 54%. En presencia de carbamilcolina (0.6mM) la actividad MAGL disminuyó en sinaptosomas adultos y aumentó en seniles en un porcentaje similar (25%). Por otro lado la actividad de FAAH disminuyó en sinaptosomas adultos (51%) y seniles (70%). Los resultados muestran una regulación diferencial en la metabolización de 2-AG y AEA por el envejecimiento y por modulación colinérgica.

496 (27) DOMINANCIA HEMISFÉRICA Y EDAD EN SEGMENTOS RADIALES DEL LÓBULO PREFRONTAL. Merlo A.¹; Albanese E.²; Gómez E.³; Miño J.⁴; Mascitti T.⁵; Albanese A.⁶

Facultad de Medicina USAL^{1 2 3}; Facultad de Medicina USAL; Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA⁴; Facultad de Medicina UBA⁵; Facultad de Medicina USAL⁶ <amerlo@salvador.edu.ar>

Las longitudes de 7 segmentos radiales trazados en imágenes parasagittales de resonancia magnética del lóbulo prefrontal de sujetos femeninos entre el extremo anterior del cuerpo caloso y el borde del cerebro, formando entre sí ángulos de 30 grados, disminuyen significativamente con el avance de la edad. Las disminuciones más relevantes, estadísticamente significativas, se observan en el hemisferio derecho (Merlo et al. Medicina, 68 (supl.II): 138-9, 2008) Objetivo: determinar por rangos de edad, asimetría y lateralidad de dichos segmentos y la relación de dominancia (rD) (Merlo et al. Rev Chil Anat 19: 5-10, 2001) que con significación estadística, cuantifica la dominancia hemisférica de grupos de estructuras bilaterales, considerando los valores relativos de asimetría y lateralidad. Material y Método Para las longitudes de cada uno de los 7 segmentos radiales (S1 a S7 de dorsal a ventral) trazados en el lóbulo prefrontal de sujetos fe-

meninos (de 41-84 años, n=38) se determinó lateralidad y asimetría. Lateralidad = (valor derecho - valor izquierdo) x 100/ (valor derecho+valor izquierdo). Asimetría = valor absoluto de la lateralidad. Para cada grupo de segmentos por rango de edad entre 41-60 (n=18) y 61 a 84 (n=20) años, se calculó la relación de dominancia (rD) que es el valor del coeficiente de correlación de Spearman entre asimetría y lateralidad. Su signo es positivo si la lateralidad es derecha y negativo si es izquierda. Resultados: Para 41-60 y 61-84 años respectivamente los valores de rD son para S1: 0.54 ($p < 0.05$) y 0.33 ($p > 0.05$); S2: 0.78 ($p < 0.01$) y 0.28 ($p > 0.05$); S3: 0.54 ($p < 0.05$) y 0.24 ($p > 0.05$); S4: 0.63 ($p < 0.001$) y 0.60 ($p < 0.01$); S5: 0.68 ($p < 0.01$) y 0.24 ($p > 0.05$); S6: 0.79 ($p < 0.01$) y 0.47 ($p < 0.05$); S7: 0.64 ($p < 0.01$) y 0.02 ($p > 0.05$). Conclusiones: Las rD muestran lateralidad derecha en segmentos del lóbulo prefrontal, la que disminuye con el avance de la edad en 6 de los 7 segmentos, principalmente por disminución de los valores del hemisferio derecho.

497 (28) LATERALIDADES HEMISFÉRICAS Y EDAD EN SEGMENTOS DE UNA LÍNEA ANTEROPOSTERIOR DEL CEREBRO. Merlo A.¹; Albanese A.²; Miño J.³; Gómez E.⁴; Díaz O.⁵; Mascitti T.⁶; Albanese E.⁷

Facultad de Medicina USAL^{1 2}; Facultad de Medicina USAL; Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA³; Facultad de Medicina USAL^{4 5}; Facultad de Medicina UBA⁶; Facultad de Medicina USAL⁷ <amerlo@salvador.edu.ar>

En imágenes parasagittales de resonancia magnética (IPRM) de ambos hemisferios cerebrales se observó que con el avance de la edad la longitud de segmentos relacionados con el lóbulo frontal (LF) y con el cuerpo caloso (CC) disminuye, la relacionada con el ventrículo lateral (VL) incrementa y no varían significativamente las relacionadas con el lóbulo parietooccipital (LPO) y con el hemisferio (Merlo et al. Medicina: 68 (supl.II):146, 2008). Objetivo: Determinar la influencia de la edad en la asimetría y lateralidad hemisférica evaluadas estadísticamente mediante la relación de dominancia (Merlo et al. Rev Chil Anat 19: 5-10, 2001) de segmentos relacionados con LF, CC, VL y LPO. MATERIAL Y MÉTODO: Para los segmentos de 38 sujetos femeninos de 41 a 84 años, sin patología psiquiátrica ni neurológica, medidos en cada hemisferio (programa Scion Image for Windows) sobre la recta que pasa por los puntos más distantes del borde ventral del cuerpo caloso, se determinó a nivel del LF, CC, VL y LPO lateralidad y asimetría. Lateralidad = (valor derecho - valor izquierdo) x 100 / (valor derecho + valor izquierdo). Asimetría = valor absoluto de la lateralidad. Para cada grupo de segmentos se calculó, por rango de edad (41-60 y 61-84 años), la relación de dominancia (rD) que corresponde al valor del coeficiente de correlación de Spearman, con su significación estadística, entre asimetría y lateralidad cuantificando la dominancia hemisférica de grupos de estructuras bilaterales. Resultados: La rD en el grupo de 41-60 y 61-84 años es de 0.63 ($p < 0.001$) y 0.60 ($p < 0.01$) para LF, de 0.22 ($p > 0.05$) y -0.12 ($p > 0.05$) para CC, de -0.82 ($p < 0.01$) y 0.24 ($p > 0.05$) para VL y de -0.13 ($p > 0.05$) y -0.43 ($p < 0.05$) para LPO. Conclusión: La variación de la dominancia de los segmentos difiere según la estructura. Con el envejecimiento la dominancia derecha persiste en el LF, la dominancia izquierda se anula en el VL y se acentúa en el LPO. El CC no presenta dominancia significativa.

498 (731) USO DE LA MELATONINA COMO ANTIINFLAMATORIO EN CIRUGÍA DE CATARATAS EN PERROS. Sande P.¹; Rosenstein R.²; Saenz D.³

Laboratorio de neuroquímica retiniana y oftalmología experimental, bioquímica humana, facultad de medicina, cefybo, conicet^{1 2 3} <p_sande@yahoo.com>

La catarata es una de las principales causas de ceguera en perros. Si bien el tratamiento consiste en la extracción quirúrgica de la catarata, el éxito terapéutico depende en gran parte de la inflamación post-quirúrgica. Los antiinflamatorios de uso corriente (corticoides o AINEs), son efectivos pero presentan considera-

bles efectos colaterales. Previamente hemos demostrado que la melatonina (Mel) es un potente antiinflamatorio ocular sin efectos adversos. El objetivo de este trabajo fue analizar el uso de la Mel como antiinflamatorio en la cirugía de cataratas en perros. Previo consentimiento de los dueños, los perros se dividieron en 4 grupos que recibieron distintos tratamientos (a partir de 3 días antes de la cirugía): A: no diabéticos tratados con dexametasona (1 gota c/6 h), B: no diabéticos tratados con Mel (3 mg/12 h), C: diabéticos con carprofeno (1 mg/kg c/12 h) y D: diabéticos con Mel (3 mg/12 h). La cirugía se realizó por facoemulsificación. A los 2, 7 y 20 días post-cirugía se evaluó el score clínico (blefarospasmo, Tyndall, miosis, congestión de los vasos episclerales, alteraciones de la córnea y presión intraocular (PIO)) y a los 120 días, se evaluaron las secuelas (edema de córnea, sinequias y opacificación de la cápsula posterior del cristalino). El análisis estadístico se realizó mediante los tests de Mann-Whitney y Tukey. Entre los animales no diabéticos, el tratamiento con Mel no difirió del tratamiento con dexametasona a los 2 y 7 días post-cirugía, en tanto que a los 20 días la inflamación fue menor en el grupo tratado con Mel ($p < 0.05$). En el grupo de animales diabéticos, la inflamación post-quirúrgica fue menor en el grupo tratado con Mel que en el tratado con carprofeno a todos los intervalos examinados ($p < 0.01$). El porcentaje de secuelas fue: A, 33%; B, 11%; C, 44% y D, 11%. La PIO no difirió entre los grupos estudiados. Estos resultados avalan el uso de Mel como tratamiento antiinflamatorio para la cirugía de cataratas en perros.

ONCOLOGIA 7

- 499 (242) ROL DE FIBROBLASTOS ASOCIADOS A TUMOR (CAF) INOCULADOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE TUMORES MAMARIOS MURINOS.** Sahores A.¹; Fabris V.²; Vanzulli S.³; Lanari C.⁴; Lamb C.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2}; *Academia Nacional de Medicina*³; *Instituto de Biología y Medicina Experimental*^{4 5} <anuchisahores@hotmail.com>

Trabajamos con tumores mamarios murinos que transcurren por distintos estadios de hormono-dependencia. Algunos de estos tumores son hormono-dependientes (HD) porque necesitan de la administración exógena de un progestágeno para crecer. Otros se denominan hormono-independientes (HI) ya que crecen en ausencia de la hormona. En estudios previos demostramos que el co-cultivo de CAF provenientes de tumores HI (CAF-HI) induce un aumento en la proliferación de células epiteliales (EPI) respecto de CAF-HD. *In vivo*, los CAF-HI inoculados aumentan el crecimiento tumoral de EPI-HI y no de EPI-HD. Hipotetizamos que los CAF-HI le confieren a las EPI-HD las señales para que crezcan en ausencia de hormona. Los objetivos son: estudiar la presencia de los CAF-HI inoculados a distintos tiempos post-inóculo; investigar cómo contribuyen los CAF inoculados a la formación tumoral evaluando a tiempos cortos el número de polimorfonucleares, de mastocitos y la angiogénesis. Utilizamos ratones BALB/c-wt (wt) y BALB/c-GFP (GFP) que expresan la proteína verde en todas sus células. Inoculamos ratones GFP o wt con EPI-HI solas o junto con CAF-HI-wt (en ratones GFP) ó CAF-HI-GFP (en ratones wt). Extirpamos los tumores a distintos tiempos y analizamos los datos por microscopía confocal. A los 13 días no se detectaron CAF-HI-GFP inoculados en los ratones wt. Para investigar el mayor crecimiento de EPI+CAF-HI respecto de EPI-HI, cuantificamos el número de polimorfonucleares (hematoxilina y eosina) y de mastocitos (azul de toluidina): no observamos diferencias significativas entre los grupos. Inoculamos ratones wt en el intradérmico y a los 5 días observamos un aumento significativo en el número de vasos en los tumores EPI+CAF-HI (Control 1.1 ± 0.1 ; CAF-HI 1.8 ± 0.8 ; EPI-HI 2.0 ± 0.7 ; EPI+CAF-HI 3.3 ± 0.5 $p < 0.05$). Concluimos que los CAF inoculados no perduran en el tumor consolidado aunque participan en los primeros estadios de formación del tumor favoreciendo la angiogénesis.

- 501 (339) CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) IN VIVO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE METÁSTASIS HEPÁTICA: OPTIMIZACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO EN TUMOR Y CONTROL DE LA RADIOTOXICIDAD EN TEJIDO NORMAL.** Pozzi E.¹; Cardoso J.²; Colombo L.³; Thorp S.⁴; Molinari A.⁵; Garabalino M.⁶; Heber E.⁷; Monti Hughes A.⁸; Miller M.⁹; Itoiz M.¹⁰; Aromando R.¹¹; Nigg D.¹²; Quintana J.¹³; Trivillin V.¹⁴; Schwint A.¹⁵

*Departamento de Radiobiología, CNEA*¹; *Instituto AH Roffo, Argentina*^{2 3}; *Departamento de Instrumentación y Control, CNEA, Argentina*⁴; *Departamento de Radiobiología, CNEA, Argentina*^{5 6 7 8}; *Departamento de Instrumentación y Control, CNEA, Argentina*⁹; *Departamento de Radiobiología, CNEA; Cátedra de Anatomía Patológica, FOUBA, Argentina*¹⁰; *Cátedra de Anatomía Patológica, FOUBA, Argentina*¹¹; *Idaho National Lab., EE.UU.*¹²; *Departamento de Reactores de Investigación y Producción, CNEA, Argentina*¹³; *Departamento de Radiobiología, CNEA, Argentina*^{14 15} <trivilli@cnea.gov.ar>

BNCT es una terapia binaria basada en la acumulación selectiva de compuestos borados en tumor y la irradiación con neutrones, generando partículas de corto alcance con alta eficacia biológica relativa que dañan selectivamente el tumor. Las metástasis hepáticas de cáncer de colon, múltiples, bilobares, irreseccables, y resistentes a quimioterapia no tienen tratamiento alternativo eficaz. Se propuso BNCT como potencial terapia para esta patología empleando una técnica propuesta por el Dr. Jorge E. Cardoso. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia terapéutica de BNCT en tumor y su potencial efecto radiotóxico en tejido sano en un modelo de metástasis hepática basado en la inoculación de células de cáncer de colon (DHD-K12-TRb) en el hígado de ratas BDIX. Se realizaron estudios de BNCT *in vivo* en el Reactor Nuclear RA-3. Grupo BNCT (n=13): administración del compuesto borado borofenilalanina (BPA) 900 mg/kg seguido de irradiación a las 3 h; Grupo Solo Haz (n=6): irradiación solamente y Grupo Control (n=4): no tratado. La dosis física total administrada con BNCT fue de 12.2 ± 1.8 Gy a tumor y de 8.8 ± 0.7 Gy a hígado normal. Los cálculos dosimétricos se basaron en estudios previos de biodistribución de BPA. Se evaluó la superficie tumoral pre-irradiación y 14 días post-irradiación, tiempo al cual se sacrificaron los animales para el análisis histológico de tumor e hígado sano. La relación de superficie tumoral Post/Pre-tratamiento fue de 0.7 ± 0.5 para BNCT; 3.1 ± 1.1 para Solo Haz y 2.2 ± 0.6 para Control. La diferencia entre el grupo BNCT y los restantes fue estadísticamente significativa (ANOVA, $p = 0.0001$). No se observaron efectos radiotóxicos en hígado normal. A nivel histológico se observó un aumento cualitativo de zonas de fibrosis y necrosis en tejido tumoral tratado con BNCT vs. Solo Haz y Control. BNCT induce una remisión parcial de nódulos hepáticos. La total ausencia de efectos radiotóxicos en hígado sano permitiría escalar la dosis a tumor.

- 502 (325) HO-1, UN MEDIADOR EN LA RESORCIÓN ÓSEA.** Ferrando M.¹; De Siervi A.²; Meiss R.³; Navone N.⁴; Vazquez E.⁵

Departamento de Química Biológica, FCEN - UBA, Buenos Aires, Argentina^{1 2}; *Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina*³; *MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA*⁴; *Departamento de Química Biológica, FCEN - UBA, Buenos Aires, Argentina*⁵ <mercedesf@qb.fcen.uba.ar>

La metástasis del cáncer de próstata (PCa) se caracteriza por su preferencia al hueso, donde favorece una reacción osteoblástica. El hueso está en constante remodelación y los principales tipos celulares responsables de este proceso son los osteoblastos y los osteoclastos, los cuales regulan su diferenciación y función. La cascada de señalización de Wnt/ β -catenina, induce la formación de hueso y Dickkopf-1 (DKK1) es un potente

inhibidor de dicha vía. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que hemo oxigenasa 1 (HO-1) cumple un rol regulatorio en la progresión del PCa. Con el objetivo de estudiar la función HO-1 en la metástasis al hueso del PCa, se realizaron co-cultivos de PMO (cultivos primarios de osteoblastos obtenidos de calvarias de ratones recién nacidos) con células PC3 (línea de cáncer de próstata, osteolítica) o con células de la línea transfectada establemente con HO-1 (PC3HO-1) o su control (PC3βGal). Este sistema experimental permite que ambos tipos celulares compartan sólo factores solubles. Cuando las células PC3 control fueron co-cultivadas con PMO, se observó una disminución (51%, $P < 0,05$) en el número de las células tumorales, efecto que fue revertido cuando los co-cultivos se realizaron con las células PC3HO-1. Mediante un ensayo de incorporación de timidina, comprobamos el mismo efecto en los PMO, los cuales disminuían su proliferación al ser co-cultivados con PC3 (42%, $P < 0,05$) y sin sufrir modificaciones cuando las células tumorales fueron pre-tratadas con hemina (inductor de expresión y actividad de HO-1). Además, se detectó un significativo aumento (310%, $P < 0,05$) en la expresión de DKK1 cuando las PC3 fueron pre-tratadas con hemina y co-cultivadas con PMO. Estos resultados sugieren un rol de HO-1 en la metástasis al hueso del cáncer de próstata, donde podría participar de la resorción ósea.

503 (418) ESTIMULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE STAT5, AKT Y ERK POR PARTE DE PROLACTINA Y UN AGONISTA ALFA2-ADRENÉRGICO EN LÍNEAS TUMORALES MAMARIAS HUMANAS. Castillo L.¹; Bruzzone A.²; Perez Piniero C.³; Sarappa M.⁴; Luthy I.⁵

IBYME^{1 2 3 4 5} <castillo@dna.uba.ar>

La prolactina participa en la progresión tumoral mamaria aumentando la proliferación celular y la evasión de la apoptosis. El loop paracrina/autocrino de la prolactina y la sobreexpresión de su receptor en células tumorales intensifica dichos efectos. Demostramos anteriormente que los agonistas alfa2-adrenérgicos, como Dexmedetomidina (Dex) aumentan la proliferación de células tumorales. Estas respuestas biológicas involucran diferentes caminos de señalización que se ven alterados en células tumorales. Estudiamos la fosforilación de STAT5, AKT y ERK bajo estimulación lactogénica con Prolactina ovina (oPRL 4nM), alfa2-adrenérgica con Dex 2µM y la combinación de ambas en diferentes líneas celulares de cáncer de mama humano in vitro (T47D, MCF-7 e IBH-6). Se realizaron Westerns Blots para las proteínas fosforiladas y totales. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA seguido del test de Dunnett. En las tres líneas, la incubación durante 10 min con oPRL aumentó significativamente la fosforilación de STAT5, AKT y ERK, en presencia y ausencia de Dex. Como ejemplo, en la línea T47D la oPRL aumentó 2.1±0.4** veces la fosforilación de STAT5, 3.8±0.5* veces de AKT y 2.5±0.3* veces de ERK. En el tratamiento combinado se obtuvo un aumento del 1.8±0.2* para STAT5, 6±1.3** para AKT y 3.2±0.3** veces para ERK (significación con respecto al control *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$). En el control con Dex hubo un aumento del mismo orden en la fosforilación para las tres proteínas. Un efecto similar fue observado para MCF-7 e IBH-6. Concluimos que tanto oPRL como Dex inducen fosforilación de STAT5, AKT y ERK, sugiriendo que estas vías de señalización están involucradas en la acción biológica lactogénica y alfa2-adrenérgica. A las concentraciones estudiadas, no hay efecto aditivo ni sinérgico.

504 (453) EFECTO DEL ANTIPROGESTÁGENO RU486 EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS CRECIENDO EN CEREBRO. Rojas P.¹; De La Fuente V.²; Bolado J.³; Vanzulli S.⁴; Lanari C.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental^{1 2 3}; Academia Nacional de Medicina⁴; Instituto de Biología y Medicina Experimental⁵ <rojas@dna.uba.ar>

El cáncer de mama humano metastatiza principalmente en hueso y cerebro. Hemos desarrollado un modelo murino de cáncer de mama en el cual carcinomas ductales que expresan altos

niveles de receptores de estrógeno y progesterona (RP), así como sus metástasis ganglionares y pulmonares regresionan con antiprogéstágenos. Teniendo en cuenta que el cerebro es un sitio de privilegio inmunológico y de difícil acceso de drogas sistémicas, nos interesó establecer un modelo de crecimiento tumoral en cerebro y evaluar la respuesta al tratamiento, en este caso al RU-486. Se trasplantaron tumores C4-HI mediante trocar con un equipo estereotáctico bajo anestesia en los cerebros de los ratones (n=10 c/grupo). Pellets de 5mg de RU-486 se implantaron subcutáneamente (sc) el mismo día (RU-0) o 10 días después (RU-10). Ratones no tratados se utilizaron como controles. A los 20 días los ratones se perfundieron bajo anestesia. Sólo los ratones del grupo control presentaron tumores visibles macroscópicamente. Los tumores C4-HI que crecieron en el cerebro mostraron menor grado de diferenciación que cuando crecen en el sc. No se observaron tumores en los ratones RU-0, mientras que en los RU-10 se observó escasa neoplasia residual formada por conductos colapsados y células tumorales aisladas dentro de abundante estroma fibroso, mostrando también un patrón de regresión diferente ya que en el sc regresiona aumentando la diferenciación celular. Se observó un aumento del número de células apoptóticas y de expresión de caspasa 9 activada evaluada por inmunohistoquímica, y una disminución en el índice mitótico y de expresión de Ki67, comparado con el grupo control ($p < 0,001$). En conclusión, demostramos a) que la morfología del tumor y el patrón de regresión depende del órgano de implantación, b) el RU-486 sería un buen agente terapéutico aun cuando los tumores crecen en cerebro y c) este modelo podría ser una herramienta útil para evaluar opciones terapéuticas en metástasis cerebrales.

505 (484) ESTUDIO DE PLOIDIA Y MORFOMETRIA NUCLEAR DE CELULAS DE LEYDIG EN UN MODELO DE TUMORES TESTICULARES DE CELULAS SOMATICAS EN RATONES TRANSGENICOS. Quintana S.¹; Venara M.²; Vázquez-levin M.³; Rey R.⁴; Di Clemente N.⁵; Picard J.⁶; Chemes H.⁷

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)^{1 2}; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET-UBA)³; Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)⁴; Endocrinologie et Génétique de la Reproduction et du Développement (INSERM) Clamart France^{5 6}; Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE-CONICET)⁷ <squintana@cedie.org.ar>

Hemos comunicado previamente el desarrollo de hiperplasias y tumores de células de Leydig (CL) a lo largo de la vida de ratones transgénicos en los que la expresión del oncogén SV40 T es dirigida por el promotor de la hormona antimülleriana. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la morfología nuclear y estudiar la ploidía (cantidad de ADN nuclear) de CL durante las hiperplasias tempranas y desarrollo tumoral posterior. Se estudiaron 4 testículos de ratones transgénicos y 1 testículo control a cada una de las siguientes edades: 7, 10, 21 y 29 días y 2, 5, 9 y 19 meses. Se realizó la reacción de Feulgen (reacción estequiométrica con el contenido de ADN nuclear) y se midió la densidad óptica de cada núcleo, el área nuclear (µm²) y el factor de circularidad (4.δ. Área/Perímetro²) empleando el programa NIS Elements (Version 3.0). Se evaluaron al menos 50 núcleos de CL de hiperplasias o tumores, utilizándose como control a las CL normales. Se determinó que las CL hiperplásicas son diploides hasta los 21 días, edad a partir de la cual se vuelven hipodiploides, disminuyen su área nuclear (27,74 ± 1,29 vs. 20,57 ± 1,36, $p < 0,01$) y poseen núcleos más irregulares (menor factor de circularidad) que sus contrapartes normales (0,96 ± 0,01 vs. 0,91 ± 0,02, $p < 0,01$). Las CL tumorales (en ratones mayores de 5 meses) también presentaron núcleos hipodiploides, de menor área (22,36 ± 0,33 vs. 17,03 ± 0,92, $p < 0,01$) y contorno irregular (0,93 ± 0,01 vs. 0,90 ± 0,02, $p < 0,05$). Estas modificaciones en ploidía, área y regularidad nuclear sugieren una inestabilidad genómica con pérdida de material cromosómico posiblemente determinante del cambio evolutivo en las hiperplasias de Leydig a partir de los 21 días, con una aceleración de su capacidad proliferativa y su futura transformación tumoral. Dado que existen tumores de Leydig

humanos hipodiploides, el presente modelo podría ser de utilidad para el estudio de los mecanismos involucrados en esta patología.

REPRODUCCION 3

506 (807) VELOCIDAD DE FORMACIÓN Y EXPRESIÓN DE OCT-4 DE BLASTOCISTOS BOVINOS PRODUCIDOS POR ICSI TRANSGÉNICA ASISTIDA POR DIFERENTES MÉTODOS DE ACTIVACIÓN. Bevacqua R.¹; Pereyra-bonnet F.²; Fernandez-martin R.³; Salamone D.⁴

Laboratorio de Biotecnología Animal, Facultad de Agronomía, UBA^{1 2 3 4} <romibevacqua@yahoo.com.ar>

La ICSI es una técnica de reproducción asistida ampliamente usada en humanos. Sin embargo, en el bovino no se emplea por desencadenar una deficiente activación del ovocito. En este trabajo, se realizó ICSI en bovinos, asistiéndola con distintos métodos de activación y utilizando espermatozoides marcados con un transgen. Nuestro objetivo fue caracterizar los blastocistos bovinos transgénicos obtenidos comparándolos con blastocistos de fertilización in vitro (FIV). Ovocitos madurados in vitro en medio TCM-199 fueron inyectados con espermatozoides descongelados co-incubados con plásmido pCX-EGFP. Los ovocitos inyectados fueron activados con 5µM Ionomicina (Io) por 4min y luego de 3h, tratados con: 2mM DMAP por 3h (Io-DMAP); Io seguido por DMAP (2Io-DMAP); Io solo (2Io); 7% Etanol por 5min (Io-EtOH) o 20mM SrCl₂ por 5h tras el primer Io (Io-SrCl₂). La FIV se realizó siguiendo el protocolo de Brackett y Olliphant, 1975. Se evaluó el día de formación de los blastocistos. El número de células y la expresión de Oct-4 se determinaron por inmunocitoquímica y microscopía confocal. Tabla 1 Calidad de blastocistos ICSI y FIV bovinos de acuerdo a su día de formación, número de células y expresión de Oct-4.

Grupo	Formación día 7	Formación > día 7	N	N° células (media±DS)	Oct-4* (media±DS)	Oct-4* / n° células (media±DS)
Io-DMAP	13/15 (86.7) ^a	2/15 (13.3) ^a	3	68.33±12.0	56.3±10.0	0.8±0.1
2Io-DMAP	16/20 (80.0) ^{ab}	4/20 (20) ^{ab}	4	91.5±30.7	71.7±26.0	0.7±0.0
2Io	3/8 (37.5) ^b	5/8 (62.5) ^b	2	70.0±22.6	38±1.4	0.5±0.1
Io-EtOH	8/13 (61.6) ^{ab}	5/13 (38.4) ^{ab}	4	69.2±25.4	50.2±15.5	0.7±0.1
Io-SrCl ₂	8/11 (72.7) ^{ab}	3/11 (27.3) ^{ab}	4	69.2±14.9	52.5±16.0	0.7±0.1
FIV	6/6 (100) ^a	0/6 (0) ^a	4	104.8±54.4	75±32.5	0.7±0.1

^{ab}Diferente subíndice en la misma columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). Nuestros resultados muestran que la ICSI asistida por distintas activaciones no altera los parámetros de calidad ensayados, excepto para el grupo 2Io, que mostró un retraso en la formación de los blastocistos.

507 (186) PARTICIPACIÓN DE LA ANANDAMIDA (AEA) EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA NITRÉRGICO EN PLACENTA NORMAL Y PREECLÁMPTICA. Cella M.¹; Damiano A.²; Leguizamón G.³; Franchi A.⁴; Farina M.⁵

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos¹; Cátedra de Biología Celular- Facultad de Farmacia y Bioquímica²; Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos^{3 4 5} <mikicella@yahoo.com>

El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas responsables de modular el flujo sanguíneo feto placentario e inhibir la agregación plaquetaria. Alteraciones en su vía metabólica podrían producir las anomalías vasculares observadas en la preeclampsia. El sistema de endocannabinoides y sus receptores (CB) se han descrito en la placenta. La anandamida (AEA), uno de los principales endocannabinoides, es sintetizada por diversos caminos y degradada por acción de una amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Recientemente se ha demostrado que la AEA modula la síntesis de NO en diversos tejidos. Así nuestro objetivo fue evaluar la participación de la AEA en la regulación del sistema nitrérgico en placenta normal (PN) y preecláptica (PE). Evaluamos la actividad de la NO sintasa (NOS) en PN (cesáreas electivas) y PE, por la técnica de Bredt & Snyder. Observamos

que la placenta PE presenta una mayor actividad de la NOS ($p < 0.05$). Detectamos la expresión del receptor CB1 en PN y PE por IHQ y WB y observamos una disminución en la actividad ($p < 0.05$) y la expresión proteica de la FAAH en placentas PE, sugiriendo mayores niveles de AEA en este tejido. Para investigar si la AEA endógena modula la actividad de la NOS, evaluamos el efecto de un inhibidor de la FAAH (URB-597). Observamos que URB (10-9M) estimuló ($p < 0.001$) la actividad de la NOS en PN. Adicionalmente, encontramos que la incubación de PN con AEA (10-8, 10-7M) incrementó la síntesis de NO ($p < 0.001$), y este efecto fue revertido por la co-incubación con un antagonista del receptor CB1 (AM251, 10-6M). En PE, AM251 disminuyó la síntesis de NO ($p < 0.05$). Los resultados obtenidos demuestran que la AEA es capaz de regular la actividad de la NOS en placenta humana vía el receptor CB1 y que los niveles aumentados de AEA en PE, debido a la marcada disminución en la actividad y expresión de la proteína FAAH, podrían relacionarse con el incremento en la síntesis de NO observado en esta patología.

508 (560) PARTICIPACIÓN DEL ÁCIDO LISOFOSFÁTICO EN LA IMPLANTACIÓN EN LA RATA. Sordelli M.¹; Farina M.²; Cella M.³; Franchi A.⁴; Ribeiro M.⁵

CEFYO (CONICET - Fac. de Medicina, UBA)^{1 2 3 4 5} <micaelasordelli@yahoo.com.ar>

En los últimos años ha surgido un nuevo concepto, el de la participación de moléculas lipídicas en el establecimiento de la preñez. Los ratones knock out para el receptor LPA3, uno de los receptores del ácido lisofosfatídico (LPA), presentan severas deficiencias en el proceso de implantación. El LPA modula la producción de prostaglandinas (PGs) en el útero de bovinos, cerdos y ovinos. Las PGs y la anandamida se han descrito como importantes mediadores de la invasión embrionaria. Las PGE2 y PGI2 promueven la vascularización y decidualización en el útero de roedores. Niveles elevados de anandamida correlacionan con fallas en la implantación y fenómenos de apoptosis en el blastocito. Por lo tanto, nuestro objetivo fue estudiar el efecto del LPA sobre mediadores que participan en la implantación en la rata. Para ello, el útero proveniente de hembras Wistar en día 5 de gestación fue incubado con LPA (10, 20 y 50 µM) por 3, 6 y 12 horas. Bajo las condiciones de nuestro bioterio la implantación ocurre en el día 5 de gestación por la noche. Se determinó la producción de PGE2 por RIA y la expresión de los ARNm y las proteínas por RT-PCR y western blot. Observamos que la expresión del ARNm y de la proteína del LPA3 está modulada en el útero de rata durante la gestación temprana. La incubación con LPA 50 µM por 6 horas aumentó la expresión de la FAAH ($p < 0.05$), la enzima que degrada la anandamida. Además, el tratamiento con LPA incrementó la expresión de la COX-2 ($p < 0.05$) y la producción de PGE2 (2,1±0,1 vs 2,7±0,2 pgPGE2/mg ph, $p < 0.05$). Por último, el LPA indujo la expresión de IGFBP-1, un marcador de decidualización. Estos resultados sugieren que el LPA sería un potente mediador lipídico que favorece la implantación del embrión.

509 (468) LA ACCIÓN DE VEGFA COMO FACTOR DE SUPERVIVENCIA EN FOLÍCULOS OVÁRICOS DE RATA SE ENCUENTRA MEDIADO POR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN PI3K/AKT/BAD Y ERK1/2. Irusta G.¹; Abramovich D.²; Parborell F.³; Tesone M.⁴

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET^{1 2} <girusta@dna.uba.ar>

En los últimos años, se ha demostrado que VEGFA es un factor de supervivencia en diferentes tipos celulares siendo citoprotector en neuronas, disminuyendo la apoptosis y estimulando la neurogénesis. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la inhibición in vivo de VEGF con un bloqueador de su acción, (TRAP), disminuye la proliferación de las células foliculares y disminuye su apoptosis, llevando a un mayor número de folículos a la atresia. Además, en este modelo observamos que el efecto de supervivencia de VEGFA está mediado por las vías de señalización PI3K/AKT. El objetivo de este trabajo fue estudiar qué

camino intracelulares se encuentran activados luego de la estimulación *in vitro* con VEGFA de folículos antrales en cultivo. Se aislaron folículos antrales por microdissección provenientes de ovarios de ratas prepúberes tratadas con DES (dietilstilbestrol) durante tres días. Los folículos (60) 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 blots de Akt, Bad, Erk1/2 y sus formas fosforiladas. VEGFA 100 ng/ml aumentó significativamente la fosforilación de Akt comparado a las otras condiciones de incubación ($p < 0.001$). No se detectaron cambios en presencia de FSH o VEGFA 50 ng/ml (Basal: $0,44 \pm 0,06$; FSH: $0,35 \pm 0,08$; VEGF 50: $0,44 \pm 0,08$; VEGF 100: $1,51 \pm 0,39$). Además, VEGFA 50 ng/ml indujo la fosforilación de Bad (Basal: $1,36 \pm 0,18$; VEGF 50: $3,37 \pm 0,71$; $p < 0,05$). En presencia de FSH o VEGF 50 ng/ml, los niveles de fosfo-Erk aumentaron significativamente comparado a las condiciones basales de incubación (Basal: $0,25 \pm 0,005$; FSH: $0,53 \pm 0,06$; VEGFA 50: $0,54 \pm 0,05$; $p < 0,05$). Este efecto fue más evidente en presencia de VEGFA 100 ng/ml (VEGFA 100: $0,61 \pm 0,07$; $p < 0,01$). Estos resultados demuestran que VEGFA actuaría como factor de supervivencia en folículos antrales ováricos de rata activando las vías de señalización de PI3K/AKT y ERK1/2.

510 (773) LA EXPOSICIÓN PRENATAL/NEONATAL A BISFENOL A AUMENTA LA INCIDENCIA DE LESIONES UTERINAS EN RATAS ADULTAS. Bosquiazzo V.¹; Ramos J.²; Kass L.³; Muñoz-de-toro M.⁴; Luque E.⁵

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral^{1 2 3 4 5}
 <lvbosqui@fbc.unl.edu.ar>

La perturbación hormonal durante el desarrollo fetal o neonatal predispone a enfermedades y/o disfunciones en la vida adulta. Nuestro objetivo fue estudiar si la exposición prenatal y neonatal a los xenoestrógenos bisfenol A (BPA) y dietilstilbestrol (DES) favorece el desarrollo de lesiones uterinas en ratas adultas. Ratas preñadas (Wistar) fueron expuestas a través del agua de bebida a 0.001% de etanol (control), BPA (50 µg/Kg/día o 0.5 µg/kg/día) y DES (5 µg/kg/día) desde el día 9 de gestación hasta el destete. Las crías se mantuvieron hasta los 12 meses, se sacrificaron en estro y se diseccionaron los cuernos uterinos. La histopatología uterina se caracterizó mediante tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de citoqueratinas (CK) 8 y 14, p63 y MCM-2 (Minichromosome Maintenance Protein-2). La exposición a xenoestrógenos produjo un aumento en la incidencia de lesiones uterinas (20% grupo control vs 100% grupos DES y BPA50, $p < 0.05$). Dichas lesiones consistieron en glándulas quísticas, hipertróficas, con atipias nucleares (núcleos hipocrómicos) e hiperplásicas (3 o más capas celulares). Estas estructuras presentaron baja actividad proliferativa (evaluada por la expresión de MCM-2) y al igual que las glándulas normales fueron inmunoreactivas para la CK luminal (CK8). Las hiperplasias glandulares expresaron marcadores de células basales (CK14 y p63) de manera anormal en más de un estrato celular. En paralelo, otras zonas exhibieron una reducción en la altura del epitelio endometrial sugiriendo atrofia celular (0% controles vs 80% BPA50, $p < 0.05$) aunque la expresión de los marcadores evaluados no difirió respecto al epitelio normal. Estos resultados muestran que la exposición temprana a BPA produce un aumento en la incidencia de lesiones glandulares y epiteliales endometriales durante la adultez. La expresión anómala de marcadores de diferenciación en estas lesiones podría indicar un mal pronóstico en su evolución favoreciendo el desarrollo de tumores.

511 (509) ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN PROTEICA DE COMPONENTES DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA EN OVARIOS DE OVINOS TRATADOS PRENATALMENTE CON ANDRÓGENOS AROMATIZABLES Y NO AROMATIZABLES. Ortega H.¹; Rey F.²; Velazquez M.³; Padmanabhan V.⁴

Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional del Litoral^{1 2 3}; Department of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology - University of Michigan⁴
 <hhortega@fcv.unl.edu.ar>

El tratamiento prenatal con andrógenos ocasiona en ovinos insulino-resistencia e hiperinsulinemia compensatoria, potenciando la esteroideogénesis ovárica y las alteraciones foliculares. Utilizando un modelo experimental de administración prenatal de propionato de testosterona (T) y dihidrotestosterona (DHT; andrógeno no aromatizable) en hembras ovinas, se propuso como hipótesis que el exceso de andrógenos prenatales altera la expresión proteica de componentes de la cascada de señalización de la insulina. Se inyectaron hembras ovinas Suffolk preñadas, con 100 mg (IM, dos veces por semana) de T o DHT, desde el día 30 al 90 de la gestación. Se estudió mediante inmunohistoquímica la expresión de: receptor de insulina β; IRS-1, PI3K, mTOR, PPARγ y adiponectina en fetos (días 90 y 140), animales pospuberales (10 meses) y adultos (21 meses). El patrón observado indicó que su expresión no es sólo regulada de una manera célula-específica, sino además temporalmente coordinada de acuerdo con el desarrollo folicular. Más específicamente, nuestros resultados sugieren que existe una expresión constitutiva de las proteínas estudiadas en la pared folicular y el estroma, y que algunas de ellas (IRβ, IRS-1, PPARγ y Adiponectina) incrementan su expresión conforme avanza el desarrollo folicular. Sumado a esto, la exposición prenatal a T y DHT indujo un aumento selectivo en la expresión de PPARα en animales prenatales. En los animales de 10 y 21 meses tratados con T se observó una disminución en la expresión de adiponectina. Nuestros resultados nos permiten concluir que la exposición prenatal a andrógenos aromatizables y no aromatizables altera de manera diferencial la expresión de algunos componentes de la cascada de señalización de la insulina. Si consideramos el rol de la adiponectina en la regulación de la síntesis de andrógenos, esto podría llevar a un microambiente folicular con dominancia de andrógenos, hecho que culmina en la persistencia folicular.

511 b (510) POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL CALCIO EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ANANDAMIDA EN LA LIBERACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL EPITELIO OVIDUCTAL. M G Gervasi 1, C Osycka-Salut 1, C Lladós 2, M Villalón 2, S Perez-Martinez 1

¹Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos ²Pontificia Universidad Católica de Chile
 <maria.gracia.gervasi@gmail.com>

Previamente demostramos que tanto la anandamida (AEA) como su análogo estable (Met-AEA) promueven la liberación de los espermatozoides (ESP) de las células epiteliales del oviducto (CEO) mediante la activación de los receptores de cannabinoides CB1 y TRPV1. Asimismo demostramos que Met-AEA induce la capacitación espermática, siendo esta la posible causa de su liberación de las CEO. Dado que el aumento del calcio intracelular está asociado a la capacitación, estudiamos si la AEA induce este incremento en ESP bovinos en co-cultivo con CEO y si el calcio es necesario para la liberación de los ESP de las CEO. Se determinaron los niveles de calcio en ESP (cargados con FURA2-AM) en co-cultivo con CEO luego de la adición de agonistas cannabinoides. La medición se realizó mediante la adquisición de imágenes fluorescentes (F=340/380nm) seriadas. Los cambios en la fluorescencia, asociados a cambios en los niveles de calcio intracelular, se expresaron como área bajo la curva (ABC). La proporción de ESP que aumentó los niveles de calcio fue similar entre el control y los tratamientos (~30%). Sin embargo, en los ESP tratados con agonistas cannabinoides el ABC fue mayor al control (Control: $1,73 \pm 0,24$; AEA: $3,76 \pm 0,86$; Capsaicina: $5,5 \pm 0,58$; $p < 0,05$). Además se determinó el porcentaje de liberación de ESP unidos a las CEO en ausencia de calcio. Para ello, los ESP fueron pre-incubados con BAPTA-AM y luego colocados en co-cultivo. Se adicionaron agonistas cannabinoides y se contó el nº de ESP unidos a las CEO. Como control se repitió el experimento

con ESP sin BAPTA-AM. El tratamiento con BAPTA-AM bloqueó el efecto dado por los agonistas cannabinoides ya que el porcentaje de ESP unidos a las CEO fue similar al control. (Control: 84,1±5,1%; AEA: 98,7±12,5%; Capsaicina: 98,7±4%). Los resultados indican que AEA produce un incremento de calcio intracelular en una sub-población de ESP unidos a las CEO siendo el calcio necesario para la liberación de los ESP del reservorio oviductal.

CARDIOVASCULAR 3

512 (43) POLIMORFISMOS DEL ESR1 Y DISFUNCIÓN VASCULAR: ESTUDIO EN MUJERES FÉRTILES Y POSTMENOPÁUSICAS. Rauschemberger M.¹; Polini N.²; Benozzi S.³; Alvarez C.⁴; Martinez D.⁵; Maegli M.⁶; Massheimer V.⁷

Dto. BByF, UNS-CONICET¹ ; Dto. BByF, UNS^{2 3 4} ; Servicio de Ginecología-Hospital Municipal de Bahía Blanca^{5 6} ; Dto. BByF, UNS-CONICET⁷ <mbrasch@criba.edu.ar>

Los estrógenos actúan en diferentes tejidos a través de dos tipos de receptores: ESR1 y ESR2. Los polimorfismos del ESR1 se han asociado a riesgo de enfermedades como cáncer de mama, osteoporosis y cardiovasculares. Nuestro objetivo fue evaluar la relación entre los polimorfismos Pvull y Xbal del ESR1 y parámetros bioquímicos indicadores de disfunción vascular, en mujeres sanas fértiles (F) y postmenopáusicas (PM). Los genotipos detectados por PCR-RFLP fueron: Pvull: 1(C/T),2(T/T),3(C/C); Xbal: A(A/G),B(A/A),C(G/G). Se analizaron los siguientes parámetros bioquímicos: colesterol total (CT), CT-HDL, CT-LDL, triglicéridos (TG), tiempo de protrombina (TP), tiempo de trombolastina parcial activado (APTT), tiempo de trombina (TT), Fibrinógeno (Fbg) y PCR ultrasensible (PCR-u). Se observó que los genotipos 1 y A son más frecuentes que los 2,3 y B,C, semejante a lo descrito para otros países. El análisis total de la población muestra que, las PM exhiben aumentos significativos en CT, C-LDL, TG, Fbg y PCR-u (11;30;36;5;245%, p<0.02) respecto a F. El análisis entre PM y F en función del genotipo muestra que, PM(A) mantiene los cambios antes mencionados y exhibe un aumento adicional en C-HDL respecto de F(A) (0.58±0.12 vs 0.49±0.07 g/L, PM vs F, p<0.01). Las PM(1) vs F(1) presentan aumentos significativamente más moderados en TG y PCR-u (28;218%, p<0.02) en comparación a los observados en PM. Las PM(1A) muestran el perfil más favorable, con 18% de aumento en C-HDL (p<0.01) y sin aumento en TG. Se analizó también el perfil bioquímico de riesgo de F en función del genotipo. Las variantes B,C muestran una disminución en CT; C-LDL; TG; Fbg y PCRu (15;25; 74;6;87%, p<0.05) respecto a F(A), sugiriendo que F(B,C) presentan un perfil más favorable en lípidos, hemostasia y marcadores de inflamación vascular. Si bien preliminares, estos resultados sugerirían una potencial utilidad clínica del análisis de los polimorfismos del ESR1 como predictores de riesgo de enfermedad vascular.

513 (165) EN INDIVIDUOS HIPERTENSOS LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD NA⁺,K⁺-ATPASA ESTA RELACIONADA CON UN AUMENTO EN LA ESTABILIDAD DE MACROESTRUCTURAS DE TUBULINA. POSIBLE PAPEL DE LAS MAPS. Amaiden M.¹; Fernandez A.²; Monesterolo N.³; Campetelli A.⁴; Casale C.⁵; Santander V.⁶

Universidad Nacional de Río Cuarto¹ ; Universidad Nacional de Río Cuarto-Hospital Regional Río Cuarto² ; Universidad Nacional de Río Cuarto^{3 4 5 6} <ramaiden@exa.unrc.edu.ar>

En eritrocitos de pacientes hipertensos la actividad Na⁺,K⁺-ATPasa esta inhibida. En nuestro grupo se determinó que la tubulina acetilada forma un complejo con la Na⁺,K⁺-ATPasa e inhibe la actividad de la enzima en diferentes células. La tubulina en la célula puede polimerizarse formando macroestructuras que son estabilizadas por la unión de proteínas de alto peso molecular (MAPs). Hipótesis: Los pacientes hipertensos presentan ma-

croestructuras de tubulina (MET) más estables que las de individuos normotensos, esto modifica la formación del complejo tubulina acetilada/Na⁺,K⁺-ATPasa y como consecuencia la actividad de la enzima. La mayor estabilidad de las MET es conferida por una proporción alterada de las diferentes MAPs. Resultados: 1- a partir de sangre humana de individuos hipertensos y normotensos se obtuvieron diferentes fracciones en donde se determinaron las distintas isoformas de tubulina y la actividad Na⁺,K⁺-ATPasa. Los individuos hipertensos poseen una disminución de tubulina en la fracción MET y un aumento a nivel de membrana, mientras que no se observaron diferencias en el contenido de tubulina total y libre entre ambos grupos. 2- las MET tratadas con nocodazol para analizar la sensibilidad a la depolimerización, mostraron ser estructuras más resistentes en hipertensos. A nivel de membrana se encontró en hipertensos un aumento en la cantidad de complejo y de las isoformas acetilada y detirosinada, indicadores de estabilidad microtubular. 3- la polimerización de microtúbulos fue medida in vitro a partir de cerebro de rata, siendo más rápida y extensa en ratas SHR que en los controles Wistar y el contenido de MAP1B total y unida a tubulina fue menor. Conclusión: En hipertensos se forman mayor cantidad de MET altamente resistentes, posiblemente debido a una cantidad de MAPs alterada, siendo por esto mejor sustrato para la acetilación y detirosinación. Estas propiedades de las MET facilitan su migración a la membrana y la inhibición de la ATPasa.

514 (255) EFECTO DE LOS HIDROLIZADOS DE AMARANTO SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR. Fritz M.¹; Vecchi B.²; Condes M.³; Añón M.⁴; Rinaldi G.⁵

CIDCA (Facultad de Ciencias Exactas-UNLP); CIC (Facultad de Ciencias Médicas-UNLP)¹ ; CIDCA (Facultad de Ciencias Exactas-UNLP)^{2 3 4} ; CIC (Facultad de Ciencias Médicas-UNLP)⁵ <marianafritz@hotmail.com>

Se estudiaron hidrolizados proteicos de amaranto (HPA, hidrólisis con alcalasa) con los siguientes objetivos: 1- Evaluar la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) por los HPA "in vitro". 2- Evaluar el efecto de los HPA (administración intragástrica) sobre la presión arterial media (PAM) en ratas SHR conscientes. 3- De encontrar un efecto hipotensor de los HPA, definir si se debe a vasodilatación periférica o a disminución del volumen minuto (VM). Los resultados "in-vitro" mostraron que los HPA con un grado de hidrólisis de 45 y 65% inhibieron a la ECA en un 80%. En SHR los HPA descendieron significativamente la PAM desde 148 ± 4 a 115 ± 4,5 mmHg con una concentración de 1g/Kg y desde 147 ± 5 a 91 ± 6 mmHg para una concentración de 1,5 g/Kg (ANOVA de una vía, p < 0,05). En anillos de aorta (AA) aislados, los HPA produjeron disminución de la respuesta máxima a la noradrenalina (0,01 mM) desde 3,0 ± 0,2 g hasta 1,7 ± 0,2 g, así como aumento significativo de la EC₅₀ desde 39,4 ± 3,6 nM hasta 322 ± 37,4 nM (test de t por apareadas, p < 0,05). En músculos papilares (MP) de SHR los HPA depresieron no significativamente la contracción y la (dF/dt). En ratas SHR anestesiadas los HPA (1,5g/Kg) produjeron un discreto pero significativo aumento del VM de un 7% con respecto al valor basal de 98 ± 3 ml/minuto. Concluimos que: 1- los HPA inhibieron la ECA "in vitro". 2- la administración intragástrica directa de HPA disminuyó la PAM en ratas SHR, debido presumiblemente a sus efectos inhibidores sobre la ECA, los cuales pueden llevarse a cabo sobre el sistema renina-angiotensina circulante y también local como lo demuestran los experimentos "in vitro". 3- el intenso efecto vasodilatador de los HPA sobre AA unido al efecto discreto o nulo sobre MP y VM demuestra que el efecto hipotensor "in vivo" se debería a la acción sobre la resistencia periférica y no sobre el VM.

515 (270) ALTERACIONES MIOCÁRDICAS EN EL MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE FABRY: EFECTO DEL TRATAMIENTO DE REEMPLAZO ENZIMÁTICO. Rozenfen P.¹; Serradell M.²; Rinaldi G.³

LISIN (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP)^{1 2} ; CIC (Facultad de Ciencias Médicas, UNLP)³ <paurozen@biol.unlp.edu.ar>

La Enfermedad de Fabry es una patología genética causada por la deficiencia de la enzima alfa-galactosidasa A que produce la acumulación progresiva de globotriaosilceramida (Gb3) en distintos tejidos, incluido el cardíaco. La afección cardíaca es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con Enfermedad de Fabry. Los pacientes sufren hipertrofia ventricular izquierda, alteraciones de la conducción y de las válvulas. El objetivo de nuestro trabajo fue analizar las propiedades pasivas y la actividad contráctil miocárdica de ratones Fabry (RF) (knockout para el gen de alfa-galactosidasa A) en comparación con los de cepa salvaje (RWT), y el efecto del tratamiento de reemplazo enzimático. Se utilizaron 30 RF y 10 RWT de 25 semanas de edad. Los RF se dividieron en 3 grupos: un grupo sin tratamiento (RF), otro grupo recibió tratamiento de reemplazo enzimático con agalsidasa alfa 0,2 mg/kg cada 2 semanas (Replagal, Shire HGT) (RFE), y el 3er grupo recibió placebo cada 2 semanas (RFP). Se midió la presión del ventrículo izquierdo en mmHg (PVI) a distintos volúmenes en corazones detenidos en diástole (KCl 15%) para analizar su distensibilidad, y en corazones activos se midió PVI calculando la contractilidad mediante el dP/dt (mmHg/seg). Los corazones de RF mostraron mayor distensibilidad que los de RWT (PVI a volumen de 20 μ l: RWT 69 ± 6 , RF 35 ± 3). Esta diferencia fue corregida en los RFE (PVI a volumen de 20 μ l: 59 ± 2), pero no en los RFP (28 ± 2). La contractilidad fue menor en el grupo RF que en RWT (dP/dt max: RF 2832 ± 85 , RWT 3179 ± 119). El tratamiento con enzima logró mejorar los parámetros de contracción activa (dP/dt max RFE: 2832 ± 85), pero no así el placebo (dP/dt max RFP: 2809 ± 361). Concluimos que el tratamiento de reemplazo enzimático con agalsidasa alfa corrige la distensibilidad y la contractilidad que se encuentran alteradas en los ratones Fabry. Esto permite anticipar un uso potencialmente beneficioso en la enfermedad humana.

516 (419) EFECTO DE DIFERENTES DIETAS HIPERLIPÉMICAS SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y LA FLUIDEZ SANGUÍNEA. Dominighini A.¹; Urli L.²; Monti J.³; González J.⁴; Crosetti D.⁵; Ronco M.⁶; Carnovale C.⁷; Luquita A.⁸

Cát. Biofísica, Fac. Cs. Médicas-UNR¹; Cát. Fisiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR²; Cát. Biofísica, Fac. Cs. Médicas-UNR³; Cát. Fisiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR⁴; CONICET⁵; Cát. Biofísica, Fac. Cs. Médicas-CIURN-UNR⁶; <adominighini@arnet.com.ar>

Estudios previos demostraron que dietas hiperlipémicas incrementan la viscosidad sanguínea (VS) por el incremento de la viscosidad plasmática (VP), sin establecer una relación con la deformabilidad eritrocitaria (DE). Analizamos el efecto de dos dietas hiperlipémicas sobre la concentración de colesterol plasmático y su acción sobre los factores determinantes de la fluidez sanguínea. Ratas Wistar macho adultas (n=24), de 70 días de edad, se separaron en tres grupos, siendo alimentadas 28 días con: 1-dieta estándar (C); 2-dieta estándar adicionada con 15% de jugo bovino (cada 100g: 1,2g de colesterol (Co), 1,06g de grasa total y 6,8g de proteínas) (D₁); 3- dieta estándar adicionada con Co (97% de pureza) 0,8g/100g de dieta y aceite de maíz 28% (peso/peso de dieta) (D₂). A los animales anestesiados se les extrajo sangre por punción cardíaca. Se determinaron: en plasma: Co (método enzimático de esterasa oxidasa), CoHDL, y CoLDL y en sangre: VS y VP (viscosímetro rotacional). La VS relativa estandarizada a hematocrito (Hto) del 45% (VS_r) se calculó: (VS/VP)/45/Hto. El índice de rigidez (IR, inversa de DE) se midió por filtración a través de membrana nucleopore. Resultados (media \pm ES): Co (mg%): C: $85,99 \pm 3,29$; D₁: $77,17 \pm 2,61$; D₂: $104,87 \pm 2,39^{**}$; CoHDL: C: $56,17 \pm 4,12$; D₁: $66,14 \pm 3,23$; D₂: $79,12 \pm 1,57^{***}$; CoLDL: C: $13,99 \pm 0,89$; D₁: $13,67 \pm 0,67$; D₂: $34,25 \pm 1,982^{**}$; VS_r: C: $4,26 \pm 0,39$; D₁: $4,85 \pm 0,41$; D₂: $6,56 \pm 0,18^{**}$. IR: C: $5,79 \pm 0,18$; D₁: $6,06 \pm 0,17$; D₂: $8,77 \pm 0,31^{**}$ (** p < 0,001 vs. C). La dieta D₂ aumentó Co, CoHDL, y CoLDL, y modificó la VS_r debido al incremento del IR, siendo independiente de VP que no se modificó. La D₁, no produjo cambios en dichas variables. Estos resultados evidencian que el aumento de Co produce una disminución de la deformabilidad eritrocitaria que origina el aumento de VS_r.

517 (662) SHOCK HEMORRÁGICO: IMPLICANCIA DEL ESTADO TIROIDEO Y DEL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA ADAPTACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDÍACA. Sarati L.¹; Martínez C.²; Asensio M.³; Arreche N.⁴; Baratto B.⁵; Balaszczuk A.⁶; Fellet A.⁷

Catedra de Fisiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET^{1 2 3 4 5 6 7} <ivonnesarati@hotmail.com>

Estudiar la participación del estado tiroideo y del sistema del óxido nítrico (NO) en las alteraciones hemodinámicas inducidas por la pérdida aguda de sangre. Animales eutiroides, hipertiroides e hipotiroides. Grupo control y Grupo hemorragia: hemorragia 20% de la volemia. A los 120 min de la hemorragia se extrajeron: aurícula derecha (A) y ventrículo izquierdo (V). Actividad histoquímica de la NO sintasa (NOS) (técnica NADPH-diaforasa), western blot de la NOS (e-NOS, n-NOS, i-NOS) y de caveolina 1 y 3 (cav 1 y cav 3). Los resultados se expresan como $X \pm ES$, n=9 cada grupo. Se realizó análisis de la varianza de una variable (ANOVA) seguido de un test *t* a posteriori de Bonferroni para múltiples comparaciones. La prueba de la *t* de Student fue utilizado para comparar los datos apareados o no apareados entre dos grupos. Se consideró el 5% de probabilidad como significativo. * P < 0.05 vs respectivo control, # p < 0.05 vs eutiroides control.

Animales	Eutiroides Hemorragia	Hipertiroides Control 120 min	Hipotiroides Hemorragia Control 120 min	Control Control 120 min	Hemorragia Hemorragia 120 min
Act NOS	0,210 \pm 0,004	0,256 \pm 0,006*	0,198 \pm 0,002#	0,316 \pm 0,011*	0,257 \pm 0,006# 0,276 \pm 0,005*
A (DO) Act NOS	0,169 \pm 0,004	0,193 \pm 0,002*	0,152 \pm 0,002	0,159 \pm 0,011	0,162 \pm 0,002 0,167 \pm 0,002
V (DO) WB iNOS	65,3 \pm 4,8	84,8 \pm 3,7*	75,3 \pm 1,8	95,2 \pm 0,8*	77,1 \pm 6,3 92,3 \pm 3,4*
A (UA%) WB Inos	23,8 \pm 2,0	79,0 \pm 7,1*	90,5 \pm 10,5#	88,1 \pm 5,1	92,7 \pm 7,0# 92,1 \pm 8,2
V (UA%) WB cav 1	94,2 \pm 0,2	94,4 \pm 4,6	89,7 \pm 0,5	80,6 \pm 0,2*	95,20 \pm 0,03 123,7 \pm 0,9*
V (UA%)					

La pérdida aguda de sangre aumentó la actividad de la NOS en A que se correlaciona con cambios en la iNOS. Este efecto se observó en los V eutiroides. El perfil tiroideo no modificó la cav 1 y 3 pero la hemorragia modificó la cav 1 en los hiper e hipotiroides. La producción de NO y su participación en la adaptación cardíaca al estado hipovolémico por hemorragia dependería del eje tiroideo.

518 (755) ALTERACIONES RENALES TEMPRANAS INDUCIDAS POR LA DEFICIENCIA MODERADA DE ZINC EN LA VIDA FETAL Y POSTNATAL TEMPRANA. EN RATAS DE AMBOS GÉNEROS. Tomat A.¹; Veiras L.²; Ploder M.³; López Ferrucci M.⁴; Balaszczuk A.⁵; Costa M.⁶; Arranz C.⁷

CATEDRA DE FISIOLÓGIA, FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, UBA¹; CATEDRA DE FISIOLÓGIA, FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA, UBA^{2 3 4 5 6 7} <atomat@ffyba.uba.ar>

Introducción: Previamente demostramos que la deficiencia de zinc durante la vida fetal y postnatal temprana programa valores elevados de presión arterial y alteraciones renales en la vida adulta. Objetivo: Evaluar las alteraciones tempranas en la morfología renal provocadas por la restricción dietaria de zinc durante la vida fetal y la lactancia y si existen diferencias de género en las mismas. Ratas Wistar recibieron desde el inicio del apareo y durante la lactancia: Dieta control (30 ppm zinc) o baja (8 ppm zinc). En las crías machos y hembras de 6 y 21 días de vida se determinaron las áreas glomerulares totales y del ovllo capilar. El número de glomérulos por riñón se midió a los 21 días en ambos sexos. Resultados: *p < 0.01 vs C; † p < 0.001 vs macho C; n=6 para cada grupo

	Macho Control	Macho Baja	Hembra Control	Hembra Baja
Nº de Glomérulos/riñón 21 días	18110±413	15500±437*	17750±429	15700±718*
Área glomerular Total-6 días (µm ²)	2811 ± 149	2258 ± 81*	2337 ± 108 [†]	2108 ± 75
Área glomerular Total-21 días (µm ²)	3098±61	3717±72 *	2638±67 [†]	3221±130*
Área del ovllo capilar-6 días (µm ²)	2141 ± 145	1818 ± 67*	1855 ± 90	1691 ± 55
Área del ovllo capilar-21 días (µm ²)	2284±48	2642±63*	1992± 69 [†]	2427±109*

Conclusión: la deficiencia de zinc durante la vida fetal y la lactancia indujo alteraciones en el proceso nefrogénico, evidenciándose una reducción en el número de nefrones en ambos sexos a los 21 días y una disminución de las áreas glomerulares solo en los machos a los 6 días. Consecuentemente, a los 21 días se observó una hipertrofia glomerular compensadora para mantener una adecuada función renal que a largo plazo conduciría a la disfunción renal que contribuirá al aumento de la presión arterial observadas en la vida adulta en este modelo.

519 (802) ESTUDIO DE LOS PATRONES DE GLICOSILACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR EN UN MODELO DE ENSANCHAMIENTO DIFUSO DE LA AORTA. Oberkersch R.¹; Egitto P.²; Volpi N.³; Calabrese G.⁴

Facultad de Farmacia y Bioquímica Cátedra de Biología Celular y Molecular¹; Facultad de Farmacia y Bioquímica Cátedra de Biología Celular y Molecular,²; Departamento de Biología Animal, Universidad de Modena y Reggio Emilia, Italia³; Facultad de Farmacia y Bioquímica Cátedra de Biología Celular y Molecular,⁴ <roxanaober6@hotmail.com>

El remodelado de la matriz extracelular vascular (MEXv) adquiere relevancia en aquellas patologías que afectan la lámina basal endotelial, como la aterosclerosis. Los proteoglicanos decorina y biglicano no sólo organizan la MEXv, sino que además controlan los mecanismos de proliferación y migración celular interactuando específicamente a través de sus cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) con citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las características de glicosilación de la MEXv aórtica, en un modelo animal de ensanchamiento difuso de la íntima (DIT). Como fue reportado anteriormente, ratas Wistar machos sometidas a una dieta suplementada con colesterol (2%) y ácido cólico (1%) (Hcol) durante cuatro semanas, mostraron un incremento significativo del colesterol total y no HDL. Se realizaron estudios histológicos (Sudán) sobre criocortes de aorta. Además se aislaron los GAGs constituyentes de la MEXv aórtica a través de una digestión papaínica y posterior precipitación con cetilpiridonio. Sobre estas muestras se analizaron los patrones de glicosilación, en geles de agarosa y HPLC antes y después del tratamiento con con-droitinasas. No se detectó depósito lipídico en los estudios histológicos efectuados sobre los criocortes de aortas provenientes de Hcol, aunque pudo observarse un ligero ensanchamiento de la capa íntima. Se obtuvo un promedio de 4.14 µg/ 5 µl de GAG a partir de las aortas control (4 muestras), con un porcentaje en condroitin sulfato y dermatán sulfato del 35 % y 6.5% respectivamente, principalmente sulfatados en posición 4 y 6 (63.50% y 30.0%, respectivamente). Mientras que las muestras Hcol (cuatro) mostraron un enriquecimiento en ácido idurónico. Los resultados obtenidos sugieren que los cambios producidos en los patrones de glicosilación de los GAGs constituyentes de los proteoglicanos decorina y biglicano, preceden la formación de la lesión ateromatosa.

ENDOCRINOLOGÍA 5

520 (130) EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON EL GEN DE LA TIMULINA SOBRE LA POBLACIÓN TIROTROPA EN RATONES ATÍMICOS. Martínez E.¹; Reggiani P.²; Bracamonte M.³; Goya R.⁴; Cónsole G.⁵

Universidad Adventista del Plata¹; INIBIOLP; Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP²; Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP-CONICET.³; INIBIOLP; Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP⁴; Histología B. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP-CIC⁵ <evmartines@hotmail.com>

Introducción: Estudios tempranos mostraron que los ratones nude desarrollaron cambios degenerativos en la glándula tiroidea, presentando alteraciones del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo. EXISTEN evidencias de que el eje tiroideo podría regular la secreción de timulina, ya que se han hallado receptores de hormonas tiroideas en las células epiteliales tímicas. Objetivo: Implementar una terapia génica mediante el vector adenoviral: el Rad-FTS en ratones inmunodeficientes (nude) con el fin de prevenir cambios en la población tirotrópa. Material y métodos: Se utilizaron ratones nude hembras y machos homocigotas (nu/nu) y heterocigotas (nu/+). El día 1 postnatal cada ratón recibió una única inyección bilateral i.m. de 10⁸ unidades formadoras de placa (ufp) de Rad-metFTS o de un vector control (RAd-GFP). En el día 50 postnatal fueron sacrificados y se extrajeron las pituitarias bajo lupa. Se midió timulina sérica. La inmunomarcación se hizo con un sistema anti-TSH-EnVisión-cromógeno. La densidad de volumen (DVx10⁻²), densidad celular (DCx10⁻⁴) y tamaño celular (TCµm²) se registraron mediante un analizador de imágenes. Resultados: La terapia génica con timulina neonatal previno el descenso de la población tirotrópa. Se registró aumento significativo (p<0.01) en TC y DC en RAd-FTS vs controles en hembras y machos: TC: M: 76,0±9 vs 46,7±7 y H: 75,9±4 vs 47,6±5; DC: M: 3,8±1 vs 2,3±2 y H: 3,2±1 vs 2,6±1. Hubo ascenso significativo (p<0.01) en los niveles séricos de timulina (fg/ml) en nude RAd-FTS vs controles: M: 285±34 vs 32±4 y H 280±41 vs 36±5. Conclusión: Nuestros hallazgos sugieren un efecto modulador de la terapia génica con timulina sobre la población tirotrópa que puede ser una estrategia eficaz para prevenir las deficiencias detectadas en el eje timo-tiroideo de animales atímicos.

521 (222) EL EJE GHRH-GH-IGF: DIMORFISMO SEXUAL EN CEREBRO E HÍGADO. Ramírez M.¹; Ornstein A.²; Becu-villalobos D.³

Instituto de Biología y Medicina Experimental¹ 2 3 <ramirez@dna.uba.ar>

La secreción de GH es sexualmente dimórfica en roedores. Las hormonas sexuales neonatales son importantes en la generación de este dimorfismo sexual. El objetivo de este trabajo fue profundizar los efectos que ejerce la testosterona en el periodo neonatal en relación al establecimiento de las diferencias sexuales observadas en el eje GHRH-GH-IGF, a nivel hipotalámico, hipofisario y del hígado. Inyectamos ratones hembra en el segundo día de vida con propionato de testosterona (TP, 50µg). El crecimiento de las hembras inyectadas con TP (hembras TP) fue mayor que el de las hembras control a partir del segundo mes de vida (P<0,05, N=15 por grupo). A los cuatro meses de edad en hipotálamo observamos que el RNAm de GHRH (qRT-PCR) fue mayor en machos que en hembras (P<0,05, N=6 por grupo), sin diferencias entre machos y hembras TP. La expresión del RNAm de STT fue similar en los tres grupos. El contenido de GH (RIA) en suero e hipófisis fue significativamente mayor en machos que en hembras (P<0,05, N=7 por grupo), sin presentar diferencias entre machos y hembras TP. La concentración de prolactina (RIA) fue mayor en hembras con respecto a machos, pero sin diferencias significativas entre hembras TP y hembras control. Como medida de la pulsatilidad de GH en la adultez, medimos la excreción de las Proteínas Mayores Urinarias (MUPs, por SDS-PAGE), indicadoras del tiempo de ocupación de los receptores de GH en hígado, y por tanto de la pulsatilidad de GH. Al mes, no hubo diferencias sexuales, mientras que a los 2 y 4 meses, los machos tenían el doble de MUPs que las hembras (P<0.01, N=8 por grupo), sin diferencias significativas en las hembras TP con respecto a las hembras. La concentración de IGF en hígado y suero (RIA) fue mayor en hembras TP que hembras control (P<0,05, N=14 por grupo). Nuestros resultados indican que la testosterona neonatal

masculiniza el eje de crecimiento a nivel hipotalámico-hipofisario, modificando a su vez proteínas blanco de GH en el hígado.

522 (228) CONSUMO DE DIETA RICA EN FRUCTOSA POR LA MADRE LACTANTE: IMPACTO SOBRE LA FUNCIÓN ADIPOCITARIA Y REGULADORES DEL BALANCE ENERGÉTICO EN LA PRIMER PROGENIE MACHO. Alzamendi A.¹; Castrogiovanni D.²; Spinedi E.³; Giovambattista A.⁴

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) CIC-CONICET^{1 2 3 4} <neuroend@imbice.org.ar>

El objetivo fue evaluar en la rata (S-D) si cambios inducidos en el estado nutricional materno durante la lactancia, condicionan el desarrollo del organismo y afectan la progenie macho adulta. Entre los días de parto y destete, las madres se alimentaron *ad libitum* y dividieron en dos grupos, recibiendo dieta rica en fructosa (10% p/v en agua de bebida; MF) o dieta normal (sólo agua; MC). A partir del destete se estudiaron sólo las crías macho de las MC y MF (grupos: C y F). Se registró el peso corporal y alimento consumido entre los días 21 y 60 de edad (día experimental). Se evaluó la concentración circulante de: insulina, leptina (Lep), adiponectina (Adip), otras adipoquinas y ácidos grasos libres. Se diseccionó el tejido adiposo retroperitoneal (TARP) y el hipotálamo medio basal (HMB) para la determinación de la expresión de Ob y Adip, y de ObRb y NPY, respectivamente (por PCR tiempo real). El TARP se utilizó para análisis histológicos. En crías C y F adicionales se realizó el test de sobrecarga con glucosa (TSCG). El grupo F presentó mayor peso corporal y desarrolló hiperfagia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia ($P < 0,05$ vs. C), e hipoadiponectinemia ($P < 0,05$ vs. C). El TSCG mostró una respuesta alterada de la insulinemia en animales F. Los adipocitos de los animales F presentaron un aumento del área celular ($P < 0,05$ vs. C). Los resultados en TARP indican un incremento ($P < 0,05$ vs. C) del ARNm de Lep. En HMB se encontró una disminución en la expresión de ARNm de ObRb ($P < 0,05$ vs. C). Nuestro estudio indica que el consumo excesivo de fructosa por la madre lactante induce cambios en: a) el perfil secretor de adipoquinas y otros metabolitos, y b) factores hipotalámicos que controlan el balance energético. Estas alteraciones podrían incrementar la susceptibilidad de la primer progenie macho para el ulterior desarrollo de patologías (síndrome metabólico, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, entre otras). (PICT 2007-1051 y PIP 2007-0704)

523 (285) LA PROGESTERONA MODULA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR FAS EN LA ADENOHIPÓFISIS. Jaita G.¹; Zárate S.²; Radl D.³; Eijo G.⁴; Ferraris J.⁵; Zaldivar V.⁶; Magri L.⁷; Pisera D.⁸; Seilicovich A.⁹

Instituto de Investigaciones en Reproducción^{1 2 3 4 5 6 7 8 9} <gjaita@fmed.uba.ar>

Nuestros resultados previos indican que el sistema Fas/FasL induce apoptosis de manera estrógeno-dependiente y que la progesterona bloquea la acción proapoptótica de este sistema en la adenohipófisis. Además, hemos demostrado que el porcentaje de células adenohipofisarias que expresan Fas en la membrana celular es mayor en proestro y dependiente del estradiol. En este trabajo, evaluamos la acción de la progesterona sobre la expresión total y en membrana del receptor Fas en las células adenohipofisarias. Células adenohipofisarias provenientes de ratas ovariectomizadas (OVX) fueron incubadas en presencia de 17 β -estradiol (E2, 10⁻⁹M), progesterona (P4, 10⁻⁶M) y E2+P4. La expresión total y de membrana del receptor Fas fue determinada por la técnica de citometría de flujo. Los esteroides gonadales no modificaron el porcentaje de células adenohipofisarias que expresan Fas total (OVX: 81%; E2: 75%; P4: 83%; E2+P4: 85% ns, ANOVA de dos vías). Sin embargo, tanto el estradiol como la progesterona incrementaron el porcentaje de células que expresan Fas en la membrana celular, sin observarse un efecto aditivo de ambos esteroides gonadales (OVX: 28%; E2: 38%; P4: 40%, E2+P4: 38%, $p < 0,05$ vs su respectivo control sin estradiol, $p < 0,01$ vs su respectivo control sin progesterona, ANOVA de dos vías). Nuestros resultados demuestran que la progesterona incrementa

el porcentaje de células adenohipofisarias que expresan Fas en la membrana celular al igual que los estrógenos sin modificar la expresión total del receptor, sugiriendo que los esteroides gonadales podrían modular el proceso de traslocación del receptor Fas a la membrana celular en la adenohipófisis.

524 (318) LA DELECCIÓN DEL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 ESPECÍFICAMENTE EN LACTOTROPOS CONDUCE A LA FORMACIÓN DE PROLACTINOMAS Y OBESIDAD. Pérez Millán M.¹; Luque G.²; Noain D.³; Becu D.⁴; Rubinstein M.⁵

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET^{1 2}; Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular-CONICET³; Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET⁴; Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular-CONICET⁵ <marpemi@yahoo.com.ar>

Con el objetivo de estudiar prolactinomas resistentes a agonistas dopaminérgicos se desarrolló un ratón *knockout* para el RD2 específicamente en lactotrofos. En primer lugar se generaron ratones transgénicos que expresan la recombinasa Cre bajo el control transcripcional del promotor de prolactina (Prl-Cre). Se obtuvieron 5 líneas de estos ratones Prl-Cre, 3 de ellas, con distintos niveles de expresión de Cre en hipófisis, se cruzaron con ratones que poseen el exón 2 del RD2 flanqueado por secuencias *loxP*. Las crías de este apareo (que expresan Cre y son *flox/flox*) se llamaron *pitD2Rko*. Para verificar la delección del gen del RD2 en los *pitD2Rko* se evaluaron los niveles de prolactina sérica, basal y frente a un estímulo con haloperidol (3mg/kg) en las 3 líneas. Dos de las líneas mostraron un nivel de prolactina basal mayor que sus pares *wildtype* (*wt*) ($p < 0,05$) y no se vio un aumento de prolactina luego del haloperidol como ocurría en los *wt*, lo que indicó que el RD2 hipofisario en estas líneas no era funcional. Se realizó una prueba de catatonía con haloperidol (1,5 mg/kg) y los animales *pitD2Rko* se comportaron igual que los *wt*, indicando la funcionalidad del RD2 a nivel del sistema nervioso central. Se analizó el eje del crecimiento de los *pitD2Rko* determinando curvas de crecimiento, niveles séricos de IGF-1 y niveles de MUPs y se observó que presentaban valores similares a los de los *wt*, indicando que el crecimiento era normal. Sorprendentemente, se encontró que las hembras *pitD2Rko* a partir de los 90 días de edad presentaban un aumento del peso corporal ($p < 0,05$), en relación a un aumento de ingesta, aún relativizando los resultados al peso corporal. Finalmente, se demostró que los *pitD2Rko* generaron prolactinomas, evidenciados por los altos niveles de prolactina tanto sérica como en la hipófisis, y por los pesos de las glándulas. La generación de este nuevo *knockout* *pitD2Rko*, nos provee de una herramienta única en el estudio de prolactinomas y obesidad.

525 (335) EL 17BETA-ESTRADIOL ACTIVA DIFERENTES PROMOTORES DEL GEN DE BDNF (BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR) EN CORTEZA E HIPOCAMPO DE RATÓN. Moreno Piovano G.¹; Falco G.²; Dudiuk C.³; Varayoud J.⁴; Muñoz De Toro M.⁵; Luque E.⁶; Ramos J.⁷

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes^{1 2 3 4 5 6 7} <gmoreno@fbc.unl.edu.ar>

Se ha sugerido que los estrógenos poseen la capacidad de modular la expresión de neurotrofinas en el cerebro, siendo su mecanismo aún desconocido. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de un tratamiento agudo con 17beta-estradiol (E2) sobre la expresión de BDNF y sus variantes transcripcionales en el hipocampo y corteza de ratones hembra ovariectomizadas (OVX) a los 90 días de edad. Luego de 10 días de realizada la OVX los animales fueron tratados con una única dosis de 2 mcg de E2 (grupo tratado: E; n=7) o con 100 mcl de aceite de sésamo (grupo control C; n=5) y se los sacrificó a las 2 hs post inyección. Mediante microcirugía se extrajeron los hipocampos completos y las cortezas adyacentes. La expresión del ARNm de BDNF y la actividad transcripcional de sus promotores (1 al 5) se evaluaron por RT-PCR en tiempo real. Los animales tratados con E2

(grupo E) mostraron un aumento significativo en la expresión del ARNm de BDNF tanto en hipocampo como en corteza ($p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente) al compararlos con los controles. Posteriormente se estudió cuáles promotores del gen de BDNF fueron activados por el tratamiento con E2. En el hipocampo de los ratones E se observó un aumento en la actividad relativa de los promotores 2 ($p < 0,05$) y 3 ($p < 0,05$) (promotor 5 actualmente en estudio). En la corteza de estos animales solo el promotor 2 manifestó un aumento significativo en su actividad ($p < 0,05$) en tanto que el promotor 5 mostró una tendencia a ser regulado hacia arriba ($p = 0,05$). Estos resultados sugieren que un tratamiento agudo con E2 tiene la capacidad de inducir la expresión de BDNF de una manera región-específica en el cerebro del ratón. Esta "up-regulation" se daría a expensas de un aumento en la actividad de los promotores 2 y 3 en hipocampo y de los promotores 2 y 5 en corteza. De esta manera la regulación estrogénica de la expresión de BDNF comprende diferentes mecanismos de acuerdo a la región neuroanatómica en estudio.

526 (478) LA PROLIFERACIÓN Y PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS TUMORALES SON REGULADAS POR LA ACTIVACIÓN DE PKC ALFA, ÉPSILON Y ERK1/2. Petiti J.¹; Gutiérrez S.²; De Paul A.³; Andreoli V.⁴; Palmeri C.⁵; Sosa L.⁶; Bocco J.⁷; Torres A.⁸

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.^{1 2 3}; CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁴; Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.^{5 6}; CIBICI-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁷; Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁸ <juanpetiti@yahoo.com.ar>

La proteína quinasa C (PKC) es una familia integrada por 10 isoformas involucradas en la proliferación y regulación del ciclo celular en células tumorales. Estas funciones son mediadas por vías de transducción de señales, destacándose la vía ERK1/2. Nuestro objetivo fue explorar el rol de PKC alfa y epsilon como mediadoras de la proliferación y progresión del ciclo celular de células adenohipofisarias tumorales GH3B6 estimuladas con éster de forbol (PMA) y determinar si estos efectos son dependientes de ERK1/2. Cultivos de células GH3B6 se trataron con PMA (400nM, 15 min) sólo o con los siguientes inhibidores por 30 min: BIM (de PKC convencionales y noveles, 4µM), G66976 (de PKCalfa 5µM), eV1-2 (de PKCepsilon 50µM) y PD98059 (de ERK1/2; 50iM). Se cuantificó la proliferación celular por inmunomarcación para BrdU y el análisis del ciclo celular se realizó por citometría de flujo. La expresión de ERK1/2 se determinó por western blot. La identificación a nivel subcelular de PKC alfa y epsilon se realizó mediante inmunocitoquímica por microscopía confocal (MC) y electrónica (ME). Test estadístico: ANOVA-Fisher. El tratamiento con PMA por 15 min provocó un aumento de la proliferación de células GH3B6 ($p < 0,001$) e incrementó la cantidad de células en la fase S del ciclo celular, efectos que fueron bloqueados por los inhibidores de PKC alfa y epsilon ($p < 0,001$). La incubación con BIM o PD98059 bloqueó la activación de ERK1/2 y la proliferación de células GH3B6 inducida por PMA ($p < 0,001$). La MC y ME revelaron en células controles la presencia de PKC alfa y epsilon en el citosol, mientras que el estímulo con PMA indujo una marcada translocación de estas quinasas a membrana plasmática y nuclear indicando su activación. Estos resultados demuestran que PKC alfa y epsilon, mediante la activación de ERK1/2, cumplen un rol clave en la regulación de la proliferación y progresión del ciclo celular de células tumorales GH3B6, convirtiéndolas en atractivos blancos terapéuticos.

527 (493) INVERSIÓN DEL DIMORFISMO SEXUAL EN LA EXPRESIÓN DEL ARN MENSAJERO DE GNRH Y GAD67 EN HIPOTÁLAMO ANTERIOR DE RATONES ADULTOS GABAB1KO. Di Giorgio N.¹; Catalano P.²; Bettler B.³; Luxlantos V.⁴

Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET¹; Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET; Facultad de Medicina, UBA.²; Department of Clinical-Biological Sciences, University of Basel, Basel, Switzerland.³; Instituto de Biología y Medicina Experimental- CONICET⁴ <digiorgio@dna.uba.ar>

Previamente demostramos alteraciones en la ciclicidad y reproducción en ratones hembras adultas sin la subunidad GABA_{B1} del receptor GABA_B (GABA_{B1}KO); presentan disminución en el contenido hipotalámico de GnRH y aumento en su pulsatilidad. Además, los contenidos hipotalámicos de GABA y glutamato están aumentados en las hembras GABA_{B1}KO (KO). Objetivo: evaluar si la ausencia de un receptor GABA_B funcional altera la expresión del ARNm de GnRH y GAD67 en tejidos clave en la reproducción. Determinamos la expresión del ARNm de GnRH en hipotálamo medio basal (HMB), hipotálamo anterior (HA) y bulbo olfatorio (BO) y de GAD67 en HMB y HA, utilizando la corteza frontoparietal (CT) como control, en ratones adultos de ambos sexos, salvajes (WT) y KO, por qRT-PCR. ARNm de GnRH en HMB: los machos presentaron menores niveles que las hembras ($p < 0,01$) y los KO niveles mayores que los WT ($p < 0,01$). Sin embargo, el ARNm de GnRH en HA mostró un patrón distinto, siendo más alta la expresión en machos WT respecto de machos KO y hembras WT, pero similar a hembras KO ($p < 0,01$). La expresión del ARNm de GnRH en BO y CT fue similar en todos los grupos. El ARNm de GAD67 en HMB estaba aumentada en los KO respecto a los WT ($p < 0,01$), sin diferencias entre sexos. Al igual que con GnRH, en HA el ARNm de GAD67 presentó inversión del dimorfismo sexual, con un incremento similar en los machos WT y hembras KO respecto a machos KO y hembras WT ($p < 0,01$). El ARNm de GAD67 está aumentado en CT de hembras WT respecto a machos WT, mientras que esta diferencia sexual no se observó en los KO. Concluimos que los ratones GABA_{B1}KO presentan patrones de expresión de GnRH y GAD67 alterados tanto en HMB como en HA, por lo que la falta del receptor GABA_B funcional jugaría un rol importante tanto a nivel de expresión como del contenido del péptido y de GABA en el hipotálamo. Estos resultados sugieren que existe una inversión del dimorfismo sexual en la expresión de GnRH y GAD67 en HA en los KO. (CONICET, UBA y ANPCYT).

528 (505) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO α Y DE LA VÍA OXIDO NÍTRICO/GUANILATO CICLASA/ GMPc EN LA ACCIÓN ANTIMITOGÉNICA DEL ESTRADIOL EN INTERACCIÓN CON INSULINA SOBRE CÉLULAS LACTOTROPAS. Gutiérrez S.¹; Petiti J.²; Sosa L.³; De Paul A.⁴; Masini-repiso A.⁵; Torres A.⁶

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.^{1 2 3 4}; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET⁵; Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.⁶ <silvina_gutierrez@hotmail.com>

Previamente hemos demostrado que el estradiol (E2) inhibe la proliferación de lactotropas inducida por insulina (Ins), desconociéndose la isoforma del receptor de estrógeno (RE) que media este efecto. En base a estos antecedentes nos propusimos evaluar la participación de las isoformas α y β del RE en las acciones del E2 modulando la proliferación de células lactotropas promovida por Ins, así como la contribución de la vía Oxido Nítrico (ON)/Guanilato Ciclasa (GC)/GMPc en este efecto. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra fueron tratados con E2 (1nM) e Ins (1000 ng/ml), solos o combinados por 60 min. Se utilizaron agonistas de los RE α (PPT 1 nM) y β (DPN 1nM), inhibidores: de los RE (ICI 182780, 100nM) y de óxido nítrico sintasa, NOS (L-NMMA, 0.1mM y L-NAME, 1mM). Se valoró la proliferación de lactotropas por doble detección inmunocitoquímica de BrdU y prolactina, la expresión de GC α 1 y β 1 y β -actina por Western Blot y la producción de GMPc por ELISA. Análisis estadístico ANOVA-Fisher. En condiciones libres de suero, E2 ni los agonistas de los RE α o β estimularon la proliferación de lactotropas. La incubación de E2/Ins y PPT/Ins promovieron un efecto

antimitogénico sobre las lactotropas ($p < 0.01$ vs Ins). Este efecto fue revertido por ICI 182780 y por L-NMMA y L-NAME ($p < 0.01$). Con respecto a la vía ON/GC, E2 e Ins solos ejercieron efectos opuestos sobre la expresión de las isoformas de GC (incrementaron $\alpha 1$ e inhibieron $\beta 1$). La co-incubación de E2/Ins y PPT/Ins indujo un aumento significativo de ambas isoformas. E2 e Ins solos disminuyeron la producción de GMPc (44% y 26% vs. control respectivamente), mientras que la co-incubación de E2/Ins incrementó significativamente su producción. Estos resultados sugieren que el E2 a través de la isoforma α del RE inhibe la actividad mitogénica de las células lactotropas inducida por Ins con participación de la vía ON/GC/GMPc.

529 (527) LA ACTIVIDAD DE LA DEXAMETASONA SOBRE EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES Y EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT5A EN EL EPITELIO MAMARIO ES DEPENDIENTE DEL CONTEXTO CELULAR. Di Pietro M.¹; Pecci A.²; Kordon E.³

Laboratorio de Expresión Génica en Mama y Apoptosis (LEGMA), IFIBYNE-CONICET. Departamento de Química Biológica, FCEyN - UBA^{1 2 3} <flordipietro@fibertel.com.ar>

Se ha reportado que el tratamiento con el glucocorticoide sintético Dexametasona (Dex) en ratones al destete retarda la involución mamaria, inhibiendo la apoptosis y previniendo la disminución del factor de transcripción de las proteínas de la leche, Stat5a, su forma activa (pStat5a) y el receptor de glucocorticoides (GR). Nuestro objetivo fue determinar si los efectos de Dex sobre estas proteínas, analizados por ensayos de Western Blot, son dependientes del contexto en el que se encuentran las células epiteliales. Se evaluaron entonces los efectos del tratamiento con Dex en mamas de ratones vírgenes. Esto produjo una disminución en los niveles de GR y no generó cambios en los niveles de Stat5a y pStat5a. Para analizar si la diferenciación celular determinaba los efectos de la Dex sobre estas proteínas, células mamarias HC11 en distintos estadios de diferenciación se trataron con esta hormona en cultivo. En todos los casos, Dex provocó la disminución de los niveles de GR y sólo en las células indiferenciadas indujo aumento en los niveles de Stat5a. Estos resultados sugieren que los efectos desencadenados por los glucocorticoides en las mamas post-lactancia no se asocian únicamente al nivel de diferenciación del epitelio. A continuación, se repitió el tratamiento con Dex en células diferenciadas pero en ausencia de suero fetal bovino. Se ha reportado que en estas condiciones los glucocorticoides rescatan de la apoptosis disparada por el hambre celular. Llamativamente, sólo así observamos que Dex incrementaba los niveles de Stat5a y pStat5a, tal como ocurría en mamas luego del destete. Sin embargo, aún en estas condiciones Dex inhibió la expresión de GR. Esto sugiere que la capacidad de Dex de inducir un aumento en los niveles de Stat5a y pStat5a en células mamarias diferenciadas requeriría de un contexto pro-apoptótico. Además esta actividad podría ser necesaria, a diferencia de la regulación positiva de GR, para inducir el rescate de la muerte de estas células.

530 (618) ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN MEN1 EN 17 CASOS INDICE CON NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLE TIPO 1: PRIMERA CASUÍSTICA ARGENTINA. Fainstein Day P.¹; Fernandez Gianotti T.²; Viale M.³; Diaz A.⁴; Katz D.⁵; Kozak A.⁶; Balzaretto M.⁷; Bruno O.⁸

Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires^{1 2 3}; Sección Endocrinología Hospital de Clínicas José de San Martín⁴; FLENI⁵; Servicio de Endocrinología y Medicina Nuclear, Hospital Italiano de Buenos Aires^{6 7}; Sección Endocrinología Hospital de Clínicas José de San Martín⁸ <patricia.fainstein@hospitalitaliano.org.ar>

La neoplasia endócrina múltiple tipo 1 (NEM1) es un síndrome infrecuente, autosómico dominante y cuyo fenotipo se caracteriza por presentar 2 de los 3 siguientes tumores endócrinos: hiperplasia paratiroidea, tumor gastro-entero-pancreático y adenoma hipofisario. Los tumores suelen presentarse dos a tres

décadas antes que sus equivalentes esporádicos. El gen MEN1 está localizado en el cromosoma 11q13 y las mutaciones descritas asociadas a este síndrome se encuentran a lo largo de todo el gen. La detección de mutaciones en estos pacientes varía del 30 al 90% según las series publicadas y esto puede deberse a la selección de pacientes. Nuestro objetivo fue la caracterización del genotipo en 29 posibles portadores de mutación, oriundos de Argentina. El estudio molecular se realizó a partir de ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica, secuenciándose con ddNTP³³ los exones 2 al 10 del gen MEN1 de cada uno de los casos índices (se utilizó secuenciación automática en caso de necesidad). En la Tabla se muestran los resultados obtenidos en 17 casos índice estudiados clásicos (1-15) (al menos dos de tres tumores) y no clásicos (un tumor diagnosticado antes de los 18 años de edad) (16-17). También fueron estudiados 12 familiares de 3 casos índice con mutación germinal.

Caso Índice	Sexo	Edad (años)	Mutación	Exón	Caracterización
1	F	15	359del4	2	delección
2	M	30	735del4	3	delección
3	F	47	L376P	8	CS
4	M	40	6636ins4	8	inserción
			TGCC		
5	F	42	E469X	10	SS
6	F	42	A541T	10	CS
7	F	49	-	-	-
8	M	28	F447S	9	CS
9	F	38	R171Q	3	P
10	F	30	S555I*	10	CS
11	F	30	D418D	10	P
12	F	30	F447S	9	CS
13	F	38	W125X	2	SS
14	F	57	-	-	-
15	F	29	F447S	9	CS
16	F	15	4322delG	3	delección
17	F	15	A541T	10	CS

CS: cambio de sentido; SS: sin sentido, P: polimorfismo

Mutación hallada en 5/12 familiares estudiados. Hallamos mutaciones germinales en el 80% de los pacientes clásicos, en 100% de los no clásicos y en 42% de los familiares de casos índice estudiados. Esta es la primera casuística con estudio del genotipo en Argentina.

531 (676) REGULACIÓN DEL EFECTO MINERALOCORTICOIDE DEPENDIENTE DE MR POR 5 α -DIHIDRO-PROGESTERONA. Molinari A.¹; Erlejman A.²; Piwien Pilipuk G.³; Galigniana M.⁴

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Bs. As., Dto de Química Biológica, Laboratorio de Biología Celular y Molecular (CM1)^{1 2}; IIBBA-CONICET³; IIBBA-CONICET; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Bs. As., Dto de Química Biológica, Laboratorio de Biología Celular y Molecular (CM1)⁴ <molcho@hotmail.com>

Todos los componentes del sistema RAA [renina-angiotensina (AT)-aldosterona (Aldo)] están aumentados durante el embarazo. La hipersensibilidad a AT ocurre por fallas en la refractariedad de las paredes vasculares dependiente de PGI2 más que por cambios del volumen sanguíneo o la concentración de renina y AT. El control es restaurado en parte por un derivado de progesterona (P), 5 α -diH-P, pero no por P misma. Como los niveles de 5 α -diH-P se incrementan más de 20 veces al final del embarazo, analizamos su posible efecto regulatorio sobre la respuesta a Aldo. P posee muy pobre efecto mineralocorticoide, mientras que 5 α -diH-P mostró un comportamiento bifásico: entre 1 a 100 μ g/Kg incrementó la respuesta mineralocorticoide (menor cociente natriuresis/kaliuresis) de manera dosis-dependiente. A partir de dosis > 300 μ g/Kg el efecto 5 α -diH-P se transformó en natriurético. Ensayos de unión a MR mostraron una Kd= 30 \pm 5 nM para 5 α -diH-P y que no afecta la unión de Aldo (Kd=2 \pm 1 nM). La trans-locación nuclear de GFP-MR por incubación simultánea con ambos esteroides

también fue normal. Sin embargo, concentraciones inactivas de 5 α -diH-P (10 pM) abolieron por completo la actividad transcripcional de MR mediada por Aldo en todo el rango de concentraciones ensayadas (pM a μ M). Para verificar si la conformación de 5 α -diH-P es responsable de este efecto, se probó el compuesto sintético 11,19- δ idoprogesterona (11-OP), el que posee similar conformación, vida media y Kd por MR que 5 α -diH-P. Una concentración inactiva de 10 pM 11-OP potenció el efecto de Aldo vía MR al punto de superar la respuesta máxima. Se concluye que 5 α -diH-P es un regulador de la HTA dependiente del sistema RAA. Debido a los elevados niveles de 5 α -diH-P en el líquido amniótico, también podría explicar la resistencia idiopática a Aldo observada en neonatos. El efecto de 5 α -diH-P radicaría en la alta inflexibilidad del anillo B comparada con la de Aldo y P, lo que afectaría diferencialmente la conformación de MR.

532 (693) RADIOSENSIBILIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE TIROIDES POR INHIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASAS. Perona M.¹; Dagrosa M.²; Casal M.³; Pisarev M.⁴; Juvenal G.⁵

Comisión Nacional de Energía Atómica^{1 2}; Instituto de Oncología "Ángel Roffo"³; Comisión Nacional de Energía Atómica^{4 5} <mperona@cnea.gov.ar>

Introducción: El cáncer de tiroides es una de las formas más comunes de tumores endocrinos representando alrededor del 0,5 al 1,5% de los tumores. El tratamiento convencional consiste en tiroidectomía total completada luego por la administración de ¹³¹I. La aplicación de fármacos radiosensibilizadores permitiría el uso de dosis más bajas de radioiodo. Por otra parte la utilización de radioterapia es una alternativa cada vez más utilizada en aquellos tumores que captan pobremente yodo. **Objetivos:** Estudiar la aplicación de inhibidores de histonas desacetilasas (HDACI) como radiosensibilizadores para el tratamiento del cáncer de tiroides. **Materiales y Métodos:** Se cultivaron líneas celulares de cáncer humano tiroideo folicular (WRO) y papilar (TPC-1). Las mismas se incubaron durante 24, 48 y 72 horas con dosis crecientes de dos HDACI: butirato de sodio (NaB) y ácido valproico. Las células fueron irradiadas con una fuente de ⁶⁰Co (1 Gy/min) en dosis comprendidas entre 1 y 8 Gy. Luego se evaluó el daño post irradiación mediante el ensayo de formación de colonias. Se calcularon los factores modificadores de la dosis (FMD) para las dosis de radiación que reducen la sobrevida celular en un 37% (D₃₇) y 10% (D₁₀). **Resultados:** La fracción de sobrevida para 2 Gy (FS2) en las WRO se redujo de 68 \pm 1,6% en la curva control a 42 \pm 3,8% (P < 0,01) en las tratadas con NaB. El FMD para la D₃₇ fue de 1,74 y de 1,54 para la D₁₀. En cambio en aquellas incubadas con ácido valproico antes de la irradiación, la FS2 se redujo en menor medida de 69 \pm 0,02% a 56 \pm 0,01% en las tratadas (P < 0,01), con FMD de 1,24 y de 1,19 para la D₃₇ y la D₁₀ respectivamente. La incubación con los dos HDACI durante 24, 48 y 72 horas a diferentes concentraciones no produjo un aumento significativo en la captación de yodo radioactivo en ninguna de las dos líneas celulares. **Conclusiones:** La utilización de HDACI aumenta la radiosensibilidad de líneas celulares de cáncer de tiroides.

533 (767) CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR EL 2- IODOHEXADECANAL EN TIROIDES DE RATA ESTIMULADAS CON MMI. Thomasz L.¹; Toro D.²; Oglio R.³; Pisarev M.⁴; Juvenal G.⁵

Comisión Nacional de Energía Atómica.^{1 2 3}; Comisión Nacional de Energía Atómica; Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires⁴; Comisión Nacional de Energía Atómica.⁵ <thomasz@cnea.gov.ar>

Introducción: El yodo es utilizado por la tiroides para sintetizar hormonas tiroideas pero además posee un rol regulatorio a través de la síntesis de lípidos iodados. Entre estos la 6-iodo-delta-lactona del ácido araquidónico (IL- δ) y el 2-iodohexadecanal (IHD) inhiben varios parámetros tiroideos. **Objetivo:** Analizar los cambios morfológicos que ocurren durante la inhibición e involución del bocio inducida por el 2-iodohexadecanal. **Metodología y Re-**

sultados: Ensayos de inhibición del bocio inducido: Ratas fueron inyectadas 30 días con MMI (5mg/día), MMI+IHD 20ig y MMI+IL- δ 20 μ g. El MMI produjo un incremento del 300% de los pesos tiroideos (c: 6,19 \pm 0,41, MMI: 25,63 \pm 1,34), el IHD (18,87 \pm 1,02) inhibió el efecto del MMI en un 35% (p<0,001) y la IL- δ (19,75 \pm 0,49) produjo una inhibición del 30% (p<0,01). Al analizar las demás variables se observó que, luego de 30 días de tratamiento con MMI, el número de células aumentó 1,4 veces (p<0,001), la altura del epitelio glandular se duplicó (p<0,001) y el área del lumen folicular se redujo a la mitad (p<0,01). El tratamiento con IHD o IL- δ revirtió el efecto producido por el MMI y todas las variables analizadas tuvieron valores cercanos a los controles. **Ensayos de Involución:** El bocio fue inducido por la administración de MMI 10 días, luego se interrumpió el tratamiento y se inyectó solución salina, IHD o KI. El IHD produjo una disminución de los pesos tiroideos de 48% a los 3 días, 30% luego de 7 días, 44% luego de 10 días (p<0,01), del número de células (30 % de inhibición luego de 3 días de tratamiento con IHD, p<0,001) y de la altura del epitelio glandular (c: 12,1 \pm 0,3 im, IHD: 10,1 \pm 0,5 im, p<0,05 luego de 3 días de tratamiento). **Conclusión:** El IHD previene el crecimiento glandular y provoca la involución del bocio preformado.

534 (823) ANÁLISIS PREDICTIVO DE LAS ESTRUCTURAS TRIDIMENSIONALES DEL RECEPTOR DE HORMONAS TIROIDALES CON MUTACIONES CAUSANTES DE RESISTENCIA A HORMONAS TIROIDALES. Olcese M.¹; Belforte F.²; Citterio C.³; Gonzalez Sarmiento R.⁴; Targovnik H.⁵; Rivolta C.⁶

Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{1 2 3 4 5 6} <escorpiocecily@yahoo.com.ar>

El receptor de hormonas tiroideas al igual que otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, posee una estructura proteica conservada, que incluye un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de unión al ligando (LBD). Es codificado por el gen THRB. El 90% de mutaciones en dicho gen son la causa del Síndrome de Resistencia a Hormonas Tiroideas y la mayoría de las mismas se localizan en el LBD. LBD sufre cambios estructurales luego de unir T₃ que tienen como consecuencia la liberación de co-represores y el consecuente reclutamiento de co-activadores que permitirán expresar la capacidad transactivadora del receptor. Si bien muchas de estas mutaciones disminuyen significativamente la afinidad del receptor por la hormona, otras se manifiestan con una afectada liberación de co-represores, o deficiente unión de co-activadores. El objetivo de este trabajo consiste en la caracterización de las mutaciones en el gen THRB identificadas previamente en nuestro laboratorio: p.A268G, p.N331D, p.A335P, p.L346F, p.D351E, p.R438H, p.P447T, p.P453L, p.P453T y p.F459C. Dichas mutaciones se localizan en regiones con un alto grado de conservación evolutiva. Se realizaron análisis estructurales y fisicoquímicos a partir de las propiedades diferenciales de los aminoácidos utilizando el programa DeepView (Swiss-PdbViewer versión 4.0.1) en base a la estructura cristalográfica del LBD de la isoforma B1 del receptor de T₃ humano (Protein Data Bank: archivo 3GWS.pdb). Nuestros resultados sugieren que las mutaciones p.P447T, p.P453L y p.D351E producen variaciones en las superficies moleculares; p.N331D, p.D351E p.R438H y p.P447T producen una alteración en la distribución de cargas, finalmente p.L346F, p.D351E p.R438H y p.P447T generan la formación o pérdida de enlaces intramoleculares. En conclusión este análisis va a ser de suma utilidad para relacionar las alteraciones de secuencia con los mecanismos fisiopatológicos de la resistencia a hormonas tiroideas.

GASTROENTEROLOGIA 2

535 (12) ULCERA ANTRAL GASTRICA INDUCIDA POR NAPROXENO, PREVENCIÓN CON ESOMEPRAZOL Y AGRAVACIÓN CON INDOMETACINA, EN RATAS. Laudanno O.¹; Bedini O.²; San Miguel P.³; Cesolari J.⁴; Villarruel R.⁵

Facultad de Medicina^{1 2 3 4 5} <olaudanno@hotmail.com>

Se postuló al antiinflamatorio no esteroide Naproxeno (NA), inhibidor no selectivo COX.1 y COX.2, como inductor de ulcera antral gástrica, dado por vía oral, a diferencia del método de Satoh donde la Indometacina (INDO) fue dada SC y después de una comida sólida (CS). El objetivo fue estudiar si NA dado SC después de una CS o por vía orogástrica (OG), provoca ulcera antral gástrica, así como su prevención con ESOMEPRAZOL (ESO) y su agravación con INDO. Grupos random de ratas Wistar (n=7 c/ grupo), 200g, ayunas 24 hs excepto agua ad libitum, se realizaron los experimentos: 1) CS 2hs, INDO 30 mg/kg SC y sigue CS 24 hs (testigo). 2) CS.2hs NA 80 mg/kg SC y CS 24hs, 3) NA. 50, 80 y 100 mg/Kg OG c/12 hs 5 días (testigo). 4) NA. 80 mg/kg OG c/12 hs 5 días simultaneo ESO 5 mg/kg SC. 5) NA. OG c/12 hs 5 días mas Indo 10 mg/kg SC c/12 hs 5 días. Todas las ratas fueron sacrificadas con sobredosis de éter, se realizó laparotomía, gastrectomía total, su apertura por curvatura mayor, tabulación del área ulcerosa antral gástrica por planimetría y posterior histología (HE). Se calculó la "t" de Student y el ANOVA (Kruskal Wallis). El % área ulcerosa antral gástrica dio: 1) 25 ± 7. 2) 1 ± 0.1 (p < 0.001). 3) 12.5 ± 5. Dosis de 80 mg/KG todas dieron ulcera, con 100 mg 50% óbitos. 4) 1 ± 0.1 (p < 0.001). 5) 25 ± 6 (< 0.01). La microscopia mostro en los grupos 1.3 y 5 úlceras en antro gástrico. Conclusiones: Naproxeno dado 80 mg/kg OG c/12 hs y al 3° día, dio electivamente ulcera antral gástrica, que fue prevenida con ESOMEPRAZOL y agravada con Indometacina, siendo un nuevo modelo experimental.

536 (251) GALECTINA-1 COMO MODULADOR DEL PROCESO DE POLARIZACIÓN DE MEMBRANAS DE CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA HUMANO. Espelt M.¹; Manzi M.²; Carabias P.³; Eliola M.⁴; Rabinovich G.⁵; Wolfenstein De Todel C.⁶; Troncoso M.⁷

IQUIFIB^{1 2 3 4}; *IBYME*⁵; *IQUIFIB*^{6 7} <vicespelt@yahoo.com.ar>

La galectina-1 (Gal-1), es una proteína con afinidad por α -galactósidos, cuya participación en la función y fisiopatología del hígado es un tema de estudio aún poco explorado. En el presente trabajo se estudió el efecto de Gal-1 sobre la polarización de células de carcinoma hepatocelular humano, HepG2, ya que adquieren el fenotipo polarizado desarrollando canaliculos biliares (CB) entre células vecinas. Los CB se visualizaron por microscopia de fluorescencia utilizando faloidina-TRITC. El número de células se estimó utilizando el colorante nuclear Hoechst. La polarización se estimó como CB/100 células. Las células fueron incubadas con Gal-1 (7 μ M) o en medio control. A las 24h no se observaron diferencias significativas en la polarización de las células tratadas (9 ± 0) con respecto al control (5 ± 2). A las 48h, la Gal-1 aumentó la polarización (15 ± 1, p < 0.05) con respecto al control (9 ± 1). La preincubación de Gal-1 con tiogalactósido (10mM) previno el aumento de la polarización (10 ± 3). Cuando se evaluó dicha polarización en presencia de wortmanina (1 μ M) y PD98059 (25 μ M), inhibidores de PI3K y MEK, respectivamente, ambos previnieron el aumento de la polarización inducida por Gal-1 (7 ± 3 y 6 ± 3, respectivamente). Mediante inmunofluorescencia se identificaron proteínas marcadoras de membrana apical: MDR1 y MRP2. Ambas proteínas, involucradas en el transporte canalicular, tuvieron la misma localización en células control y en tratadas con Gal-1. Tampoco hubo diferencias al incubarlas con 5-clorometilfluoresceína diacetato: en ambos casos el fluoróforo fue captado, metabolizado y secretado a los CB vía MRP2 demostrando que la Gal-1 no interfiere con su polarización. Estos resultados demuestran que Gal-1 acelera la polarización de células HepG2 en forma dependiente del dominio de reconocimiento de carbohidratos, vía PI3K/Akt y/o MEK/ERK1/2, sin interferir con la estructura ni la integridad funcional canalicular, sugiriendo un posible rol en la diferenciación hepática.

537 (258) EFECTO DEL ATP EXTRACELULAR EN CELULAS DE HEPATOMA HUMANO. Espelt M.¹; Sanchez Alberti G.²; De Tezanos Pinto F.³; Schwarzbaum P.⁴

IQUIFIB^{1 2 3 4} <vicespelt@yahoo.com.ar>

El ATP extracelular cumple un papel importante en la cascada de señalización celular, pero los mecanismos que contribuyen a la acumulación extracelular del nucleótido son poco conocidos. En células animales distintos estímulos generan la liberación no lítica de ATP al medio extracelular, generando en algunos casos un aumento en la concentración de Ca^{2+} . El objetivo del trabajo es estudiar la cinética de ATPe y de Ca^{2+} de células de hepatoma humano (HepG2). Se utilizaron dos estímulos: la deformación de la membrana plasmática (por medio de agitación) y la incubación con distintas concentraciones de ATP exógeno (ATPe). El ATPe se cuantificó de manera continua utilizando la técnica de luciferina-luciferasa. La agitación indujo un aumento de ATPe hasta un máximo (78.7 ± 28.85 nM, n=7) seguido de una caída exponencial hacia valores control. Una cinética similar se observó en presencia de distintas concentraciones de ATP exógeno, donde concentraciones de 50, 100 y 200 nM generaron máximos de 43.1 ± 3.05 nM (n=6), 135.0 ± 19.25 nM (n=7) y 269.0 ± 26.78 nM (n=7), respectivamente. Es decir que el ATP máximo representa un 86.2% (50 nM), 135% (100 nM) y 134.5% (200 nM) de la concentración de ATP exógena agregada. Utilizando microscopia de fluorescencia para determinar Ca^{2+} se registró el porcentaje de células que presentaron al menos un pico (frecuencia de spikes). Observamos que la frecuencia de spikes aumenta hiperbólicamente con la concentración de ATP exógeno, con una $K_{0.5}$ = 3.8 μ M. En ausencia de estimulación mecánica, la frecuencia fue de 12 ± 3 %, mientras que luego de la agitación aumentó a 21 ± 4% (n=6, p < 0.05). De los resultados se concluye que en células HepG2 tanto el ATP exógeno como la agitación mecánica promueven la liberación no lítica de ATP y el aumento de la frecuencia de spikes. Es decir ATPe y Ca^{2+} podrían formar parte de un bucle donde ATPe podría activar la señalización por Ca^{2+} , y esta activación llevar a un aumento del eflujo de ATP.

538 (324) EL BLOQUEO DE RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II (AT1R) REDUCE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE LOS HEPATOCITOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATOSIS HEPÁTICA INDUCIDO POR DIETA RICA EN GRASA. Rosselli M.¹; Burgueño A.²; Carabelli J.³; Pirola C.⁴; Sookoian S.⁵

Instituto de Investigación Médica A. Lanari (IDIM) CONICET^{1 2 3 4 5} <soleros@ yahoo.com.ar>

La enfermedad grasa del hígado de etiología no alcohólica (NAFLD) representa el componente hepático del síndrome metabólico (SM). Evidencias previas mostraron que los niveles circulantes del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) se encuentran elevados en individuos obesos, probablemente debido a la presencia de la NAFLD. EL HGF presenta propiedades angiogénicas y mitogénicas, y sus niveles plasmáticos son un indicador de severidad en la hipertensión arterial. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de losartan-L [bloqueante del AT1R], y telmisartan-T [bloqueante del ATR1 y agonista PPAR α] sobre la expresión hepática del mRNA del HGF en un modelo experimental de NAFLD inducido por dieta rica en grasa (DG). Se utilizaron ratas Sprague-Dawley las que fueron sometidas a DG y luego de 8 semanas recibieron L (n=9) y T (n=10), 10 mg/Kg/día intraperitoneal, durante 12 semanas. Se incluyeron 8 ratas con DG y 6 ratas con dieta estándar (C) durante los mismos periodos de estudio. La expresión hepática se evaluó mediante PCR en tiempo real y se relativizó con beta actina. Resultados: los niveles plasmáticos de ALT (UI/L) fueron significativamente más bajos en los grupos L 28 ± 3 (p < 0.009) y T 29 ± 2 (p < 0.01) en comparación con DG 39 ± 3. Ambas drogas disminuyeron significativamente la presión arterial en 37 mmHg, revirtieron la degeneración grasa hepatocitaria y disminuyeron significativamente los niveles de triglicéridos hepáticos. El tratamiento con ambos bloqueantes del AT1R disminuyó en un 36% (en comparación con el grupo DG) los niveles hepáticos del mRNA del HGF (p < 0.04); la expresión en el grupo C fue 6.6 ± 0.7, en el grupo DG 8.5 ± 0.7, en el grupo L 5.4 ± 0.7 y el grupo T 5.6 ± 0.8, media \pm ES, relación x1000. En conclusión, los bloqueantes del AT1R modulan la expresión hepática de genes con importante impacto en la fisiopatología del SM y

el daño cardiovascular, además de ser eficaces en la reversión de la NAFLD.

539 (355) ACUAPORINA 4 EN RATAS CON ENCEFALOPATIA HEPATICA MINIMA. Tallis S.¹; Majowicz M.²; Delfante A.³; Rosello D.⁴; Souto P.⁵; Albertoni Borghese M.⁶; Vidal N.⁷; Perazzo J.⁸

Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA¹; Biología Celular e Histología Departamento de Ciencias Biológicas Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA²; Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{3 4 5}; Biología Celular e Histología Departamento de Ciencias Biológicas Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{6 7}; Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA⁸ <stallis@ffy.uba.ar>

Introducción. La Encefalopatía Hepática Mínima (EHM) es una de las principales manifestaciones de la Insuficiencia Hepática. La Hipertensión Portal Prehepática (HPP) en ratas es considerado un modelo de EHM. En éste se observan moderada hiperamonemia, alteración de la integridad de la Barrera Hematoencefálica (BHE) con edema en astrocitos y mitocondrias. Se ha demostrado que la Acuaporina 4 (AQP4) se expresa en Sistema Nervioso Central (SNC), principalmente en astrocitos. El objetivo de este trabajo fue el estudio de la expresión de la AQP4 y de la integridad de la BHE en el modelo de EHM. **Materiales y Métodos.** Ratas Wistar machos, adultas fueron divididas en dos grupos. Al grupo EHM (n=10) se le indujo HPP por la estrechez reglada de la vena porta mientras que al grupo control (n=10) se le realizó operación simulada. A los 14 días de la cirugía se sacrificaron los animales y se extrajo cerebro, se aisló corteza prefrontal y se homogeneizó. Se midió la concentración de proteínas según Bradford. Las mismas fueron separadas electroforéticamente y transferidas a membranas de PVDF para detectar AQP4 por Western Blot. Las membranas se revelaron utilizando el sistema avidina-biotina-peroxidasa. Los inmunoblots se cuantificaron analizando la DO de las bandas mediante el programa GELPRO analyzer 3.1. Los resultados se expresaron como porcentajes del valor control, tomando el promedio de la DO de los controles como 100%. Se evaluó la integridad de la BHE con Trypan Blue según el método de Marmorou y secciones del tejido cerebral fueron procesados para microscopía electrónica (ME). **Resultados.**

	AQP4	Alteración en Integridad BHE	Edema
EHM	70.95± 6.93 [†] *	+	+
Control	100 ± 7.17 [†]	-	-

*p < 0,05

[†]Media ± SEM

Conclusiones. Las alteraciones de la morfología y funcionalidad de la BHE podrían estar relacionadas con las alteraciones de la expresión de la AQP4.

540 (365) DISFUNCION MITOCONDRIAL Y MANGANESO EN HIPOCAMPO EN HIPERTENSION PORTAL EXPERIMENTAL. Tallis S.¹; Delfante A.²; Bustamante J.³; Lores-arnaiz S.⁴; Souto P.⁵; Coll C.⁶; Prestifilippo J.⁷; Perazzo J.⁸

Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2}; Laboratorio de Radicales Libres en Biología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{3 4}; Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{5 6 7 8} <stallis@ffy.uba.ar>

Introducción. La Hipertensión Portal (HP) es una de las principales complicaciones de la cirrosis hepática. La enfermedad he-

pática crónica produce un incremento de toxinas tales como el amonio (NH₄⁺) y manganeso (Mn) ambas asociadas a la Encefalopatía Hepática (HE). El incremento de Mn en el Sistema Nervioso Central se relaciona con disfunciones mitocondriales y astrocitarias. El modelo de HP Prehepática (HPP) presenta EH Mínima (EHM) con hiperamonemia e incremento del estrés oxidativo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la concentración de Mn en hipocampo y plasma, la funcionalidad mitocondrial a través del potencial de membrana (Dy_m) y swelling, ambos componentes de la Permeabilidad Transitoria Mitocondrial (MPT) en ratas con HPP. **Materiales y Métodos.** Ratas Wistar machos, adultas fueron divididas en dos grupos (n=12), HPP por ligadura parcial de la vena porta y el grupo control con operación simulada. A los 14 días de la cirugía se sacrificaron los animales y se aisló hipocampo. Se determinaron los niveles de Mn por absorción atómica en hipocampo y plasma. La amonemia se determinó utilizando el método enzimático. El Dy_m se midió a través de citometría de flujo utilizando la sonda potenciométrica DIOC6 y el swelling mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y espectrofotometría por disminución de absorbancia a 540 nm expresado como DA_{540 nm}/min.mg proteína. **Resultados:**

	Mn Hipocampo (ppm)	Mn plasma (ppm/ml)	NH ₄ ⁺ plasma (µM)
SHAM	0.52 ± 0.07	0.48 ± 0.04	26 ± 4
HPP	0.76 ± 0.04	0.67 ± 0.06	82 ± 17

p<0.05. Los resultados se expresan como MEDIA ± ESM

El Dy_m en ratas con HPP fue un 28% menor y la cuantificación del swelling espontáneo mostró un incremento del 60%, respecto al grupo SHAM. **Conclusiones:** Se demostró que en hipocampo de ratas con HPP la funcionalidad mitocondrial está alterada con evidencia de swelling y disminución del Dy_m. Asimismo, un aumento en los niveles de Mn.

541 (366) CAMBIOS EN CÉLULAS ENDOTELIALES ESOFÁGICAS EN PACIENTES CON GASTROPATÍA HIPERTENSIVA. Delfante A.¹; Tallis S.²; Lago N.³; Romay S.⁴; Eizayaga F.⁵; Brodersen C.⁶; Lemberg A.⁷; Perazzo J.⁸

Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2}; Laboratorio de Patología Experimental Facultad de Medicina UBA³; Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{4 5}; Unidad de Gastroenterología Hospital Durand Buenos Aires⁶; Laboratorio de Hipertensión Portal Catedra de Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{7 8} <adelfante@ffy.uba.ar>

La patología hepática crónica se asocia frecuentemente con el síndrome de hipertensión portal. Este se puede acompañar por hemorragias y ruptura de las varices esofágicas. Los pacientes cirróticos con hipertensión portal pueden desarrollar además gastropatía hipertensiva (GH). El propósito fue estudiar la morfología de la microvasculatura esofágica por hipertensión portal en pacientes con cirrosis hepática. **Pacientes cirróticos** (n=9, 50 años de media) de etiología alcohólica y **pacientes** (n=9, 58 años de media) con indicación de endoscopia esofagagástrica no cirróticos formaron parte del estudio, realizado en la Unidad de Gastroenterología, Hospital Durand, Buenos Aires. Los pacientes se evaluaron clínica, bioquímicamente y con serología para hepatitis A, B y C, Herpes Simplex, Citomegalovirus, Epstein Barr y VIH. Se les realizó esofagoscopía con videoendoscopio Fujinon EG 200 HR o EG 200 CT, con procesador EPX 201 o Pentax EG 2940 con a EPM 330 P. Las biopsias se realizaron con equipo Kw 24s 5s CE 0197. Las muestras tomadas 2 o 3 cm por encima de las vrices se procesaron para microscopía óptica y para microscopía óptica de alta resolución (MOAR).

Clasificación de Child-Pugh (Lacey modif.)	-	A	B
GH	No	Sí	Sí
Ascitis	No	No	Sí
MOAR	2.23 ± 0.06	4.88 ± 0.11*	5.77 ± 0.12*
Capilares: nº/campo			
Capilares: área/campo	489.26 ± 14.44		
Capilares en formación	0	2+	4+
Vacuolas Citosólicas	0	2+	4+
Necrosis Focal	0	0	2+
Trombosis capilar	0	0	2+

Test de ANOVA, * p<0.001 vs. C; * vs. Child-Pugh B.

Las alteraciones de los capilares y de las células endoteliales esofágicas en la gastropatía hipertensiva tienen diferencias significativas entre los grados A y B.

542 (397) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE TETRACLORURO DE CARBONO (TC) SOBRE LA EXPRESIÓN DE MICROARNs HEPÁTICOS EN LA RATA. Perdomo V.¹; Lardizábal M.²; Nocito A.³; Daniele S.⁴; Palatnik J.⁵; Veggi L.⁶

IFISE (CONICET-UNR)¹ 2; Fac. Ciencias Médicas (UNR)³; Fac. Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR)⁴ ; IBR (CONICET-UNR)⁵; IFISE (CONICET-UNR)⁶ <virginiagperdomo@yahoo.com.ar>

La hepatotoxicidad por TC es un modelo clásico en rata. Los microARNs (miRs) son ARNs no codificantes (20-23 nt) que regulan negativamente la expresión génica, se expresan como transcritos primarios de ARN (pri-miRs), y procesan por nucleasas, hasta su forma madura. Los miRs regulan procesos de crecimiento, diferenciación y muerte celular. El miR-122 es específico y mayoritario en hígado, y disminuye su expresión en carcinoma hepatocelular. El miR-192 participa en la regulación de la progresión del ciclo celular y disminuye su expresión en cáncer primarios. Nuestro objetivo fue evaluar los efectos de la administración aguda de TC sobre la expresión de estos miRs. Ratas macho Wistar adultas fueron inyectadas i.p. con TC (0,1; 0,5 y 1,0 mL/kg rata, n=2-4) y aceite de maíz (vehículo TC, n=2) y sacrificadas a las 24 hs. Se extrajeron muestras de suero para el dosaje de enzimas (ALT, AST, ALP y LDH), y tejido hepático para estudios histológicos (hematoxilina-eosina) y purificaciones de ARN total, midiéndose los niveles de miR-122, miR-192 y sus precursores (qRT-PCR), expresados en unidades arbitrarias relativas al control (UARC). Los resultados se muestran como promedio±SD (*p<0,05 por ANOVA).

	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	ALP (U/L)	miR-122 (UARC)	Pri-miR-122 (UARC)	miR-192 (UARC)	Pri-miR-192 (UARC)
control	32±5	95±3	1859±18	319±32	1,00±0,19	1,00±0,11	1,00±0,21	1,00±0,20
TC 0,1 mL/kg rata	62±7	147±10	2557±137	241±32	0,99±0,16	1,07±0,10	0,99±0,15	0,91±0,16
TC 0,5 mL/kg rata	676±10	932±45	*4861±133	421±45	1,04±0,16	1,26±0,15	1,09±0,20	1,00±0,24
TC 1,0 mL/kg rata	*1361±55	*2294±439	3982±502	398±29	*0,51±0,17	*0,57±0,14	0,77±0,13	0,77±0,17

Se observó necrosis hepatocitaria con vacuolización citoplasmática en las ratas tratadas con TC, junto a un aumento de los marcadores séricos de daño hepático. La mayor dosis de TC estudiada, mostró una disminución de la expresión de miR-122, en parte debido a una alteración en la síntesis de su precursor pri-miR-122. La expresión del miR-192 y su precursor no se vio alterada.

543 (402) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE CLOROFORMO (CF) SOBRE LA EXPRESIÓN DE MICROARNs HEPÁTICOS EN LA RATA. Lardizábal M.¹; Perdomo V.²; Nocito A.³; Daniele S.⁴; Palatnik J.⁵; Veggi L.⁶

IFISE (CONICET-UNR)¹ 2; Fac. Ciencias Médicas (UNR)³; Fac. Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR)⁴; IBR (CONICET-UNR)⁵; IFISE (CONICET-UNR)⁶ <mlnardizabal@yahoo.com.ar>

El CF es un hepatotóxico reconocido utilizado como modelo en rata. Los microARNs (miRs, 20-23 nt) son reguladores negativos de la expresión génica que se sintetizan como precursores largos de ARN (pri-miR) y tienen funciones regulatorias en la proliferación y muerte celular. El miR-122 es específico y mayoritario del hígado, conocido por su rol en el metabolismo de lípidos, mientras que el miR-192 participa en la regulación de ciclo celular. Alteraciones en la expresión de ambos miRs están asociadas a diferentes cánceres humanos. El objetivo fue evaluar los efectos de la administración aguda de CF sobre los mencionados miRs. Se inyectaron ratas macho Wistar adultas con CF (i.p., 0,6 0,8 1,0 mL/kg rata n=2-4) y aceite de maíz (vehículo CF, i.p., n=2) siendo sacrificadas a las 24 hs. Se extrajeron muestras de suero para mediciones enzimáticas séricas (ALT, AST, LDH y ALP) y de tejido hepático para estudios anatómo-patológicos. Se purificó ARN total de hígado y se midieron los niveles de miR-122, miR-192 y sus precursores por RT-qPCR, expresándose en unidades arbitrarias relativas al control (UARC). Los resultados se muestran como promedio±SD (*p<0,05 por ANOVA).

	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)	ALP (U/L)	miR-122 (UARC)	Pri-miR-122 (UARC)	miR-192 (UARC)	Pri-miR-192 (UARC)
Control	15±10	79±18	2530±64	363±29	1,00±0,11	1,00±0,10	1,00±0,10	1,00±0,16
CF 0,6 mL/kg rata	79±18	599±37	2374±72	350±36	0,93±0,10	0,83±0,11	1,20±0,12	0,83±0,15
CF 0,8 mL/kg rata	121±13	529±101	2550±113	323±31	0,97±0,12	0,74±0,08	1,10±0,07	0,91±0,15
CF 1,0 mL/kg rata	281±13*	1336±91*	5043±137*	353±15	0,55±0,11*	0,43±0,10*	0,93±0,09	0,69±0,13

Se observaron en las ratas tratadas con CF diferentes grados necrosis hepatocitaria con vacuolización citoplasmática, junto con un aumento de las actividades de las enzimas medidas. Se observó en la mayor dosis de CF una disminución de la expresión de miR-122, en parte debida a una alteración de la expresión de su precursor pri-miR-122. Por otro lado, no se observó modificación de la expresión del miR-192.

544 (439) PROTEINA ASOCIADA A LA PANCREATITIS, ELASTASA PANCREÁTICA Y PROTEINA C REACTIVA EN PACIENTES CON PANCREATITIS AGUDA. ESTUDIO PRELIMINAR. Di Carlo M.¹; Lopez Mingorance F.²; Fritz V.³; Serra C.⁴; Pandolfo M.⁵; Maselli M.⁶; Waldbaun C.⁷; Sorda J.⁸; Negri G.⁹

Dpto Bioquímica clínica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA¹ 2; Servicio de Gastroenterología-Hospital de Clínicas³; Dpto Bioquímica clínica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA⁴ 5 6; Servicio de Gastroenterología-Hospital de Clínicas⁷ 8; Dpto Bioquímica clínica-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA⁹ <dicarlo@ffyba.uba.ar>

La pancreatitis aguda, proceso inflamatorio agudo del páncreas de fisiopatología compleja aún en estudio. Enfermedad autodigestiva, principalmente de etiología biliar, con activación enzimática prematura y retención de las mismas en células acinares. Esto induce liberación de citoquinas que estimulan la síntesis de proteína C reactiva (PCR). Amilasa (Ami) y lipasa (Lip): marcadores bioquímicos más comunes para su diagnóstico, que junto a glucemia (Glu) e insulinemia (Ins) permiten un estudio global de la glandula pancreática. Proteína asociada a la pancreatitis (PAP), secretada por el páncreas sólo por estrés. Elastasa pancreática (Ela-1), isoenzima de síntesis pancreática, utilizada como medida indirecta de funcionalidad pancreática exocrina. Objetivo estudiar el comportamiento de los marcadores bioquímicos Ami, Lip, Glu, Ins, Ela-1, PAP y PCR en pacientes con pancreatitis aguda biliar. Se estudiaron 20 pacientes: controles (C-n=10; 59±13 años, 2hombres/8mujeres) y pancreatitis aguda biliar, 24-48 Hs de evolución (PA-n=10; 70±16 años, 2hombres/8mujeres). Se les solicitó su consentimiento, avalado por Comité de Ética-FFyB-UBA. A todos se les determinó en suero: Ami, Lip, Glu y PCR (métodos recomendados automatizados-Roche), Ins (Enzimonioensayo-Abbott) y PAP (Enzimonioensayo-Dynabio); y en materia fecal: Ela-1 (Enzimonioensayo-Bioserv). Resultados: como media ± desvío estandar

Parámetro	C (n=10)	PA (n=10)	P
Ami (UI/L)	84±42	485±336	<0.05
Lip (UI/L)	71±34	2581±2550	<0.05
Glu (mg/dl)	90±11	100±30	ns
Ins (mUI/ml)	8.5±4.4	10.1±7.4	ns
PAP (ng/ml)	10±2	110±64	<0.05
Ela-1 (mg/g)	601±162	239±149	<0.05
PCR (mg/l)	0.7±0.6	30.4±9.7	<0.05

Conclusiones: Se observó en los pacientes con PA aumentos significativos de Ami, Lip, PAP y PCR; una disminución significativa en Ela-1; y correlación significativa ($r=0.7612$; $IC:0.0189-0.9265$) entre PAP y Ela-1. Estos resultados podrían relacionarse con los cambios anatómicos del páncreas y la etiología de la PA, aportando una herramienta bioquímica al diagnóstico clínico.

545 (517) REGULACIÓN DE TRANSPORTADORES APICALES POR ESPIRONOLACTONA (E) EN LA LÍNEA CELULAR HEPG2. PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE PREGNANOS X (PXR). Rigalli J.¹; Ruiz M.²; Villanueva S.³; Arias A.⁴; Pellegrino J.⁵; Mottino A.⁶; Catania V.⁷

Instituto de Fisiología Experimental - CONICET^{1 2 3 4 5 6 7}
<jrigalli@gmail.com>

El receptor nuclear PXR heterodimeriza con el receptor de retinoides X (RXR α) y media el efecto inductor de E sobre enzimas hepáticas de biotransformación. Los metabolitos de estos sistemas enzimáticos son excretados al canalículo biliar por proteínas transportadoras tales como MRP2, Pgp y BCRP. Se ha sugerido una regulación coordinada de los sistemas enzimáticos y las proteínas transportadoras. Nos propusimos evaluar el efecto de E sobre la expresión de transportadores apicales en la línea celular HepG2 derivada de hepatoma humano y la participación de PXR. Inicialmente, se trabajó con cultivo de células HepG2 wild-type y se evaluó el efecto de distintas concentraciones de E (0,5; 5 y 50 μ M) o su vehículo (C) por 48 hs sobre la expresión de los transportadores apicales (por western blotting). A la máxima concentración de E, los resultados (C vs E 50 μ M), (unidades arbitrarias, media \pm DE, n = 3, *p<0,05) fueron: MRP2 (138 \pm 30 vs 183 \pm 21), Pgp (568 \pm 109 vs 878 \pm 155*) y BCRP (197 \pm 28 vs 369 \pm 46*). Además, se evaluó la expresión de PXR y RXR α (por western blotting). Al comprobar que los niveles de PXR eran apenas detectables, se decidió transfectar con el plásmido pSG5-hPXR para lograr sobreexpresar dicho receptor. Las células transfectadas se expusieron a las mismas concentraciones de E o vehículo. A la máxima concentración de E observamos: MRP2 (204 \pm 25 vs 360 \pm 56*), Pgp (263 \pm 76 vs 621 \pm 12*) y BCRP (233 \pm 16 vs 380 \pm 39*). Conclusión: la inducción de MRP2 por E requiere la presencia de PXR. Los bajos niveles basales de PXR son suficientes para que E aumente la expresión de Pgp; sin embargo, la sobreexpresión del receptor aumenta la respuesta al esteroide. La inducción de BCRP por E parece ser independiente de PXR. La activación de PXR por E produce una respuesta diferencial sobre los transportadores estudiados, afectando en forma selectiva la excreción de endo- o xenobióticos.

546 (528) IDENTIFICACIÓN, CLONADO Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA PROMOTORA DE VMP1, GEN DE AUTOFAGIA CARACTERIZADO EN CÉLULA ACINAR DURANTE LA PANCREATITIS. Lo Ré A.¹; Molejón M.²; Pardo R.³; Ropolo A.⁴; Vaccaro M.⁵

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5} <andrealr82@hotmail.com>

El gen vmp1 codifica una proteína transmembrana que se expresa tempranamente en la célula acinar durante la pancreatitis y gatilla la autofagia. Nuestros objetivos fueron analizar por bioinformática al gen vmp1, identificar, clonar y evaluar experimentalmente su región promotora y buscar secuencias consenso para factores de transcripción involucrados en autofagia. Utilizamos la base de datos *Ensembl* y el programa *MatInspector*. Los resultados indicaron que el gen vmp1, de 133kb, se ubica en la posi-

ción 55,139,811-55,273,235 del cromosoma 17 del genoma humano y origina un transcripto de 2509pb que codifica la proteína de 406 aa VMP1. El transcripto conocido tiene 12 exones con el codón inicio en posición 22 del exón 2. Usando una secuencia de 2000pb *upstream* del gen se obtuvieron 4 posibles regiones promotoras. Entre ellas una de 617pb en la posición 55,139,295-55,139,911 del cromosoma 17 con dos potenciales sitios de inicio para la transcripción de 12 exones. Con los programas *MatInspector*, *TF-Search*, *P-match* y *Alibaba 2.1* se identificaron posibles sitios para factores de transcripción relacionados a la respuesta a estrés celular (NFKB, CHOP-C, p300, etc.) y en particular a la autofagia (E2F). Evaluamos la actividad promotora en ensayos con el gen reportero luciferasa en células de mamífero. gDNA de células HeLa se usó para amplificar un fragmento de 1977pb *upstream* del gen vmp1 que se clonó en el plásmido reportero pGL3 Basic. Se transfectaron células HeLa con el plásmido pGL3-1977 y se sometieron a ayuno o tratamiento con rapamicina, ambos estímulos inductores de autofagia. Medimos actividad de luciferasa normalizando los valores por actividad de B-gal en las mismas muestras. Los resultados mostraron aumento (p<0.001) de actividad respecto de los controles. Concluimos que las predicciones se corresponden con los datos experimentales, la secuencia clonada posee una efectiva acción promotora del gen vmp1 y su expresión es regulada por estímulos autofágicos.

547 (710) EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS C DEPENDIENTES DE CALCIO (CPKC) SOBRE LA LOCALIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR CANALICULAR MRP2 EN CÉLULAS HEPG2. Arias A.¹; Jungsuwadee P.²; Mary V.³; Mottino A.⁴

Instituto de Fisiología Experimental (CONICET-UNR)¹; Graduate Center for Toxicology (University of Kentucky)²; Instituto de Fisiología Experimental (CONICET-UNR)⁴
<arias@ifise-conicet.gov.ar>

En animales de laboratorio se ha observado que la activación de cPKCs, incluyendo la isoforma PKC α , es en parte responsable de la colestasis generada por metabolitos endógenos de estrógenos como el 17-glucuronido de estradiol. El mecanismo involucra la internalización del transportador canalicular de aniones orgánicos Mrp2, con consecuente pérdida de actividad. Se desconoce el efecto sobre MRP2 de origen humano. En este trabajo se indujo la activación selectiva de cPKCs por timeleatoxina (TTX) en la línea celular HepG2. Se trataron células con TTX 100 nM o su solvente (C) durante 1, 4 ó 15 hs, y se evaluó la localización de MRP2 y de la proteína de uniones estrechas Ocludina por microscopía de fluorescencia confocal. Su expresión, así como la de PKC α y PKC α fosforilada, se evaluó por western blotting de lisado celular total. Se observó internalización de MRP2 y afectación de uniones estrechas a todos los tiempos estudiados, fenómenos que fueron bloqueados parcialmente por el agregado de 1 μ M de G66976 (inhibidor de cPKCs). La expresión total de MRP2, Ocludina y PKC α fosforilada no se modificó, mientras que la de PKC α se afectó después de 1 h (-15%) y 15 hs (+31%) de tratamiento con TTX (p<0.05, n=3). Para identificar posibles blancos de fosforilación se realizó el mismo tratamiento con TTX en presencia de [³²P]ortofosfato durante 30 min, y se evaluaron los niveles de fosforilación de MRP2 y Ocludina, así como de MARCKS, sustrato modelo de cPKC, utilizado como control positivo. El grado de fosforilación se evaluó por inmunoprecipitación seguido de electroforesis en SDS-PAGE y análisis autoradiográfico. El estudio mostró un aumento en el grado de fosforilación de MRP2 y de MARCKS en TTX respecto de C, sin cambios para Ocludina. Estos resultados demuestran que la activación de cPKCs produce internalización de MRP2 en la línea celular HepG2 y que cambios en su grado de fosforilación podrían estar involucrados.

548 (786) MODULACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE AGUA EN COLON HUMANO POR UNA MUTANTE DE ESCHERICHIA COLI O157:H7 QUE CARECE DEL GEN STX2. Gerhardt E.¹; Zotta E.²; Moreira A.³; Ibarra C.⁴

Laboratorio de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA^{1 2}; División de Cirugía Gastroenterológica, Hospital de Clínicas, UBA³; Laboratorio de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA⁴ <elizabeth.fmed@gmail.com>

Escherichia coli productora de toxina Shiga (STEC) es un patógeno entérico de alta virulencia que puede causar diarrea acuosa o sanguinolenta, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es la principal causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años. El serotipo O157:H7 es prevalente y se adquiere por ingestión de comida o agua contaminada. En este trabajo se evaluó el efecto de la cepa salvaje *E. coli* O157: H7 438/99 y de una cepa "stx2 de *E. coli* O157:H7. Los fragmentos de colon se obtuvieron de operaciones quirúrgicas realizadas en el Hospital de Clínicas. Los fragmentos de colon se trasladaron al laboratorio en una solución Ringer-alto K⁺ a 4°C para preservar las funciones de transporte. La mucosa colónica se montó como un diafragma en una cámara de Ussing (1.76 cm²). La cara mucosa y serosa se bañó con solución Ringer estandar a 37°C y se burbujeó con 95%O₂-5%CO₂. El flujo neto abortivo de agua (Jw) y la corriente de cortocircuito (Isc) se registraron simultáneamente mediante un dispositivo experimental puesto a punto en el laboratorio. Cuando ambos parámetros se estabilizaron (Jw=0,198±0,017 µl/min.cm²; Isc=19,8±6,1 µA/cm²), el lado mucoso del tejido se incubó durante 90 min con 200 µl de la cepa salvaje o de la cepa mutada. En ambas cepas se observó una inhibición del Jw concomitante con un aumento de Isc dependiente del tiempo de incubación. El efecto inhibitorio sobre Jw fue más importante cuando el tejido se incubó con la cepa mutada (96%) que con la cepa salvaje (76%). Una alícuota de 200 µl de sobrenadante de cultivo de la cepa salvaje pero no de la cepa mutada inhibió significativamente el Jw luego de 90 min de incubación y produjo destrucción del epitelio colónico. En consecuencia, es posible concluir que el menor efecto inhibitorio de Jw observado en la cepa salvaje que expresa Stx2 se podría deber a la pérdida de la capacidad secretoria de la barrera intestinal por destrucción de los enterocitos.

548 b (56) EFECTOS DE LOS GASES BIOACTIVOS EN LA PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE HÍGADOS DE RATA. C L Balaban 1, J Rodriguez 2, B Fuller 3, B Mann 4, R Motterlini 5, E Guibert 2

¹Biología Molecular, Dto. Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR. ²CAIC: Centro Binacional (Argentina-Italia) de Criobiología Aplicada. Suipacha 531 (2000) Rosario. ³University Department of Surgery and Liver Transplant Unit, Royal Free & UCL Medical School, UK. ⁴Department of Chemistry, University of Sheffield, UK. ⁵Department of Drug Discovery and Development. Italian Institute of Technology. Genova – Italy. <ceciliabalaban@gmail.com>

La interrupción del flujo sanguíneo durante el almacenamiento en frío de un órgano y su posterior restauración con el trasplante, generan injurias por isquemia fría/reperusión (I/R). Para minimizar estas injurias se propuso incorporar una molécula liberadora de monóxido de carbono (CORM-3/50µM) y una de óxido nítrico (Nitroprusiato de Na/500µM) a la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin (UW) dado que estos gases fomentan la citoprotección en situaciones de estrés. La reperusión ex vivo de hígados de ratas Wistar permitió analizar la hemodinamia, función e integridad de éstos luego de 48 h de preservación en frío (4°C) en UW suplementada con CO, NO ó ambos. Transcurridos 90 min de perfusión, la resistencia intrahepática (mmHg.min.g hig/mL) para los hígados preservados en UW+CO (13.37±1.05) y en UW+NO (11,92±1.69) fue estadísticamente inferior (P<0.05) a la del grupo control preservado en UW (17,29±7,81), lo cual no ocurrió para el grupo preservado en presencia de ambos gases (14,53±5,04). El dador de CO produjo un incremento en la producción de bilis (µL/min.g hig) entre los 45-60 min de perfusión (0.24±0.07) en comparación con

el grupo UW control (0,07±0,08) en el mismo período (P<0.05), no así, el grupo UW+CO&NO (0,09±0,08) que se mantuvo similar al grupo control. El análisis morfológico mostró signos clásicos de la injuria tisular producto de la I/R, atenuados en presencia de los gases bioactivos. El uso de dadores de NO o CO resultó en una mayor protección de la integridad y función hepática reflejada en una menor resistencia intrahepática y mayor producción de bilis. Sin embargo, la presencia simultánea de CO y NO, no se tradujo en un efecto beneficioso aditivo.

INMUNOLOGIA 10

549 (497) INTERACCIÓN IN VIVO Y ANÁLISIS BIOFÍSICO POR RESONANCIA PLASMÁTICA DE SUPERFICIE DE UN NUEVO SAG DEL GRUPO II, SER, CON EL TCR MURINO VBETA8.2. Chiappini S.¹; Romasanta P.²; Bauer A.³; De Marzi M.⁴; Fernández M.⁵; Malchiodi E.⁶

IDEHU - Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Profesor Ricardo A. MARGNI, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5 6} <santiago.chiappini@gmail.com>

Los SAGs bacterianos son toxinas capaces de disparar una respuesta inmune masiva por estimulación de poblaciones de linfocitos T que poseen determinado V α en su receptor de superficie TCR. Los SAGs son letales por producir síndrome de shock tóxico, pero también están estrechamente vinculados con procesos autoinmunes (diabetes mellitus, artritis reumatoidea y esclerosis múltiple) debido a la posible activación de LT específicos para autoantígenos. El potencial uso de los SAG y TCRs solubles en estas patologías como agentes terapéuticos hacen que el estudio biofísico de éstos sea de gran importancia. SER es un nuevo integrante del Grupo II junto a SEB, SEC1-3, SSA, SPE-A y SEG, con este último y debido a la similitud de su secuencia aa, forman un nuevo subgrupo. El Grupo II reacciona con la cadena murina V β 8.2, el principal TCR involucrado en el modelo ratón para esclerosis múltiple. Demostramos que SEG presenta interacción diferencial con V β 8.2 y al resolver la estructura tridimensional de SEG-V β 8.2, observamos diferencias sustanciales con las presentes en otros complejos. Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar biofísica y biológicamente a SER y determinar si presenta el mismo comportamiento diferencial de SEG, caracterizando al nuevo subgrupo. Para ello, clonamos y expresamos a SER en forma soluble, el que fue inyectado a ratones BALB/c y mediante citometría de flujo se determinó que: SER interacciona con V β 8.2 teniendo el pico de proliferación 48hs post infección y sin actividad a día 4 como ocurre con los otros SAGs, característica compartida por SEG. Mediante SPR se determinó la afinidad de SER por V β 8.2 y por L2CM, una mutante de V β 8.2 que presenta una mayor afinidad por los SAGs sólo cuando el sitio de interacción convencional se encuentra conservado. La KD determinada en ambas mediciones fue de 17 uM. Estos resultados sugerirían que SER presentaría un comportamiento similar a SEG desde el punto de vista biológico como estructural.

550 (352) EVALUACIÓN DE CITOQUINAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASMA ATÓPICO EN ESTABILIDAD Y EN CRISIS. Otero C.¹; Paz R.²; Galassi N.³; Teper A.⁴; Kohan M.⁵; Bezrodnik L.⁶; Fink S.⁷; Finiasz M.⁸

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina¹; Hospital de Niños R. Gutiérrez, Argentina²; Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina³; Hospital de Niños R. Gutiérrez, Argentina^{4 5 6}; Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina^{7 8} <constanzaotero@gmail.com>

Se ha descrito en los pacientes con asma atópico un perfil de citoquinas con predominio Th2, aunque presentan un cuadro

de inflamación permanente que se asocia con la presencia de citoquinas Th1. Esta inflamación es mayor en el momento de la crisis asmática. La mayoría de los estudios publicados emplean células purificadas, lo que puede dar una visión incompleta de la respuesta inmune. En este estudio evaluamos la producción de citoquinas en sangre entera de pacientes asmáticos pediátricos en momentos de estabilidad (Inter crisis, Int) o de exacerbación (Crisis, Cr). Para ello se realizó la determinación por citometría de flujo estimulando una muestra de sangre periférica con PMA/ionomicina y tratando con brefeldina durante 4 horas. Luego se fijaron y permeabilizaron las células, y se marcaron con anti-CD3 y anticuerpos dirigidos contra distintas citoquinas. Se determinó el porcentaje de células CD3 positivas para interferón gamma (IFN γ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleuquina (IL)-4, IL-5, IL-10 e IL-13 con los siguientes resultados: (% X \pm ES) IFN γ Int 11,4 \pm 4,0 (n=8); Cr 9,9 \pm 5,6 (n=6); TNF α Int 9,1 \pm 2,9 (n=8); Cr 6,0 \pm 3,3 (n=6); IL-4 Int 0,6 \pm 0,2 (n=8); Cr 0,3 \pm 0,1 (n=6); IL-5 Int 0,8 \pm 0,3 (n=9); Cr 2,0 \pm 1,0 (n=7); IL-10 Int 0,2 \pm 0,1 (n=5); Cr 0,2 \pm 0,1 (n=5); IL-13 Int 1,6 y 0,6 (n=2); Cr 0,3 \pm 0,1 (n=3). No se observan diferencias significativas en los pacientes en período de estabilidad y de exacerbación asmática, ni tampoco con los datos de controles sanos (datos no mostrados). Los resultados muestran un porcentaje de células productoras de IFN γ y TNF α mayor que de IL-4, IL-5, IL10 e IL-13, es decir que el perfil de producción in vitro de citoquinas sería Th1, con predominio de citoquinas inflamatorias en ambos grupos de pacientes.

- 551 (5) CINÉTICA DE LA RESPUESTA INMUNE DE IGA E IGE EN MUCOSA INTESTINAL DE RATA DURANTE LA INFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS.** Cohen M.¹; Nuñez G.²; Gentilini M.³; Venturiello S.⁴

Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA. IDEHU-CONICET^{1 2 3 4} <melucohen@ffyub.uba.ar>

Conociendo la importancia de la IgA e IgE a nivel de la mucosa intestinal en la infección por *Trichinella spiralis*, se estudió la cinética de esta respuesta inmune en la fase intestinal entre los días 1-13 post-infección (dpi), caracterizándola frente a los distintos estadios parasitarios del ciclo evolutivo. Extractos solubles de intestino de ratas Wistar infectadas (n=6) y sin infectar (n=6) obtenidos mediante la técnica de perfusión-extracción (PERFEXT) fueron utilizados para la detección por ELISA o IFI de IgA e IgE totales y específicas para los siguientes antígenos: Productos de excreción-secreción de larva muscular y verme adulto (PES-LM y PES-VA) y cutícula de larva recién nacida (LRN). Resultados: 1-Se detectaron niveles aumentados de IgA total durante todo el periodo estudiado con valores que alcanzan 26 veces respecto del valor basal, IgE total comienza a aumentar significativamente al 6dpi alcanzando valores de 2200 veces superior al valor basal al 13dpi (p<0.01), 2-se detecta IgA anti PES-LM desde el 1dpi, e IgE desde el 2dpi, 3-IgA anti PES-VA se detecta desde el 1dpi con un incremento significativo (p<0.01) al 13dpi, e IgE desde el 3dpi, 4-IgA anti superficie-LRN se detecta solo al 13dpi e IgE desde el 6dpi. Conclusiones: a-Tanto IgA como IgE aparecen muy tempranamente con un aumento superior de la IgE, típico de las infecciones por helmintos, sugiriendo la importancia de ambas en la defensa contra el parásito, b-la cinética de aparición de la respuesta acompaña los cambios de estadio parasitario sosteniendo el rol protector de la IgE, c-el aumento en los niveles de IgA anti PES-VA durante la última fase de la infección intestinal concuerda con su función de expulsión dirigida contra el VA, d-IgA anti-VA presente al 1dpi podría deberse a una reactividad cruzada causada por antígenos compartidos con LM.

- 552 (236) INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE LA VÍA PD1/PD-L5 POR LAS CEPAS MDR LOCALES DE MTB.** Sabio y Garcia CA 1, Schierloh P 1, Yokobori N 1, Gonzalez A 2, Asquiner Y 2, de la Barrera S 1, López B 3, Sasiain MC 1

¹Sección Inmunología. IIHema - Academia Nacional de Medicina. ²Servicio de Neumonología, Hospital A. Posadas. ³Servicio de Micobacterias, ANLIS-Malbrán, Ciudad autónoma de Buenos Aires <carmeniica@gmail.com>

Introduction: Los patógenos logran evadir exitosamente la respuesta inmune de su hospedador explotando las vías de regulación negativa, las cuales juegan un importante rol en el mantenimiento de la tolerancia periférica e impidiendo una activación inmune excesiva en condiciones fisiológicas. El balance entre las señales de activación e inhibición aseguran el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. En este contexto, estudios in-vitro demostraron que la interacción entre el receptor inhibitorio inducido por activación, programmed death-1 (PD1) con sus ligandos PD-L1 y PD-L2, inhibe las funciones TCR mediadas por las células T. Objetivo: Investigar el rol de PD-1 y sus ligandos en la respuesta inmune inducida por las cepas M, 410, Ra y H37Rv. Métodos: CM de dadores sanos (DS) y pacientes con tuberculosis (TB) fueron cultivados 5 días con H37Rv, M, 410 y Ra. Los macrófagos (Mo) obtenidos de CM, se cultivaron por 6 días y se pulsaron 18hs con las cepas. Se determinaron los niveles de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en células CD4+/CD8+ y Mo por citometría de flujo. Resultados: Luego de la inducción con Mtb, las células CD4+/CD8+ aumentaron PD1 en DS. En TB, 410 y Ra indujeron más PD1 que H37Rv (p<0.05), pero la cepa M no lo aumentó en CD8+. PD-L1 aumentó en células CD4+/CD8+ de DS (p<0.05) mientras que en TBs M no lo indujo en CD8+. En Mo PD-L1 aumentó en DS y TB, mientras que PD-L2 aumentó solo en TBs. Además las cepas MDR inducen más PD-L2 que H37Rv en Mo. Conclusiones: La falta de incremento de PD-L1 y PD-1 por la cepa M en células CD8+ podría interferir en la regulación de la función efectora de CD8+ de los pacientes con TB

- 553 (7) LA LIPOPROTEÍNA OMP-19 DE BRUCELLA ABORTUS INDUCE OSTEOCLASTOGENESIS A TRAVÉS DE LA SECRECIÓN DE TNF-ALFA.** Delpino V.¹; Barrionuevo P.²; Di Genaro S.³; Fossati A.⁴; Baldi P.⁵; Giambartolomei G.⁶

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) Conicet^{1 2}; Dpto de Microbiología, Universidad Nacional de San Luis³; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) Conicet^{4 5 6} <mdelpino@ffyub.uba.ar>

Los osteoclastos son células que controlan la remoción de la matriz ósea. Una alteración en este equilibrio puede producir patología ósea. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que los osteoblastos secretan MCP-1 frente a la infección por *B. abortus*, por lo cual los monocitos podrían ser atraídos al sitio de infección. Los monocitos producen citoquinas proinflamatorias frente a la infección por *B. abortus* y las lipoproteínas de esta bacteria (como L-Omp-19) son las responsables de tal inducción. Trabajos realizados por otros autores demostraron que las citoquinas proinflamatorias (IL-1beta, IL-6 y TNF-alfa) inducen la diferenciación a osteoclastos de precursores de médula ósea en presencia de M-CSF. El objetivo de este trabajo fue evaluar si las citoquinas producidas por macrófagos peritoneales infectados por *B. abortus* o estimulados con L-Omp-19 son capaces de mediar el daño óseo induciendo osteoclastogénesis. Para ello, se utilizaron los medios condicionados de macrófagos peritoneales para estimular precursores de médula ósea de ratón en presencia de M-CSF. La formación de osteoclastos se evaluó determinando por microscopía la presencia de células multinucleadas que expresan fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) y por RT-PCR el aumento en la transcripción de los marcadores RANK y Catepsina K. Nuestros resultados indican que los sobrenadantes de macrófagos peritoneales infectados por *B. abortus* o estimulados con L-Omp-19 son capaces de inducir la diferenciación a osteoclastos. Por otro lado utilizando ratones p55TNF- α -/- determinamos que TNF-alfa sería la principal citoquina involucrada en la inducción de osteoclastogénesis. En su conjunto, estos resultados sugieren un mecanismo por el cual *B. abortus*, a través de sus lipoproteínas, podría estimular a las células de la inmunidad innata e inducir destrucción ósea mediada por citoquinas durante la infección osteoarticular.

- 554 (410) ESTRATEGIA EFECTIVA DE VACUNACIÓN CONTRA STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: BACTERIA RECOM-**

BINANTE INACTIVADA POR VÍA NASAL-PROBIÓTICO COMO ADYUVANTE ORAL. Vintini E.¹; Alvarez S.²; Medina M.³

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)^{1 2 3}
<eovintini14@yahoo.com.ar>

Las vacunas contra *S. pneumoniae* (Sp) no forman parte del calendario de vacunación de nuestro país, ello y el surgimiento de cepas ATB-resistentes, hacen que la tasa de morbi-mortalidad de las infecciones neumocócicas continúe siendo elevada. Nuestro grupo demostró que la inmunización nasal (IN) de ratones con una vacuna recombinante (VR) viva (*Lactococcus lactis*-PppA:LA) evitó la diseminación a sangre de varios serotipos de Sp en modelos de infección respiratoria (MIR) y redujo la mortalidad en modelo de infección sistémica. Sin embargo, LA no fue capaz de prevenir la colonización pulmonar de todos los serotipos evaluados. Objetivo: Comparar en un MIR la protección ejercida por IN con LA y con la VR inactivada (LAI) asociada a la administración de un probiótico como adyuvante oral y nasal: *Lactobacillus casei* (Lc). LAI fue administrada por vía nasal (N) en 3 dosis secuenciales (10⁸ cél/d/ratón: 0,14y28 d), mientras que Lc (10⁹ cél/d/r) se administró por vía oral (LcO) y nasal (LcN) durante 2 d previos a cada dosis de LAI. Las muestras se tomaron a 0,14,28 y 42 d. Se evaluó: 1)IgA,IgM,IgG anti-PppA en suero y lavado broncoalveolar (LBA), 2)Colonización nasal, pulmonar y sanguínea de ratones inmunizados y desafiados con Sp (serotipo 3 y 14) y 3)Citoquinas en LBA: IL-2,INF- α ,IL-4,IL-10 e IL-17. LAI+LcN y LAI+LcO indujeron niveles sig. elevados de IgA (LAI+LcO, 42d, P<0.01) e IgG en BAL e IgG en suero (LAI+LcO, 42d, P<0.05), en comparación con LA. Sólo LAI+LcO impidió la colonización pulmonar con los serotipos evaluados. El efecto de LAI+LcO se relacionaría con la respuesta Th inducida, evidenciada por el perfil de citoquinas en BAL: niveles elevados de INF- α (P<0.01) e IL-2(P<0.01) y un aumento moderado de IL-4(P<0,01) e IL-17(P<0.05) en comparación con LA. Los resultados muestran que la vía de administración del probiótico es relevante y que la adecuada asociación, VR inactivada-probiótico, resultaría una estrategia de vacunación efectiva y segura contra Sp.

555 (435) LA ACTIVACIÓN DE SLAM DURANTE LA TUBERCULOSIS ACTIVA INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE ERK Y DE CREB CONDUCIENDO A LA PRODUCCIÓN DE IFN- γ . Pasquinelli V.¹; Aspera R.²; Alvarez I.³; Jurado J.⁴; Fernandez Do Porto D.⁵; Ciallela L.⁶; Abbate E.⁷; Castagnino J.⁸; Musella R.⁹; García V.¹⁰

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.^{1 2 3 4 5}; División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz.^{6 7 8 9}; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.¹⁰ <virpasquinelli@yahoo.com.ar>

El IFN- γ es crucial en la protección contra *M. tuberculosis* (*Mtb*). Previamente demostramos que SLAM induce respuestas Th1 en tuberculosis (TB). Asimismo, la señalización vía SLAM en células estimuladas con *Mtb* induce la activación de CREB, un regulador positivo de la transcripción del IFN- γ . Aquí, investigamos la potencial relación entre SLAM-CREB e IFN- α . Mediante citometría de flujo observamos que luego de estimulación con *Mtb*, la mayoría de las células IFN- γ + coexpresan SLAM y pCREB (48,68 \pm 11,18), mientras que un menor porcentaje de células expresan una de las dos moléculas (%SLAM+pCREB⁺: 15,8 \pm 7,4; %SLAMpCREB⁺: 6,8 \pm 4,3). Estos resultados demuestran que la inducción de IFN- γ mediada por SLAM en TB depende, al menos en parte, de la activación de CREB. Se conoce muy poco sobre las vías de señalización río abajo de SLAM. Se reportó que la señalización a través SLAM induciría la activación de la proteína quinasa Erk. A fin de analizar las vías de señalización inducidas por SLAM que contribuyen a activación de CREB y secreción de IFN- γ en TB, estudiamos la fosforilación de Erk luego de coestimulación a través de SLAM por western blot. La estimulación con *Mtb* \pm anticuerpo agonista α -SLAM indujo la activación de Erk

en células de pacientes con TB. Más aún, PD98059 (inhibidor de Erk) disminuyó significativamente la producción de IFN- γ determinada por ELISA (% inhibición (media \pm SEM): 71,6 \pm 7,4) y por citometría de flujo intracelular (p<0,05) en células estimuladas con *Mtb* \pm -SLAM. Efectos similares fueron observados con el inhibidor de la vía de p38MAPK. Estos resultados demuestran que casi el 50% de las células secretoras de IFN- γ inducidas por *Mtb* coexpresan SLAM y pCREB. Asimismo, la producción de IFN- α inducida por el antígeno y la activación de SLAM es, al menos en parte, mediada por la quinasa Erk. Así, estos datos aportan información sobre las bases moleculares que funcionan durante la activación de SLAM conduciendo a la producción de IFN- γ en la TB activa.

556 (716) PREVALENCIA DE INFECCIÓN POR VIRUS DE HEPATITIS B (HBV) Y DEL VIRUS DE HEPATITIS D (HDV) EN HEMODONANTES PROVENIENTES DE UN BANCO DE SANGRE DE LA CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES. Delfino C.¹; Blejer J.²; Castillo A.³; Gentile E.⁴; Berini C.⁵; Cuestas M.⁶; Eirin M.⁷; Trinks J.⁸; Minassian M.⁹; Salamone H.¹⁰; Oubiña J.¹¹; Mathet V.¹²; Biglione M.¹³

Centro para el Estudio de las Hepatitis Virales, Dto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. UBA; Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Dto. de Microbiología, Parasitología e inmunología. Facultad de Medicina. UBA¹; Área Serología, Sección Medicina Transfusional, Fundación Favaloro. CABA.²; Centro para el Estudio de las Hepatitis Virales, Dto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. UBA^{3 4}; Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Dto. de Microbiología, Parasitología e inmunología. Facultad de Medicina. UBA⁵; Centro para el Estudio de las Hepatitis Virales, Dto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. UBA⁶; Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Dto. de Microbiología, Parasitología e inmunología. Facultad de Medicina. UBA⁷; Centro para el Estudio de las Hepatitis Virales, Dto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. UBA^{8 9}; Área Serología, Sección Medicina Transfusional, Fundación Favaloro. CABA.¹⁰; Centro para el Estudio de las Hepatitis Virales, Dto. de Microbiología, Parasitología e Inmunología. Facultad de Medicina. UBA^{11 12}; Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Dto. de Microbiología, Parasitología e inmunología. Facultad de Medicina. UBA¹³ <chechi1810@yahoo.com.ar>

Introducción: El HBV se encuentra distribuido mundialmente. La infección por HDV es HBV asociada y ha sido reportada en poblaciones de riesgo. **Objetivo:** Determinar retrospectivamente la prevalencia de HBV y HDV en hemodonantes de un banco de sangre de Buenos Aires. **Materiales y Métodos:** Durante el período 2004-2008, se recolectaron 42055 muestras provenientes del Banco de Sangre de la Fundación Favaloro. En ellas se detectaron los marcadores serológicos para HBV mediante equipos de ELISA: HBs-Ag (Biomerieux / Abbott- Murex) y anti-HBc (Biomerieux / Abbott- Murex / Ortho). En las muestras seropositivas se realizó la extracción de ADN mediante lisis alcalina y de ARN utilizando TRizol[®]. Las regiones genómicas S y PreC/C del HBV fueron amplificadas por PCR en reacciones independientes (PCR-S y PCR-PreC/C). Se determinó la presencia de HDV mediante RT-PCR. **Resultados:** En 665 muestras se detectó al menos uno de los marcadores serológicos para HBV antes mencionados, obteniéndose una prevalencia de 1,6% (665/42055). De estas, 27 presentaban ambos marcadores (HBsAg y anti-HBc) y 10 solo HBs-Ag+. En 5 de estas 37 muestras se detectó ADN de HBV, de las cuales 5 resultaron PCR PreC/C (+) y sólo 3 PCR-S (+). Dos muestras fueron RT-PCR (+) para HDV siendo una de ellas HBsAg+ y la otra HBsAg+/anti-HBc+. **Conclusión:** Estos datos confirman una baja prevalencia de infección por HBV y la presencia de HDV en donantes de sangre de Buenos Aires.

- 557 (800) DEFICIENCIA DEL RECEPTOR P55 DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL AUMENTA LAS RESPUESTAS DE IFN- γ E IL-17 LUEGO DE INFECCIÓN CON YERSINIA. Cargnelutti E.¹; Eliçabe R.²; Lacoste M.³; Rabinovich G.⁴; Di Genaro M.⁵

Laboratorio de Inmunopatología, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (IMIBIO-SL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), San Luis, Argentina.^{1 2 3}; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁴; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas-San Luis (IMIBIO-SL), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), San Luis, Argentina.⁵ <thelcargnelutti@gmail.com>

En trabajos previos demostramos que *Yersinia enterocolitica* induce artritis reactiva severa y con tendencia a cronicidad en ratones *TNFRp55*^{-/-}. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el impacto de la ausencia de *TNFRp55* sobre las respuestas de IFN- γ e IL-17. Se utilizaron ratones C57BL/6 wild-type (WT) y *TNFRp55*^{-/-}, los cuales fueron infectados orogástricamente con *Y. enterocolitica* O:3. Los días 7, 14 y 21 posteriores a la infección, se obtuvieron asépticamente los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y ganglios linfáticos inguinales (GLI), como representantes de órganos linfáticos secundarios de mucosa y articulación, respectivamente. En el clarificado de homogenatos de dichos órganos se determinó, mediante ELISA, las concentraciones de IL-17, IFN- γ , IL-6, TGF- β 1 y la subunidad p40. Por otra parte, se realizó transferencia adoptiva de células T desde ratones *TNFRp55*^{-/-} infectados con *Yersinia* a ratones WT, *TNFRp55*^{-/-} o p40^{-/-} naive; luego, estos ratones receptores fueron desafiados con heat-killed *Yersinia* (HKY), y se les realizó la prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) frente a *Yersinia*. Encontramos niveles más elevados de IL-17 e IFN- γ en los ratones *TNFRp55*^{-/-} comparado con los WT en GLM ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente); y en GLI ($p < 0.01$). Los niveles de IL-17 correlacionaron con concentraciones elevadas de IL-6 y TGF- β 1 ($p < 0.05$). Simultáneamente, se detectaron niveles aumentados de p40 en ratones *TNFRp55*^{-/-} ($p < 0.05$). La reacción DTH fue mayor en los ratones *TNFRp55*^{-/-} naive luego de la transferencia adoptiva ($p < 0.05$). Concluimos que, en ausencia de la señalización a través del *TNFRp55*, respuestas tipo Th1 y Th17 pueden actuar en forma conjunta para mantener la respuesta inflamatoria, y p40 podría estar involucrado en la generación de estas células efectoras.

- 558 (561) ACCIÓN TÓXICA DE LOS SUPERANTÍGENOS (SAGS) BACTERIANOS SOBRE MONOCITOS HUMANOS, UN POSIBLE MECANISMO DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE. De Marzi M.¹; Chiappini S.²; Romasanta P.³; Todone M.⁴; Ganem M.⁵; Fernández M.⁶; Malchiodi E.⁷

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, CONICET; Catedra de Inmunología, FFyB, UBA; Departamento de Ciencias Básicas, UNLU¹; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, CONICET; Catedra de Inmunología, FFyB, UBA^{2 3}; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, CONICET; Catedra de Inmunología, FFyB, UBA; Departamento de Ciencias Básicas, UNLU⁴; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral, CONICET; Catedra de Inmunología, FFyB, UBA^{5 6 7} <mdemarzi@ffyb.uba.ar>

Los SAGs bacterianos son toxinas que producen Síndrome de Shock Tóxico debido a que desencadenan una respuesta inmune masiva al estimular LT que poseen determinado V β en su TCR. También estarían vinculados con procesos autoinmunes (diabetes mellitus, artritis reumatoidea y esclerosis múltiple) debido a su capacidad de activar LT autoreactivos. Se asume que los SAGs ejercen su acción por interactuar simultáneamente con el TCR y las moléculas del CMH-II presentes en las CPAs. Si bien la interacción de los SAGs sobre los LT ha sido muy estudiada, poco

se sabe del efecto en las CPAs. Así, los objetivos de este trabajo fueron caracterizar la interacción de diferentes SAGs sobre monocitos humanos en ausencia de LT. Para ello, monocitos de la línea THP-1, que expresan DR1, se incubaron con concentraciones 1 pg/ml a 10 ug/ml de los SAGs SSA, SEG y SEI que interactúan con DR1 de diferente modo y afinidad. No observamos alteraciones en el crecimiento o integridad celular a concentraciones menores a 100 ng/ml de SAG, pero entre 100 ng/ml-10 μ g/ml, concentraciones estándar para la mayoría de los ensayos, éstos ejercían una función inhibitoria o tóxica sobre las células (40-75%), efecto que era dosis, tiempo de incubación y densidad celular dependiente. Al incubarse los SAGs con la molécula recombinante del DR1 en relación estequiométrica este efecto revertía. Finalmente, al tratar con Sytox green, un colorante que permite evaluar daño en membrana, observamos que las células incubadas con las mayores concentraciones de SAG presentaban daño en la misma y alteración de su morfología. Estos resultados sugerirían que los SAGs en ausencia de los LT ejercerían un potencial efecto tóxico sobre los precursores de las CPAs y que el mismo estaría mediado por su interacción con el CMH-II. Esta acción podría tener como fin eliminar del sitio de infección, en el que no hay naturalmente LT, a las CPAs para evitar la fagocitosis y procesamiento del agente bacteriano productor de SAGs.

- 559 (655) TOLL-LIKE RECEPTOR 2, 4 AND 9 AGONISTS REDUCE INFLAMMATORY PROCESS IN C57BL/6 MICE DURING TRYPANOSOMA CRUZI ACUTE INFECTION. Carrera Silva E.¹; Arocena A.²; Pellegrini A.³; Cano R.⁴; Paroli A.⁵; Aoki M.⁶; Gea S.⁷

CIBICI - CONICET. FCQ - Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3 4 5 6 7} <geasusana@yahoo.com.ar>

Toll-like receptor (TLR) and cytokine signalling play a central role in pathogen clearance and in pathological phenomena. Recently, we reported a fatal hepatic injury associated with low TLR2, TLR4 and high TLR9 expression and an exacerbated inflammatory response in C57BL/6 (B6) mice during *Trypanosoma cruzi* acute infection. In this work, we evaluated whether treatment with TLR ligands - previous or during *T. cruzi* infection - improves or exacerbates the observed inflammatory response. We used 10ug of Pam3CSK4, 10ug of LPS or 5ug of CpGODN per dosis, a day previous to infection (-1) or 7 and 14 days post infection (+7/+14 dpi). In each group, we comparatively studied parasitemia, survival percentage, GOT and GPT transaminase activities, cytokine production and histopathology. The treatment with any of the three agonists during acute infection (+7/+14), increased the GPT activity but the pre treatment (-1) reduced the GOT and GPT activities compared to untreated infected mice. The parasitemia diminished only in Pam3CSK4 (-1) mice, but the survival did not differ in any group compared to untreated infected mice. Purified hepatic leucocytes from infected mice previously treated with any of the three ligands showed a significant reduction of IL6, IL12 and TNFa levels at 14dpi compared to infected mice alone. In addition, nitric oxide secretion was significantly reduced at 14 and 21dpi. Histopathological studies revealed a reduction of liver inflammatory cell foci independently of any ligand treatment. Our results suggest that the pre-treatment with Pam3CSK4, LPS or CpG one day before infection, reduces the inflammatory environment in hepatic tissue and could be a promissory strategy to modulate the exacerbated inflammatory process in B6 *T. cruzi* infected mice.

- 560 (359) INFLAMACIÓN EOSINOFÍLICA Y MASTOCITARIA PULMONAR EN TRICHINELLOSIS. CITOQUINAS Y QUEMOQUINAS INVOLUCRADAS. Gentilini M.¹; Nuñez G.²; Cohen M.³; Venturiello S.⁴

Catedra de Inmunología. FFyB, UBA. IDEHU-CONICET.^{1 2 3 4} <sventuri@ffyb.uba.ar>

Durante la infección intestinal con el parásito (*P*) *Trichinella spiralis* se demostró una precoz respuesta inflamatoria pulmonar

con marcada infiltración de eosinófilos y mastocitos. Las moléculas que median esta respuesta son desconocidas. Nuestro objetivo fue a- estudiar la cinética de aparición de citoquinas (Ck) y quemoquinas (Qk) involucradas en el proceso en el parénquima pulmonar; b- realizar el recuento de eosinófilos y mastocitos y determinar histológicamente la ubicación. Homogenatos pulmonares de ratas Wistar infectadas (n=32) obtenidos por la técnica de perfusión-extracción (PERFEXT) fueron obtenidos a los días 0, 1, 2, 3, 6 y 13 post infección (dpi) para la determinación de los niveles de IFN γ , TNF α , IL-4, IL-10, CCL11 mediante ELISA e IL-5, IL-13, IL-12 y CCL28 mediante inmunoelectrotransferencia y posterior densitometría. β -actina fue revelada en paralelo. Se realizó el recuento celular en cortes histológicos con tinciones selectivas para eosinófilos (técnica de LUNA) y mastocitos (Azul de Toluidina). **Resultados:** TNF α y CCL28 se hallaron elevados desde el 1-3; IFN γ e IL-13 desde el 1-6 dpi; IL-4 y CCL11 desde 1-13 dpi e IL-5 aumentó a partir del 3 dpi. IL-10 e IL-12 no fueron significativamente diferentes de animales controles. El infiltrado celular se encontró elevado desde 1 dpi con máximos niveles al 13 dpi con una distribución no homogénea. Estos resultados demuestran que la infección intestinal parasitaria induce una señal en el pulmón con una *etapa inicial* de tipo innata y presencia de CCL28, CCL11, Ck proinflamatorias e importante reclutamiento celular, una *secundaria*, de perfil mixto Th1-Th2, con aparición de IL-5 y IL-13, coincidente con la presencia del estadio migrante del P en el pulmón, modulada hacia Th2 con predominio de IL-4, CCL11 y máximos niveles de infiltración celular. La simultánea presencia de CCL11, CCL28 e IL-4 explica el temprano reclutamiento celular particularmente de mastocitos y eosinófilos.

561 (116) INFLUENCIA DE LA DEPLECIÓN DE CÉLULAS T REGULADORIAS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO. Cabrera G.¹; Mundiñano J.²; Camicia G.³; Lorenzo D.⁴; Maglioco A.⁵; Nepomnaschy I.⁶; Piazzon I.⁷

ILEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5 6 7}
<galt132000@yahoo.com.ar>

El virus del tumor mamario murino (MMTV) se transmite durante la lactancia. En las placas de Peyer (PP), la presentación de un Superantígeno (Sag) viral causa una fuerte *respuesta inmune T frente al Sag* que es crítica para la proliferación de las células B infectadas y la amplificación viral. Mostramos que la infección causa en las PP aumentos en células T reguladoras (Treg) CD4+CD25+Foxp3+ y que la depleción de esas células con anticuerpo anti-CD25 antes del inicio de la infección (AI) causa una mayor respuesta al Sag y determina mayor carga viral, mientras que al día 6 de infección (DI), luego de la respuesta inicial al Sag, determina menor carga viral. El objetivo de este estudio fue analizar la influencia de las células Treg durante, y luego de la respuesta inicial al Sag, en eventos que podrían estar relacionados con los niveles de infección. Determinamos por citometría de flujo (FACS) que la depleción de las células Treg tanto AI como DI causa mayores aumentos en el porcentaje y número de células IgA+B220^{high} e IgA+B220^{low} en las PP de ratones BALB/c infectados. AI, Número de células IgA+B220^{high}/PP(10⁻³), No infectado (NI) no depletado (ND): 3,15 \pm 0,9; NI depletado (D):3,00 \pm 0,4; Infectado (I) ND:11,90 \pm 0,1; (I) (D):19,80 \pm 0,5; p<0,05 (media \pm DS, n=4). Por otra parte, determinamos por FACS que la depleción de células Treg AI no causa diferencias en las células CD8+Vb6+ (Sag específicas) ni en las CD8+Vb10+ (no específicas), mientras que la depleción DI causó aumentos en el número de ambas poblaciones. DI, Número de células CD8+Vb10+/PP(10⁻³), (NI) (ND): 23,8 \pm 5,7; (NI) (D):37,5 \pm 10,6; (I) (ND):41,3 \pm 11,4; (I) (D):109,4 \pm 13,5 p<0,05 (media \pm DS, n=4). Las células Treg tendrían un rol complejo en la infección del MMTV. Por un lado, favorecerían al huésped al atenuar aumentos en células B IgA+, probablemente relacionadas con la amplificación viral. Sin embargo, también podrían dificultar la generación de una respuesta CD8, favoreciendo la persistencia del virus.

562 (769) ANÁLISIS DEL ROL DE TLR4 EN LA RESPUESTA TEMPRANA A LA INFECCIÓN DEL PATÓGENO RESPIRATORIO BORDETELLA PERTUSSIS. Errea A.¹; Moreno G.²; Roberts R.³; Graieb A.⁴; Van Maele L.⁵; Sirard J.⁶; Rumbó M.⁷; Beneke A.⁸; Hozbor D.⁹

Laboratorio de Investigación del Sistema Inmune, Facultad de Cs. Exactas UNLP^{1 2}; *Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Cs. Exactas UNLP*^{3 4}; *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 4801, Institut Pasteur de Lille, Equipe d'Immunité Anti-Microbienne des Muqueuses, Lille, France*^{5 6}; *Laboratorio de Investigación del Sistema Inmune, Facultad de Cs. Exactas UNLP*⁷; *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale 4801, Institut Pasteur de Lille, Equipe d'Immunité Anti-Microbienne des Muqueuses, Lille, France*⁸; *Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), Facultad de Cs. Exactas UNLP*⁹
<ajerrea@biol.unlp.edu.ar>

La respuesta temprana dependiente de TLR4 en la infección por B. pertussis ha sido poco caracterizada. A fin de estudiarla analizamos el perfil transcripcional pulmonar inducido por la infección intranasal de B. pertussis (108CFU/40 μ l) en animales TLR4 competentes (C3HHeN) y TLR4 deficientes (C3HHeJ). Para ambas cepas de ratones se realizaron análisis a las 2 y 24 hs postinfección utilizando microarreglos de ADN con cobertura del genoma murino completo. Se seleccionaron genes diferencialmente expresados (con p<0.01) y clasificaron empleando el software Ingenuity Pathway Analysis IPA[®]. A las dos horas postinfección pudieron registrarse claras diferencias entre ambas cepas de ratones: mientras 205 genes, correspondientes a procesos biológicos de señalización/inmunidad dependiente de citoquinas y quimoquinas/inmunidad y defensa/inhibición de apoptosis se indujeron en el animal C3HHeN, sólo 7 fueron inducidos en el animal C3HHeJ. A las 24 hs ambas cepas muestran una respuesta robusta (614 genes en CeHHeN vs 514 en C3HHeJ) aunque con diferencias importantes. Mientras en los animales C3HHeN las vías inflamatorias presentan mayor nivel de inducción, en los animales C3HHeJ hay una mayor inducción de genes regulatorios. Además, en los ratones C3HHeJ las quimoquinas muestran una inducción tardía y de menor intensidad con deficiencias en la producción de quimoattractantes de neutrófilos (PMN) (CXCL1, CXCL2 y CXCL5) a diferencia de los C3HHeN que muestran una respuesta clara ya a las 2hs. En concordancia con estos resultados, el reclutamiento de poblaciones inmunes a vías aéreas dentro de las 24hs postinfección mostró un menor número de PMN en los animales C3HHeJ (9,6 \times 10⁵ \pm 1,6 \times 10⁵ PMN totales en C3HHeN vs 1,4 \times 10⁵ \pm 1,4 \times 10⁴ en C3HHeJ). Nuestros resultados indican que TLR4 es clave como disparador de la respuesta innata, siendo responsable del reclutamiento temprano de poblaciones celulares necesarias para el establecimiento de una respuesta efectiva anti-pertussis.

563 (238) BRUCELLA ABORTUS INHIBE LA EXPRESIÓN INDUCIDA POR IFN-GAMMA DE LAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I (MHC-I) EN MONOCITOS/MACRÓFAGOS HUMANOS. Barrionuevo P.¹; Delpino M.²; Cassataro J.³; García Samartino C.⁴; Pasquevich K.⁵; Zwerdling A.⁶; Bregante J.⁷; Giambartolomei G.⁸

*Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA), Laboratorio Inmunogenética, Hospital Clínicas, UBA, Buenos Aires, Argentina*¹; *Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Buenos Aires, Argentina*²; *Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA), Laboratorio Inmunogenética, Hospital Clínicas, UBA, Buenos Aires, Argentina*^{3 4 5 6 7 8}
<pbarrion2004@yahoo.com.ar>

Brucella abortus induce una poderosa respuesta Th1 con la consecuente inducción de linfocitos T citotóxicos (LTc), sin em-

bargo es capaz de modular esta respuesta y establecer una infección crónica. Recientemente demostramos que *B. abortus* inhibe la expresión inducida por IFN- γ de las moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y del receptor para la porción Fc de IgG (Fc γ RI, CD64) en células THP-1 y monocitos/macrófagos humanos. En este trabajo, investigamos el efecto de *B. abortus* sobre la expresión de otra molécula relevante inmunológicamente de los monocitos/macrófagos humanos, MHC-I. Para esto, células THP-1 y monocitos/macrófagos humanos fueron infectados con *B. abortus* en presencia de IFN- γ y luego de 48 h de cultivo, la expresión de MHC-I fue evaluada por citometría de flujo. La infección con *B. abortus* disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la expresión inducida por IFN- γ de MHC-I, en ambos tipos de células. La infección con especies rugosas de *Brucella* (*B. ovis* y *B. canis*) o una cepa rugosa de *B. abortus* (RB51) también inhibió la expresión de MHC-I. Sin embargo, la expresión de MHC-I no fue inhibida por *B. abortus* muerta por calor, el LPS de *B. abortus* ni por L-Omp19, una lipoproteína de *B. abortus* prototípica usada como modelo, indicando que dicha inhibición no se debe a un componente estructural de la bacteria. Para evaluar la dependencia del metabolismo bacteriano, células THP-1 fueron infectadas con mutantes de los mecanismos de virulencia de *B. abortus*: del sistema de secreción VirB tipo IV y de las proteínas de *Brucella* conteniendo dominios TIR (Btp1 y Btp2) que interfieren con la señalización por TLRs. La infección con dichas mutantes disminuyó la expresión MHC-I del mismo modo que *B. abortus* salvaje. En conjunto, estos resultados establecen que la modulación de la expresión de MHC-I sería un posible mecanismo mediante el cual *B. abortus* puede inhibir la activación de los LTs y evadir la vigilancia inmunológica.

- 564 (219) EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUENOQUINAS EN POBLACIONES DE MONOCITOS DERIVADAS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS.** Romero M.¹; Balboa L.²; López B.³; Musella R.⁴; Barrera L.⁵; Abbate E.⁶; Sasiaín M.⁷; Aleman M.⁸

IIHema -Academia Nacional de Medicina^{1 2}; *Laboratorio de Micobacterias -ANLIS-Malbrán*³; *Servicio de Neumonología - Hospital Muñiz*⁴; *Laboratorio de Micobacterias -ANLIS-Malbrán*⁵; *Servicio de Neumonología - Hospital Muñiz*⁶; *IIHema - Academia Nacional de Medicina*^{7 8} <mer_romero84@hotmail.com>

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) juegan un rol crucial en la respuesta inmune frente al *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) siendo las primeras células en arribar al sitio de infección. Allí una vez activados, limitan el proceso infeccioso desplegando sus funciones microbicidas (fagocitosis de patógenos, degranulación, generación de IROS y liberación de citoquinas pro-inflamatorias). Los distintos linajes prevalentes de Mtb en la Argentina son: Europeo-Latinoamericano -Mediterráneo (LAM) y Haarlem (H), tanto sensibles (s) como multiresistentes (r) a antibióticos. Objetivo: Evaluar la respuesta de los PMN frente a distintos linajes de Mtb y compararla con la cepa de referencia H37Rv previamente caracterizada por inducir apoptosis asociada a la activación. Métodos: PMN aislados de sangre periférica fueron cultivados 18 hs en presencia o no de bacteria: LAMs, Hs o Hr (cepas M y 410). Mediante FACScan se determinó el estado de activación medido por degranulación (expresión de CD11b y CD66b) y la producción de IROS (oxidación de 123-DHR). La apoptosis de los PMN se valoró por la pérdida de CD16 y AnexinaV/PI. Resultados: Tanto el linaje LAM como H inducen activación de PMN sin diferencias significativas en términos de la expresión de CD11b y CD66b ($p < 0.05$ y $p < 0.0005$ respectivamente). Además, todas las cepas inducen IROS en ausencia de fMLP ($p < 0.05$), sin embargo LAM lo hace en mayor medida comparado con las cepas H ($p < 0.05$). A su vez, LAM produce un mayor efecto de priming en la respuesta de los PMN al fMLP (10^{-4} M) ($p < 0.002$). Concomitantemente todas las cepas H inducen menor apoptosis comparado con LAM y H37Rv ($p < 0.005$). Conclusión: diferencias en la activación/apoptosis pueden estar relacionadas con variaciones entre los distintos linajes de Mtb, las cuales pueden conferirle

a las cepas H una respuesta inmune innata característica. Diferencias estructurales entre las cepas quedan por ser evaluadas.

- 565 (772) CARACTERÍSTICAS INMUNOPROTECTORAS DEL LIPOPOLISACÁRIDO DE BORDETELLA BRONCHISEPTICA.** Sisti F.¹; Cordero A.²; Fernández J.³; Hozbor D.⁴

IBBM CCT LA PLATA^{1 2 3 4} <federico@biol.unlp.edu.ar>

Bordetella bronchiseptica (Bb) es el agente causal de una enfermedad respiratoria aguda en diferentes huéspedes, incluyendo al hombre. Si bien en la actualidad esta enfermedad es inmunoprevenible, las formulaciones actualmente en uso requieren de una mejora. Dentro de los componentes vacunales el lipopolisacárido (LPS) presenta un rol controvertido pues a su capacidad adyuvante se le contraponen su endotoxicidad. Es por esto último que no se ha profundizado el rol del mismo en la protección contra la enfermedad. En este trabajo se analizó la capacidad del LPS de Bb como único componente vacunal. Para ellos ratones Balb/c fueron inmunizados por vía IP con 5 μ g de LPS purificado y detoxificado. Quince días posteriores a la última inmunización, los animales fueron desafiados con dosis subletales de Bb (5 10^5 UFC/50 μ l). La capacidad protectora se evaluó a los 5 días postdesafío mediante el recuento del número de bacterias presentes en el pulmón. En comparación con animales no inmunizados, se observó en 4 ensayos independientes una disminución de 2 log₁₀ en el UFC recuperadas de los ratones inmunizados con LPS (5 10^5 UFC/pulmón vs 3 10^3 UFC/pulmón). Mediante el test de ganancia de peso se pudo verificar que la dosis utilizada de LPS resulta no tóxica ya que cumple los criterios recomendados por la OMS. El rol protector del LPS fue también analizado por vía intranasal siguiendo el mismo esquema de inmunización y desafío. Los resultados obtenidos permitieron corroborar el rol protector del LPS por esta vía. El empleo de un mutante de Bb carente de antígeno O nos permitió determinar que la capacidad protectora es dependiente de la expresión del mismo. Los resultados aquí presentados no sólo permitieron determinar el rol protector del LPS sino comenzar a establecer la estructura molecular necesaria para ejercer dicha función.

- 566 (227) ESTADO INMUNOLÓGICO DE LA FASE TARDÍA EN UN MODELO IN VIVO DE SEPSIS.** Barrera G.¹; Landoni V.²; Chiarella P.³; Fernández-brando R.⁴; Meiss R.⁵; Isturiz M.⁶; Palermo M.⁷; Fernández G.⁸

Instituto de Leucemia Experimental, CONICET^{1 2 3 4}; *División Patología, Academia Nacional de Medicina*⁵; *Instituto de Leucemia Experimental, CONICET*^{6 7 8} <gabymeroi@gmail.com>

La falla multiorgánica y el shock séptico pueden ser consecuencia de infecciones bacterianas por fisura intestinal. Esto puede conducir a un estado de inmunosupresión y derivar en muerte. Anteriormente desarrollamos un modelo de peritonitis aguda (PA) observándose en la fase aguda alta mortalidad, leucopenia, presencia de bacterias en sangre y peritoneo y activación de neutrófilos. Objetivo: Caracterizar la fase tardía del modelo de PA desarrollado previamente. Dado que en los animales PA observamos una leucocitosis a los 9 días (cél/mm³: Sham (n=10) = 5728 \pm 220, PA(n=11) = 9141 \pm 300*, * $p < 0.05$) y una leucopenia a los 20 días (cél/mm³: Sham (n=9) = 6757 \pm 346, PA(n=8) = 5325 \pm 346*, * $p < 0.05$) post-PA, elegimos estos tiempos para determinar parámetros del estado inmunológico post-infección. Determinamos la presencia de bacterias en distintos órganos y sangre periférica por cultivos en medio LB, evaluamos la producción de TNF- α en respuesta a LPS en suero de animales y en macrófagos peritoneales mediante un ensayo biológico (células L929) e investigamos la respuesta adaptativa a un antígeno T dependiente por hemoaglutinación. El porcentaje de animales PA que presentaron cultivos positivos en pulmón, hígado y sangre periférica a los 9 días fue de 75, 50 y 100%, respectivamente. Los animales PA presentaron valores de TNF- α (Dosis Letal₅₀) en respuesta al LPS mayores a los 9 días en macrófagos peritoneales (Sham(n=12) = 1.3 \pm 0.3, PA(n=11) = 43 \pm 12*, * $p < 0.05$), y menores en

suelo a los 20 días (Sham(n=9)=30.7±7.8, PA(n=6)=3.5±0.5*, *p<0.05). La respuesta adaptativa se encontró disminuida en los animales PA a los 20 días (Título hemoaglutinación: Sham(n=12)=55±15, PA(n=10)=18±6*, *p<0.05), asociado a un aumento del doble en las células Gr-1+ (mieloides supresoras) en bazo, mientras que estos parámetros fueron normales a los 9 días. Conclusión: Los animales PA presentan una persistencia de la infección a los 9 días que deriva en un estado de inmunosupresión a los 20 días post-inducción de la PA

567 (677) CÉLULAS SUPRESORAS MIELOIDES HEPÁTICAS E IL-10 PARTICIPAN EN LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE GENERADA DURANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL AGUDA CON TRYPANOSOMA CRUZI. Arocena A.¹; Pellegri A.²; Paroli A.³; Carrera-silva E.⁴; Cano R.⁵; Aoki M.⁶; Gea S.⁷

CIBICI Conicet. Dpto Bioquímica Clínica. Fac Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3 4 5 6 7}
caarocena@fcq.unc.edu.ar

Las células supresoras mieloides (CSM) constituyen una población heterogénea que se expande en diversos procesos inflamatorios como cáncer e infecciones. Las CSM murinas expresan los marcadores Gr1 y CD11b y suprimen varias funciones de las células T. Previamente, se demostró un incremento de estas células en bazo durante la infección con T. cruzi. Nuestro grupo reportó que ratones C57BL/6 (B6) infectados con 5000 tripomastigotes (Tulahuén) presentan daño hepático fatal, asociado con un incremento de citoquinas pro-inflamatorias comparado con BALB/c. El objetivo del presente trabajo fue analizar las CSM hepáticas de estas cepas infectadas con T. cruzi y dilucidar si la neutralización de IL-10 es capaz de exacerbar la respuesta inflamatoria en hígado de BALB/c. Se investigó el número de células CD11b+ Gr1+ de leucocitos purificados de hígado por citometría de flujo. Se observó un menor porcentaje de CSM en B6 (2.6±0.4) vs BALB/c (5.2±0.4) a los 14 dpi. En ensayos de proliferación de leucocitos hepáticos frente a Con A, se observó una disminución de esta respuesta en ambas cepas (B6: 487±95; BALB/c: 485±36 cpm), respecto a leucocitos de animales sin infectar (B6: 9418±1822; BALB/c: 13557±1823 cpm). Con el propósito de dilucidar si IL-10 detectada en hígado de BALB/c, puede ser responsable de la inhibición de la proliferación de leucocitos hepáticos, se realizaron ensayos de neutralización mediante la inyección i.p. de 100 mg de mAc anti-IL10 a los 5 y 12 dpi. La falta de señal de IL-10 produjo una recuperación parcial, no significativa de la proliferación. Además, se detectó un incremento significativo de IFN γ y óxido nítrico por leucocitos hepáticos, demostrando una neutralización efectiva de IL-10. En conclusión, en la cepa BALB/c se observó un mayor número de CSM hepáticas y la IL-10 no estaría involucrada en la supresión de células T. En la cepa B6 es probable que una disminución en las CSM contribuya a la exacerbada inflamación hepática.

568 (401) REFRACTARIEDAD DE LOS LINFOCITOS Y MONOCITOS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS A LA ACCIÓN DEL SLPI. Tateosian N.¹; Pasquinelli V.²; Guerrieri D.³; Costa M.⁴; Maffia P.⁵; Musella R.⁶; Abbate E.⁷; Gracia V.⁸; Chuluyan E.⁹

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, 3ra Cátedra de Farmacología¹; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica.²; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, 3ra Cátedra de Farmacología^{3 4 5}; División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz^{6 7}; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Química Biológica.⁸; Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, 3ra Cátedra de Farmacología⁹ <nateosian@yahoo.com.ar>

El inhibidor secretorio de proteasas leucocitarias (SLPI) es una anti-leucoproteasa producida y secretada por células epiteliales del tracto respiratorio, digestivo y urogenital, como así también por

los monocitos. En trabajos previos, demostramos que el SLPI disminuye la proliferación de linfocitos T de donantes sanos (DS) y aumenta los niveles de IL-4, IL-6 e IL-10. Ambos efectos son mediados por los monocitos presentes en el cultivo. El objetivo del presente trabajo fue analizar si el efecto observado con monocitos de DS podía ser reproducido al utilizar monocitos derivados de pacientes con tuberculosis (TB). Los experimentos fueron realizados utilizando medio condicionado de monocitos (MCM) derivados de DS (MCM-DS) y de pacientes con TB (MCM-TB). Los MCM se obtuvieron de la siguiente manera: los monocitos fueron tratados con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en presencia o ausencia de rhSLPI (4ug/ml) y a las 24hs las células fueron lavadas e incubadas 24hs más en medio en ausencia de estímulos. Una vez obtenido el MCM linfocitos de DS y pacientes con TB fueron expuestos a los mismos en presencia de IL-2. Los resultados mostraron que sólo los MCM-DS pre-tratados con SLPI inhibieron la proliferación de linfocitos de DS en un 45±4% (p<0.05), pero no la proliferación de linfocitos de pacientes con TB. En cambio, los MCM-TB tratados con SLPI fueron incapaces de inhibir la proliferación de linfocitos de DS o de pacientes con TB. Estos resultados sugieren que los linfocitos de pacientes con TB no son capaces de responder a la inhibición mediada por los monocitos de DS. Por otro lado, los monocitos de pacientes con TB no tienen la capacidad de producir los factores responsables de la inhibición al no inducir modificaciones en la proliferación de linfocitos de DS. De esta manera, podemos concluir que la ausencia de efecto del SLPI en los pacientes se debe a un defecto directo a nivel de los monocitos sumado a un defecto indirecto a nivel de los linfocitos.

569 (578) PARTICIPACION DEL RECEPTOR PARA QUIMIOQUINA CCR1, EN EL MODELO MURINO DE SINDROME UREMICO HEMOLITICO (SUH). Ramos M.¹; Panek C.²; Rodero M.³; Bentancor L.⁴; Fernandez-brando R.⁵; Mejias M.⁶; Fernandez G.⁷; Combadiere C.⁸; Palermo M.⁹

Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.¹; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. Instituto de Leucemia Experimental. Academia Nacional de Medicina.²; Faculte de Medecine. Universite Piere et Marie Curie. France³; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina.⁴; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. Instituto de Leucemia Experimental. Academia Nacional de Medicina.^{5 6 7}; Faculte de Medecine. Universite Piere et Marie Curie. France⁸; Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigaciones Hematológicas. Academia Nacional de Medicina. Instituto de Leucemia Experimental. Academia Nacional de Medicina.⁹ <toresani7@hotmail.com>

El SUH, enfermedad caracterizada por daño renal, se desarrolla en niños luego de la infección con bacterias enterohemorrágicas productoras de toxina Shiga (Stx). El objetivo del trabajo fue determinar la participación del receptor para la quimioquina CCR1, en el modelo murino de SUH. Se observó que los ratones deficientes en la expresión del receptor CCR1 (CCR1Ko) presentan mayor sobrevivencia que los ratones wt luego de la inoculación ev de Stx2, (%vivos:71,4±17.0% y 11,7±7.8%, respectivamente, p<0.01). Los niveles de creatinina y urea, evaluados como marcadores de daño renal, aumentaron de manera tiempo-dependiente 72 horas post-Stx2 en ambas cepas de ratones aunque el incremento fue menor en los ratones CCR1Ko (creatinina(mg/dl): control=1.33±0.09 y CCR1Ko=0.94±0.13, p<0.05 y urea(mg/dl): control=99.0±4.4 y CCR1Ko=72.0±3.7; p<0.05). Para analizar el mecanismo implicado en la menor sensibilidad de los ratones CCR1Ko, se estudiaron mediante citometría de flujo, distintas subpoblaciones de leucocitos involucradas en el daño endotelial durante el desarrollo del SUH. Se observó, en condiciones basales, que el porcentaje (%) de leucocitos en sangre periférica ó en médula osea, era similar en ambas cepas de ratones. Lue-

go de 72 horas post-inoculación con stx2, el aumento en el % de células mieloides y neutrófilos (PMN) en sangre periférica fue significativamente menor en ratones CCR1Ko. (células mieloides: control=28,2±5,0; CCR1Ko=18,1±4,4, p<0.01 y. PMN: control = 25,0±4,9; CCR1Ko=14,7±3,8, p<0.01). Por otro lado, los números relativos de células mieloides y PMN en médula ósea, 72hs post-Stx2, aumentaron de manera similar tanto en los ratones wt como en los CCR1Ko. Estos datos sugieren que en el modelo murino de SUH, el receptor CCR1, es un factor clave para controlar la neutrofilia en periferia y el daño renal secundario a la Stx2. Se propone que la deficiencia de CCR1, podría controlar el egreso de neutrófilos desde médula ósea, protegiendo la función renal.

570 (153) BRUCELLA INFECTA E INDUCE UNA LEVE RESPUESTA INFLAMATORIA EN CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES HUMANAS. Ferrero M.¹; Rumbo M.²; Fossati C.³; Baldi P.⁴

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA¹; Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.²; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA; Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune. Facultad de Ciencias Exactas, UNLP.³; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA⁴ <ferrerom@ffyub.uba.ar>

En el hombre, una de las formas más comunes de contagio de la brucelosis es el consumo de alimentos contaminados con *Brucella* spp. Investigamos la capacidad de la cepa lisa B. abortus 2308 y las cepas rugosas B. abortus RB51 y B. canis para infectar, replicar e inducir la secreción de citoquinas en las líneas de epitelio intestinal humano Caco-2 y HT-29. Las células se infectaron con 200 bacterias/célula por 16 hs. A las 2, 24 y 48 hs. posinfección (p.i.) se cuantificaron las bacterias intracelulares por ensayos de protección con gentamicina. Todas las cepas se adherieron e invadieron las células Caco-2 y HT29. La adherencia de las cepas rugosas a células HT-29 fue mayor que la de la cepa lisa (6.5 ± 0.7 x10⁷ para B. canis y 5.7 ± 0.2 x10⁷ para RB51 vs. 5.6 ± 0.9 x10⁶ UFC/ml para la cepa lisa), y lo mismo ocurrió con la invasión (7.9 ± 2.6 x10⁶ y 9.0 ± 1.0 x10⁶ vs. 2.4 ± 0.4 x10³ UFC/ml). Los resultados fueron similares para Caco-2. La invasión dependió de los microfilamentos y microtúbulos, ya que fue inhibida por citocalasina D y colchicina. Sólo la cepa lisa replicó intracelularmente en HT-29 (UFC aumentaron ~2 log a 48 hs p.i.), pero su mutante en el gen virB10 (sistema de secreción tipo IV -T4SS-) no logró replicar. En HT-29 la infección indujo una producción moderada de IL-8 (513.0±11.3 pg/ml para B. abortus 2308, 677.5±57.28 pg/ml para B. canis y 1243±14.8 pg/ml para RB51 a 48 hs. p.i.), una baja secreción de GM-CSF (12.61±1.17 pg/ml, 11.37±0.70 pg/ml y 15.06 ± 1.74 pg/ml, respectivamente), pero no indujo MCP-1, IL-1 α ni TNF- α . La inducción de citoquinas dependió de la viabilidad bacteriana (B. abortus muerta por calor no indujo citoquinas) pero no del T4SS ni de la replicación intracelular, ya que la cepa mutada en virB10 indujo niveles de citoquinas similares a la cepa salvaje. La infección de Caco-2 no indujo secreción de citoquinas. Esto indica que *Brucella* puede invadir y replicar en epitelio intestinal humano sin inducir una respuesta inflamatoria importante.

571 (312) ALTERACIÓN DE LA INMUNIDAD CONTRA CANDIDA ALBICANS EN RATONES INMUNOCOMPROMETIDOS POR DESNUTRICIÓN. Barbieri N.¹; Villena J.²; Salva S.³; Haro C.⁴; Herrera M.⁵; Alvarez S.⁶

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET)¹ ² ³; Instituto de Bioquímica Aplicada. Universidad Nacional de Tucumán⁴ ⁵; Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET)⁶ <nbarbieri@cerela.org.ar>

En este trabajo se estudiaron los mecanismos inmunológicos involucrados en la susceptibilidad a la infección sistémica por

Candida albicans, en un modelo experimental de inmunosupresión por desnutrición. Ratones de 3 semanas recibieron una dieta libre de proteínas durante 21 d (grupo DN). Los controles bien nutridos consumieron alimento balanceado (grupo BN). Al finalizar los tratamientos, los ratones DN y BN fueron desafiados con *C. albicans* (inyección intraperitoneal 10⁷ cél/ratón). Los estudios se realizaron antes del desafío (d0) y 1, 3 y 5d post-infección. Los recuentos del patógeno en sangre, hígado y bazo en el grupo DN fueron mayores a los del grupo BN. Se observaron además mayores alteraciones histológicas en los tejidos infectados en el grupo DN. El número y la actividad de neutrófilos y macrófagos y los niveles de TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 se estudiaron en cavidad peritoneal, sangre, hígado y bazo. La actividad microbicida y fagocítica de macrófagos peritoneales y la activación y el reclutamiento de neutrófilos a los tejidos infectados en el grupo DN fueron significativamente menores que en los ratones BN. Estos cambios en el grupo DN, se correlacionaron con una menor producción de TNF- α , INF- γ , IL-6 e IL-17 en sangre, hígado y bazo (p<0.05). Los ratones DN mostraron también menor producción de IL-10 en respuesta a la infección, en comparación con el grupo BN (p<0.05). Los resultados mostraron que los ratones DN presentan una alteración significativa en la intensidad de la respuesta inflamatoria y una falla en la regulación de la misma, lo cual dificultaría la resistencia a la infección y contribuiría al daño producido por el proceso infeccioso. El conocimiento de los mecanismos inmunológicos afectados por la desnutrición es de gran importancia, ya que permitiría desarrollar inmunoterapias efectivas para la prevención de infecciones.

572 (636) DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS EN EL GEN CX3CR1 DE PACIENTES INFECTADOS CON E. COLI PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA QUE PROGRESAN O NO A SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO. Panek C.¹; Ramos M.²; Mejías M.³; Fernández-brando R.⁴; Bentancor L.⁵; Exeni R.⁶; Palermo M.⁷

Academia Nacional de Medicina¹ ² ³ ⁴ ⁵; Departamento de Nefrología, Hospital Municipal del Niño, San Justo, Pcia. de Bs As.⁶; Academia Nacional de Medicina⁷ <analipane@gmail.com>

La forma típica del síndrome urémico hemolítico (SUH), se desarrolla secundariamente a la infección con cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) en el 10-15% de los niños infectados. Se caracteriza por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo. Recientemente, hemos demostrado que los pacientes con SUH presentan bajo porcentaje de células CX₃CR₁+ (Monocitos y NK) en sangre periférica, correlacionándose en forma negativa con la severidad del SUH, y la presencia de células CX₃CR₁+ en biopsias de pacientes. Por otro lado, se han identificado dos polimorfismos (V249I y T280M) en el marco de lectura abierto del gen CX₃CR₁. Diversos estudios han señalado a estos polimorfismos como factores de riesgo ante algunas enfermedades. Entonces, el objetivo de este trabajo es investigar si un polimorfismo determinado se asocia con una mayor probabilidad de desarrollar SUH. Métodos: Se realizó la extracción del DNA de orina de pacientes infectados con STEC (I-STECC), de pacientes con SUH y controles normales (C). Se amplificó el genoma total y una secuencia de 588 pares de bases correspondiente al gen CX₃CR₁ por PCR. Los productos obtenidos fueron digeridos con las enzimas Psp1406I y BsmBI. Los polimorfismos V249I y T280M, alteran el sitio de restricción de dichas enzimas pudiendo ser diferenciados en geles de agarosa por sus patrones de restricción. Resultados: En pacientes con SUH (n=7) se observaron los genotipos: VV-TT (n=4); VI-TT (n=2); VI-TM (n=1). El paciente I-STECC (n=1) mostró genotipo VV-TT y los C (n=3), genotipo VV-TT. Conclusiones: Demostramos que el método empleado a partir de orina permite detectar todas las variantes polimórficas de CX₃CR₁, reportadas. Por otra parte, aunque el número de pacientes evaluados es muy pequeño, fue llamativo que solo la mitad tenga el genotipo normal. Sin embargo, aún no es posible realizar asociaciones entre polimorfismos y predisposición a desarrollar SUH.

573 (588) MACROPINOCITOSIS: SU PAPEL EN LA RESPUESTA SUPERANTIGÉNICA INDUCIDA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS. Ganem M.¹; Fernández M.²; De Marzi M.³; Bauer A.⁴; Malchiodi E.⁵

Cátedra de Inmunología, IDEHU- CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA^{1 2 3 4}
<bernardaganem@hotmail.com>

Los superantígenos (SAGs) bacterianos son toxinas capaces de desencadenar una respuesta inmune masiva por estimulación de linfocitos T (LT) que poseen determinada región V α en su receptor de superficie (TCR). Entre los SAGs, SEG genera una importante respuesta superantigénica en el modelo ratón, estimulando de un modo diferencial y específico los LT con TCR V α 8.2*. Para que estos efectos tengan lugar se postula que sería necesaria la intervención de células presentadoras de antígeno (CPA) que interaccionen mediante sus moléculas de CMH-II. Las células dendríticas (CDs), CPAs por excelencia expresan grandes cantidades de CMH-II, por lo que podrían jugar un papel importante en la respuesta superantigénica. Los objetivos de este trabajo son caracterizar la respuesta por SAGs desencadenada por CDs de médula ósea de ratón y determinar la implicancia de los procesos endocíticos en esta respuesta. Utilizando citometría de flujo demostramos que SEG es internalizado por las CDs principalmente mediante el proceso de macropinocitosis, el que se inhibió eficientemente por Wortmanina (76.5%) y por temperaturas de 4 °C (90.7%). Las CD que endocitaron SEG indujeron proliferación específica in vitro de LT V β 8.2*. Esta respuesta fue corroborada in vivo en el ganglio poplíteo de ratones inyectados en la almohadilla plantar intradermicamente con CDs pulsadas con SEG. Mediante la incorporación de timidina ³H demostramos que la proliferación inducida por CDs pulsadas es dependiente de la dosis de SEG administrada durante el pulso, y es además bloqueada por wortmanina. Conclusión: SEG es incorporado principalmente mediante mecanismos de macropinocitosis en las CDs, para luego desencadenar una respuesta superantigénica que es dependiente de este proceso de macropinocitosis. Postulamos que la incorporación en CPAs de la periferia y su transporte hacia los ganglios podría ser un mecanismo para la llegada de los SAG para el inicio de una respuesta inmune.

ENDOCRINOLOGIA 6

574 (46) PROCESAMIENTO DE INSULINA EN MITOCONDRIAS - SU DEGRADACIÓN. Camberos M.¹; Cao G.²; Martucci L.³; Cresto J.⁴

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Htal. de Niños R. Gutierrez¹; Anatomía Patológica, Htal. de Niños "P. Elizalde"²; Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE), Htal. de Niños R. Gutierrez^{3 4}
<mccamberos@cedie.org.ar>

Nosotros observamos que la enzima degradante de insulina (EDI) se encuentra en la matriz mitocondrial y posee actividad degradante de insulina. Objetivos - Demostrar que las mitocondrias regulan y degradan la incorporación de insulina. Métodos - EDI se obtuvo de músculo de rata por sucesivos pasos cromatográficos. Mitocondrias hepáticas aisladas según Parson, fueron recuperadas e incubadas a 25°C o 30°C, oxígeno 100%, ¹²⁵I-insulina (10⁵ cpm) e insulina fría a tiempos y dosis variables. La reacción se detuvo con N-ethylmaleimida 1 mM y los mitoplastos (M) se aislaron de la membrana externa y espacio intermembrana con digitonina. La degradación se estudió por cromatografía en Sephadex G50 Superfino con elusión en ácido acético 1 M. La insulina se detectó por su posición cromatográfica y con anticuerpos específicos. Resultados - A 30°C la degradación de insulina fue mucho mayor que a 25°C. A 25°C EDI acumula insulina en M hasta los 300 seg. A 30°C la acumulación en M (control y EDI) fue similar pero la degradación fue mayor con EDI. En el basal a 30°C la degradación en el buffer de incubación mitocondrial fue total (tiempo experimental "0") con un pico de

tirosina. Esto es, toda la insulina fue captada y degradada en forma casi instantánea. Estudios dosis/respuesta con dosis crecientes de insulina (1 ng a 10 μ g) mostraron que dosis farmacológicas de insulina saturan parcialmente el sistema de transporte y degradación. N-ethylmaleimida 0,1 mM incrementó la internalización mitocondrial (Mitocondrias, Control: NS, EDI P<0.00005; Mitoplastos, Control P<0.02, EDI P<0.002) e inhibió parcialmente la degradación de insulina. Conclusión- 1) A 30°C toda la insulina presente en concentraciones fisiológicas fue incorporada y degradada en forma casi instantánea. 2) La degradación regula el transporte y la acumulación de insulina en el mitoplasto.

575 (41) LA ANGIOTENSINA-(1-7) FOSFORILA A LA ENZIMA AKT EN TEJIDOS EXTRACARDÍACOS MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR MAS. Muñoz M.¹; Giani J.²; Turyn D.³; Dominici F.⁴

IQUIIFB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.^{1 2 3 4}
<marinacmg@hotmail.com>

La elevación crónica de angiotensina (Ang) II induce insulino-resistencia. A través de la activación del receptor AT1, la Ang II, estimula en forma aguda varios componentes de la cascada de señalización de la insulina tanto in vitro como in vivo. Por el contrario, la co-administración de insulina y Ang II produce una disminución en la respuesta a la insulina, lo que explicaría la resistencia a la insulina asociada a un exceso crónico de Ang II. La Ang-(1-7), a través de su receptor específico Mas, se opone a muchas de las acciones de la Ang II. Recientemente demostramos que la Ang-(1-7) es capaz de estimular la actividad de moléculas implicadas en la vía de señalización de la insulina en corazón de rata, entre ellas, la enzima Akt. Sin embargo, se desconoce si la Ang-(1-7) ejerce efectos insulino-miméticos en tejidos extracardíacos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración aguda de Ang-(1-7) en el tejido adiposo, el hígado, el músculo esquelético y el riñón. Para ello, ratas Sprague-Dawley macho fueron inyectadas vía vena porta con solución fisiológica conteniendo Ang-(1-7) (8 pmol/Kg) o Ang II (8 pmol/Kg) o A-779, antagonista selectivo del receptor Mas (80 pmol/Kg) o una mezcla de A-779 (80 pmol/Kg) y Ang-(1-7) (8 pmol/Kg) o con vehículo únicamente. Luego en los tejidos mencionados, se midió el nivel de fosforilación de la enzima Akt por immunoblotting. La administración de Ang-(1-7) indujo un aumento significativo de la fosforilación de Akt en todos los tejidos estudiados (P<0,01) que fue bloqueado por el antagonista A-779. Además, mediante inmunohistoquímica se determinó la presencia del receptor Mas en todos los tejidos analizados. Estos resultados sugieren la presencia de un mecanismo de acción por el cual la Ang-(1-7) ejerce efectos insulino-miméticos en tejidos extracardíacos a través del receptor Mas.

576 (164) ACCIÓN DE ANGIOTENSINA II (AII) SOBRE LA INDUCCIÓN DE LAS ENZIMAS ACIL-COA SINTETASA 4 (ACSL4) Y ACIL-COA TIOESTERASA 2 (ACOT2) COMO MEDIADORAS DE LA RESPUESTA HORMONAL. Mele P.¹; Di Cónsoli H.²; Cornejo Maciel F.³; Podestá E.⁴

IIMHNO - Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA^{1 2 3 4} <pgmele@fmed.uba.ar>

En trabajos previos hemos demostrado que en la acción de AII en células H295R, línea adrenocortical humana, las proteínas tirosinas fosfatasas (PTPs) son intermediarias en su mecanismo de acción, mostrando la existencia de intermediarios comunes en sistemas dependientes e independientes de AMPc. También hemos demostrado que uno de los blancos de acción de las PTPs estimuladas por AMPc es ACSL4, enzima marcapaso en la regulación de la generación de ácido araquidónico (AA) mitocondrial y en la inducción de la proteína StAR, reguladora del transporte de colesterol en la mitocondria. En el presente trabajo estudiamos la regulación por AII de ACSL4 y Acot2, enzima mitocondrial que trabaja junto con ACSL4 en la generación de AA libre. AII (10⁻⁷M) es capaz de inducir, de una manera bifásica, tanto la expresión del

ARNm de ACSL4 como el de Acot2, aumentando ambos a la hora de estimulación (ACSL4 $225 \pm 25\%$, Acot2 $350 \pm 50\%$ vs control, $p < 0,05$), volviendo a los valores basales a las 3 hs y aumentando nuevamente a las 6 hs (ACSL4 $250 \pm 30\%$, Acot2 $250 \pm 35\%$ vs control, $p < 0,05$). Esta inducción es semejante a la obtenida con el factor de crecimiento epidérmico en células de Leydig y diferente a la acción de hormona luteinizante, la cual no regula la expresión de Acot2. Esta inducción fue acompañada por un aumento en los niveles de las proteínas correspondientes analizadas por Western blot. De acuerdo con el papel de estas enzimas en la regulación de la síntesis de esteroides, All también regula la generación de AA intramitocondrial y la inducción de la proteína StAR. Estos resultados confirman nuestra hipótesis inicial en la cual se postulaba que independientemente del sistema de transducción de señales, la inducción de las enzimas involucradas en la generación de AA intramitocondrial es un camino obligatorio y universal en la síntesis de esteroides.

577 (386) EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON ACTH INDUCE ESTRÉS OXIDATIVO EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATA. Repetto E.¹; Giordanino E.²; Sanchez R.³; Aparicio S.⁴; Cipelli J.⁵; Astor F.⁶; Martínez Calejman C.⁷; Arias P.⁸; Cymeryng C.⁹

Laboratorio de Endocrinología Molecular (LEM), Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA, CEFYBO/CONICET^{1 2 3 4 5 6 7}; Departamento de Ciencias Fisiológicas - Facultad de Medicina - UBA⁸; Laboratorio de Endocrinología Molecular (LEM), Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA, CEFYBO/CONICET⁹ <erpetto@fmed.uba.ar>

Introducción: Distintos trastornos clínicos (obesidad, diabetes mellitus) y psicológicos (estrés prolongado, ansiedad, depresión) cursan con niveles aumentados de ACTH. Hemos demostrado que el óxido nítrico (NO) es un modulador local de la esteroidogénesis adrenal y que la inducción de diabetes con estreptozotocina produce un incremento en la actividad de NO sintasa (NOS) en este tejido. OBJETIVO: Evaluar el efecto del tratamiento crónico con ACTH sobre la generación de NO, parámetros de esteroideogénesis y de estrés oxidativo adrenal. Diseño: Ratas Wistar macho adultas recibieron 20 UI/kg de ACTH de depósito cada 48 hs por vía i.p. (ACTHcr) o vehículo (CON) durante un mes tras lo cual se evaluó la corticosteronemia basal y 1 h tras ACTH aguda (7 UI/kg i.p.). Se midió actividad de NOS y parámetros de estrés oxidativo (TBARS y actividad de catalasa). Resultados: Los animales del grupo ACTHcr presentaron mayor peso corporal y peso adrenal corregido (CON: 104.7 ± 4.1 , ACTHcr: $122.5 \pm 0.9g$, $p = 0.03$ y CON: 99.6 ± 3.0 , ACTHcr: 113.6 ± 4.8 mg adrenal/kg rata, $p = 0.03$), y niveles aumentados de corticosteronemia basal y tras el estímulo con ACTH (CON: basal 42.2 ± 2.9 , postACTH 230.9 ± 22.5 $p < 0.001$ vs basal; ACTHcr: basal 107.4 ± 8.5 , $p < 0.05$ vs CON basal, postACTH 375.2 ± 18.6 ng/ml; $p < 0.001$ vs ACTHcr basal y vs CON postACTH). El estímulo crónico con ACTH incrementó los niveles de ARNm de StAR y la generación de estrés oxidativo (TBARS CON 27.6 ± 2.0 ; ACTHcr: 36.9 ± 1.6 μM MDA/mg proteína, $p = 0.01$), así como los niveles de expresión y la actividad de catalasa (CON: 15.8 ± 0.7 , ACTHcr: 19.9 ± 1.0 μM H₂O₂/min/ μg proteína). No se observaron diferencias significativas en la actividad de NOS. Conclusiones: El tratamiento crónico con ACTH produjo una hipertrofia de la corteza adrenal y una mayor producción basal y estimulada de esteroides sin afectar la actividad de NOS. La respuesta esteroidogénica a la estimulación aguda con ACTH no fue afectada por el estrés oxidativo asociado al tratamiento.

578 (547) INGAP DE HAMSTER Y REG-3b DE RATA: ¿DOS CARAS DE UNA MISMA MONEDA? Raschia M.¹; Flores L.²; Madrid V.³; Del Zotto H.⁴; Gagliardino J.⁵

CENEXA (Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada) (UNLP - CCT-La Plata - CONICET)^{1 2 3 4 5} <agus_raschia@yahoo.com.ar>

Antecedentes: el INGAP (Islet Neogenesis Associated Protein), aislado del páncreas de hámster, pertenece a la familia de proteínas Reg. INGAP-PP, un pentadecapéptido derivado del INGAP (aminoácidos 104-118), reproduce su efecto estimulador sobre la masa y función celular β . Si bien se han identificado proteínas similares, no se ha hallado INGAP en otras especies. Objetivo: determinar la posible existencia de INGAP o de una proteína similar en páncreas de rata. Metodología: analizamos la secuencia del ADNc y proteína del INGAP con los programas Blast y Clustal-W2. Empleando un anticuerpo específico determinamos la localización inmunohistoquímica (IH) del INGAP en páncreas de rata y hámster. Amplificamos el ADNc de islotes y páncreas de ambas especies por RT-PCR utilizando cebadores diseñados en base a la secuencia de INGAP (hámster), Reg3 β (rata) y un tercer par con bases degeneradas (DegRI) capaz de reconocer ambos ADNc; también secuenciamos el fragmento amplificado a partir de ADNc de rata con DegRI. Resultados: El INGAP y el Reg3 β de rata mostraron una homología del 68% (ADNc) y 58.5% (proteína). Los cebadores de INGAP sólo amplificaron el ADNc de hámster, mientras que los de Reg3 β y DegRI amplificaron en ambas especies. El análisis de la secuencia obtenida del fragmento amplificado a partir de ADNc de rata con DegRI arrojó una homología del 94% con Reg3 β y del 64% con INGAP. En ambas especies la expresión IH del INGAP sólo se manifestó en células insulares no β . Dado que la región reconocida por el anticuerpo presenta una homología del 84% entre ambas proteínas, no fue posible determinar si la proteína detectada era INGAP o Reg3 β . Conclusión: estos resultados sumados a la alta homología del INGAP-PP con el Reg3 β (85%), sugieren que el INGAP y el Reg3 β desempeñarían funciones similares pero, mientras que en el páncreas de hámster ambas proteínas coexistirían (redundancia funcional), en la rata sólo existiría el Reg3 β .

579 (616) ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN ADRENAL EN UN MODELO DE INSULINORRESISTENCIA GENERADO EN RATAS POR UNA DIETA RICA EN SACAROSA. Martínez Calejman C.¹; Di Gruccio J.²; Repetto M.³; Astor F.⁴; Sanchez R.⁵; Schreier L.⁶; Berg G.⁷; Cymeryng C.⁸; Arias P.⁹

Laboratorio de Endocrinología Molecular - Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA; CEFYBO-CONICET^{1 2 3 4 5}; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas (INFIBIOC), Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{6 7}; Laboratorio de Endocrinología Molecular - Departamento de Bioquímica Humana - Facultad de Medicina - UBA; CEFYBO-CONICET⁸; Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina, UBA⁹ <camilamartinezc@hotmail.com>

Se describe tanto en pacientes como en animales con insulinorresistencia (IR) una hiperactivación del eje hipotálamo hipófisis adrenal con mayor liberación de ACTH. Por otro lado, niveles circulantes aumentados de glucosa o ácidos grasos libres (AGL) y/o cambios en la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) podrían afectar directamente la esteroidogénesis (EG). Objetivos: evaluar el impacto de la IR generada en ratas Wistar macho adultas por una dieta rica en sacarosa (DRS, 30% p/v en el agua de bebida) sobre la corticosteronemia (CS) y la actividad de NOS adrenal así como analizar el efecto de concentraciones elevadas de glucosa y de AGL sobre la EG en células adrenocorticales. Resultados: a las 7 semanas de recibir la DRS se incrementaron el peso corporal y los depósitos lipídicos viscerales, epididimarios y adrenales. Los animales mostraron en ayunas niveles circulantes elevados de insulina (DRS 2.26 ± 0.11 vs. Control 0.29 ± 0.01 ng/ml; media \pm SEM; $p < 0.005$, test M-W), glucosa (DRS 130 ± 6 vs. Control 74 ± 5 mg/dl; $p < 0.001$), triglicéridos (DRS 276.3 ± 23.2 vs. Control 150.5 ± 15.4 mg/dl; $p < 0.001$) y CS (DRS 26.2 ± 0.66 vs. Control 8.2 ± 0.48 ng/ml; $p < 0.001$). También se detectó un aumento en la actividad de NOS adrenocortical (DRS 8.5 ± 0.7 vs. Control 3.1 ± 0.1 pmol/min/mg; $p < 0.001$). In vitro, sólo la incubación de células adrenocorticales Y1 con concentraciones elevadas de palmitato (80 μM) aumentó significativamente la pro-

ducción de esteroides. Conclusiones: la generación de IR por una DRS se acompaña de alteraciones histológicas y funcionales en la corteza adrenal. Por mecanismos no dilucidados el exceso de AGL circulantes y/o la liberación intraadrenal de mediadores asociados a la infiltración grasa podrían incrementar la secreción de CS. Niveles aumentados de NO podrían provocar modificaciones en proteínas involucradas en la EG y/o en su modulación. La posible contribución del exceso de glucocorticoides a la generación del estado de IR debe ser evaluada.

FARMACOLOGIA 2

580 (75) IDENTIFICACIÓN DE GLICOPROTEÍNA-P EN ESTADIOS LARVIARIOS DE ECHINOCOCCUS SP. Cumino A.¹; Nicolao M.²; Denegri G.³

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Área Biología Molecular de Cestodes, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP^{1 2 3} <acumino@gmail.com>

Las enfermedades parasitarias crónicas provocadas por helmintos afectan a los continentes más poblados del planeta. La echinococosis quística producida por los estadios larvarios de *Echinococcus granulosus* (Eg), es una de las enfermedades parasitarias de mayor importancia socioeconómica con amplia distribución mundial, sin una efectiva estrategia quimioterapéutica. Se ha demostrado un elevado efecto protoescolocida en Eg interfiriendo las funciones del ión calcio en sus diferentes niveles de regulación celular (Cumino et al., 2009). Estos fármacos presentan una estructura molecular diferente (esteroides, bloqueantes de los canales de calcio, opiáceos, anticancerosos, antibióticos y antipsicóticos), todos compuestos hidrófobos, posibles sustratos o inhibidores de la glicoproteínaP (Pgp). El objetivo de este trabajo es identificar Pgp en Eg, fosfoglicoproteína de transmembrana de la superfamilia de transportadores ABC, producto de expresión del gen *mdr* (multidrug resistance) que media el eflujo celular de drogas lipofílicas. Hemos identificado dos genes *mdr* en *E. multilocularis* (<http://www.sanger.ac.uk/>, contigs 0001877 y 0001914) y uno en Eg (EST EgCV679218 *mdr1*) cuyas secuencias de aminoácidos deducidas codifican proteínas con 75-90% de homología en sus dominios de transmembrana (con afinidad por ligandos lipofílicos) y citoplasmáticos (de unión a ATP). En protoescolocidos de Eg caracterizamos funcionalmente dicha proteína mediante determinaciones fluorométricas (fluoroskanII y microscopía confocal) en experimentos in vivo con calceína-AM y determinamos los niveles de expresión de *mdr1* a nivel transcripcional y traduccional en condiciones basales y bajo tratamiento farmacológico, demostrándose altos niveles de expresión en el cestode, coincidente con la expresión en células secretorias e indiferenciadas como en otros metazoos. Estos resultados contribuirán a interpretar resultados de efectividad terapéutica en experimentos in vitro e in vivo con éstos fármacos.

581 (113) RECUPERACIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE 25OH VITAMINA D EN RATAS ALIMENTADAS CON ERGOCALCIFEROL (D2) VS. COLECALCIFEROL (D3) EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA DE VITAMINA D Y OSTEOPENIA ESTABLECIDA. Gonzales Chaves M.¹; Marotte C.²; Pellegrini G.³; Mandalunis P.⁴; Friedman S.⁵; Zeni S.⁶

Sección Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas. UBA; Bioquímica General y Bucal. Facultad de Odontología. UBA. CONICET.^{1 2 3}; ACat. Histología y Embriología. Facultad de Odontología. UBA.⁴; Cat. Bioquímica General y Bucal. Facultad de Odontología. UBA.⁵; Sección Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas. UBA; Bioquímica General y Bucal. Facultad de Odontología. UBA. CONICET.⁶ <macagch@yahoo.com.ar>

Estudios en humanos sugirieron que el colecalciferol (D3) es casi dos veces más potente que el ergocalciferol (D2) para au-

mentar y mantener los niveles de 25OHD en suero cuando se administra por vía oral o intramuscular (J Clin Endocrinol Metab 93:3015,2008). Con el objetivo de determinar experimentalmente si se cumple dicha relación hemos realizado el siguiente estudio experimental utilizando nuestro modelo de insuficiencia de vit D y osteopenia establecida (Bone 39: 837-844, 2006). Se estudiaron 64 ratas Wistar adultas (200±50g), 32 de las cuales fueron ovariectomizadas (OVX) y 32 sufrieron una operación simulada (SHAM). La deficiencia nutricional de vitamina D se produjo con una dieta libre de la misma. A los 60 días se las dividió en 4 grupos, alimentados con una dieta conteniendo 200UI% de vitamina D2 ó D3: OVX + vitD2; OVX + vit D3; SHAM + vit D2; SHAM + vit D3. Al inicio de la experiencia (T:0) se tomaron aleatoriamente 4 animales de cada grupo para obtener un nivel basal de vitamina D (n=12). A T: 60, 85 y 105 días se determinaron niveles séricos de 25OHD (ng/ml) por RIA (^{125I} RIA Kit, DiaSorin, Stillwater, MN, USA). Los resultados de 25OHD fueron los siguientes (x ± ES): T:0: 19.2±0.3; T:60 OVX+D2: 7.5±0.9a, OVX+D3: 7.5±0.6a, SHAM+D2: 7.2±0.5a, SHAM+D3: 9.0±1.2a; T:85 OVX+D2: 24.9±1.5b, OVX+D3: 22.65±0.6b, SHAM+D2: 22.05±1.4b, SHAM+D3: 25.35±2.1b; T:105 OVX+D2: 23.25±0.3b, OVX+D3: 23.85±1.0b, SHAM+D2: 23.25±0.9b, SHAM+D3: 27±1.3b. Letras diferentes indican un p<0.05. Los resultados indican que no existieron diferencias en los niveles de 25OHD2 y 25OHD3 a los distintos tiempos estudiados. Conclusiones: Bajo nuestras condiciones experimentales, las vitaminas D2 y D3 suministradas diariamente presentaron la misma potencia para mantener y elevar la 25OHD, tanto en los animales con niveles estrogénicos normales como aquellos con depleción estrogénica. PIP6483.

582 (232) EXPRESIÓN DE EFECTORES DE SEÑALIZACIÓN DEL GUSTO AMARGO EN GLÁNDULA SUBMAXILAR MURINA Y CÉLULAS SCA-9. Dasso M.¹; Diez R.²; Sales M.³

Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA^{1 2}; CEFyBO-CONICET³ <maxdasso@yahoo.fr>

En mamíferos, la percepción del gusto amargo es mediada por receptores T2R (T2Rs) expresados en células gustativas, ubicadas en la superficie dorsal de la lengua, paladar y faringe. La unión de ligandos amargos activa la proteína G gustducina, resultando en la estimulación de fosfodiesterasas, guanilato ciclasas y fosfolipasa Cβ2 (PLCβ2). Recientemente se observó la expresión de T2Rs en tracto gastrointestinal y glándulas exócrinas. Los compuestos amargos teofilina (TEO), denatonio (DEN) y cicloheximida (estos dos últimos agonistas conocidos de T2Rs en células gustativas) inhiben la secreción de amilasa salival en glándula submaxilar murina (GSM) en forma concentración-dependiente, siendo 10⁻⁹ M la concentración inhibitoria máxima. Demostramos farmacológicamente que éste efecto se produce a través de la vía fosfolipasa C-óxido nítrico sintasa (NOS). Observamos por Western Blot (DO relativa a la expresión de la proteína gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) que T2R6 (DO= 10,06±2,48; n=2), la subunidad alfa de la proteína G inhibitoria Gαi (16,26±3,25; n=2) y PLCβ2 (2,19±0,35; n=2) están expresados en GSM. Por inmunohistoquímica vimos en GSM tratadas con TEO y DEN una atenuación en la inmunomarcación de amilasa con respecto al control, predominantemente en los ductos interlobulares. También observamos la presencia de T2R6 (3,61±0,90; n=2), Gαi (2,00±0,30; n=2) y PLCβ2 (2,37±0,52; n=2) en células SCA-9, derivadas de fibroblastos tumorales de GSM. Concluimos que la expresión de tales efectores en células SCA-9 permitiría estudiar in vitro la señalización de compuestos amargos, y que la inhibición de la secreción de amilasa en células ductales de GSM ocurriría por la vía T2R-Gαi-PLCβ2-NOS.

583 (233) LA ACTIVACIÓN MUSCARÍNICA MIMETIZA EL EFECTO DE UN ESTÍMULO INFLAMATORIO SOBRE COX-2 EN CÉLULAS NIH3T3. Español A.¹; Goren N.²; Ribeiro M.³; Sales M.⁴

CEFyBO-CONICET^{1 2 3 4} <aespan_1999@yahoo.com>

La inflamación es un proceso fisiológico que se desencadena como consecuencia de una injuria. El mismo se asocia con la activación del factor nuclear kappa B (NF- κ B) que regula la expresión de genes pro-inflamatorios como el de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). Es sabido que el sistema colinérgico no neuronal (SCnN) a través de la activación de los receptores muscarínicos (RM) regula el comportamiento biológico de distintos tipos celulares de origen no nervioso y la COX forma parte de su vía de señalización. El objetivo de este trabajo es comparar el efecto del agonista colinérgico carbacol (CARB) con el de un estímulo inflamatorio: lipopolisacárido (LPS) de *E. Coli* (10 ng/ml) e interferón γ (IFN γ) (0,5 ng/ml) (LPS+IFN γ), sobre la activación de la COX y su relación con la vía del NF- κ B en fibroblastos murinos NIH3T3. El CARB (10⁻⁸ M) fue más potente para incrementar la liberación de PGE₂ (1357 \pm 170, basal: 672 \pm 25, p<0,01) que el LPS+IFN γ (952 \pm 15, p<0,05 vs. basal) (CARB vs. LPS+IFN γ p<0,01). El efecto del CARB fue revertido por el tratamiento con el antagonista muscarínico atropina (10⁻⁶M). Además el tratamiento con el inhibidor del NF- κ B, MG-132 (2x10⁻⁵M), bloqueó la liberación de PGE₂ inducida por CARB o por LPS+IFN γ . La liberación de PGE₂ inducida por CARB o LPS+IFN γ fue revertida por NS-398 (10⁻⁵M) inhibidor selectivo de la COX-2. La expresión de esta enzima, que es la única presente en estas células, se incrementó por el tratamiento con LPS+IFN γ (51 \pm 5%; p<0,05 vs. basal) y con CARB (10 \pm 5%; N.S.). Concluimos que en estas células el agonista muscarínico se comportaría como un estímulo inflamatorio incrementando la actividad de la COX-2 vía RM, lo que resaltaría el papel de los fibroblastos y del SCnN como moduladores del proceso inflamatorio.

584 (817) ESTUDIO DE LA FARMACOCINÉTICA DE TOPOTECAN EN LA ADMINISTRACIÓN LOCAL, PERIUCULAR O INTRAVÍTREA, COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE RETINOBLASTOMA. Buitrago E.¹; Bramuglia G.²; Carcaboso A.³; Fandiño A.⁴; Lagomarsino E.⁵; Guitter M.⁶; Rose A.⁷; Manzitti J.⁸; Abramson D.⁹; Shaiquevich P.¹⁰; Chantada G.¹¹

¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; ²Hospital JP Garrahan, Buenos Aires, Argentina, ³Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA.¹ ; ¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires² ; ¹Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires³ ; ¹Hospital JP Garrahan, Buenos Aires, Argentina,^{4 5 6 7 8} ; ¹Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA.⁹ ; ¹Hospital JP Garrahan, Buenos Aires, Argentina,^{10 11} <buitragoemanuel@hotmail.com>

La administración sistémica de Topotecan (TPT) es utilizada en clínica pediátrica contra retinoblastoma (Rb) ya que puede atravesar la barrera hematoocular y alcanzar niveles significativos en humor vítreo. Debido a que la administración sistémica de TPT está asociada con una alta incidencia de eventos adversos, el objetivo de este trabajo es encontrar una alternativa para la administración de los quimioterápicos en niños que padecen la enfermedad, siendo la administración local periocular (PO) ó intravítrea (IVT) una alternativa por presentar una menor exposición sistémica del antineoplásico. Métodos: Se llevó a cabo un estudio de Fase I en 5 pacientes pediátricos con Rb con enucleación inminente. Luego de la administración PO de TPT, se obtuvieron muestras de sangre mediante punción venosa. El protocolo fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital Garrahan y por ANMAT. Por otro lado, se utilizaron conejos albinos a los que se les administró una única dosis (5 μ g) de TPT IVT. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción venosa, mientras que las de humor vítreo por punción del mismo a través de la región nasal inferior hasta 16 hs post-administración. Ambos casos las muestras fueron analizadas por HPLC. Resultados y Conclusiones: Luego de la administración de TPT IVT en conejos, se observaron niveles de TPT (media: 25 ng/ml) hasta las 16 hs post-administración. No se detectaron niveles sistémicos. Al analizar la administración en pacientes con Rb, sólo pudimos observar toxicidad en uno de los pacientes,

evidenciándose un ligero edema orbital. TPT fue detectado en plasma (AUC 50.4 ng/ml^h; 4 mg/m² dosis). TPT PO es una opción de tratamiento seguro para el Rb y su actividad debe ser ensayada en estudios de Fase II/III. La administración de TPT IVT en conejos mostró altas concentraciones de TPT que se mantuvieron por 16 hs, pudiendo ser una alternativa al tratamiento sistémico de TPT que deberá ser estudiado en futuros ensayos clínicos.

GASTROENTEROLOGIA 3

585 (160) EXPRESIÓN HEPÁTICA DE GENES ASOCIADOS A LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISOMAS-PPARS Y LA REGULACIÓN DE FENOTIPOS INTERMEDIOS DEL SÍNDROME METABÓLICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATOSIS HEPÁTICA INDUCIDO POR DIETA RICA EN GRASA. Rosselli M.¹; Burqueño A.²; Carabelli J.³; Pirola C.⁴; Sookoian S.⁵

Instituto de Investigación Médica A. Lanari (IDIM) CONICET^{1 2 3 4 5} <soleross@yahoo.com.ar>

La enfermedad grasa del hígado de etiología no alcohólica (NAFLD) resulta de la acumulación de triglicéridos en el hígado y se asocia con el síndrome metabólico. Su patogénesis es compleja y poco se conoce del papel del hígado en la regulación de los fenotipos intermedios de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es caracterizar la expresión hepática de genes relacionados con los PPARs en un modelo experimental de NAFLD inducido por dieta rica en grasa (DG) y evaluar su relación con parámetros biométricos, bioquímicos e histológicos. Se usaron en total 15 ratas Sprague-Dawley macho sometidas a DG durante 8 semanas la cual indujo exitosamente NAFLD y 10 ratas alimentadas con dieta estándar (C), en 2 experimentos. La expresión del mRNA de PEPCK1, PPAR α , PPAR γ , PGC1 α , CPT1, TFAM, SREBP1c, TNF α , SIRT1, FOXO1 α , PAI-1 y COX-IV1 se evaluó mediante PCR en tiempo real y se relativizó usando ciclofilina. Se determinaron al finalizar el experimento enzimas hepáticas, resistencia a la insulina (HOMA), perfil lipídico, parámetros biométricos, presión arterial y consumo de alimentos. Para la evaluación de la enfermedad grasa del hígado se utilizó el score de Brunt. Resultados: el peso de los animales al final del experimento y el peso del tejido adiposo correlacionaron con la expresión hepática del PGC1 α (R-0.42, p<0.0003 y R-0.40, p<0.0005). La glucemia correlacionó significativamente con la expresión de PEPCK (R - 0.50, p<0.000005), PGC1 α (R -0.50 p<0.00006) y COX-IV1 (R 0.63, p<0.000001); el HOMA con PGC1 α (R-0.34 p<0.004). El score de esteatosis se asoció con el peso del tejido adiposo (p<0.008) y con la expresión de PEPCK (p<0.001). En conclusión, en el modelo de DG el desarrollo de NAFLD este fuertemente ligado a la obesidad. La expresión hepática de PGC1 α y PEPCK1 juegan un papel importante en el mantenimiento de los fenotipos intermedios de la NAFLD y en el desarrollo de la enfermedad.

586 (190) MODULACIÓN POR SALBUTAMOL (S) DE LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRADIOL-17 β -GLUCURÓNIDO (E) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR). Zucchetti A.¹; Barosso I.²; Ochoa E.³; Croceni F.⁴; Sánchez Pozzi E.⁵

Instituto de Fisiología Experimental^{1 2 3 4 5} <zucchetti@ifisconicet.gov.ar>

AMPc previene de la colestasis por E. Los niveles hepáticos de AMPc son regulados, en parte, por agonistas adrenérgicos los cuales actúan mediante el receptor β 2. En DAHR se evaluó la acción del agonista β 2, S sobre la alteración por E de la función de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2. Se corroboró la participación del receptor β 2 con el antagonista β 2 adrenérgico butoxamina (B). Finalmente se estudió la dependencia de la protección de PKA (inhibidores KT5720 y H89) y de microtúbulos

(inhibidor colchicina, C). Se obtuvieron DAHR por perfusión con colagenasa seguida de elutriación. Luego de 5 hs de cultivo se realizaron los siguientes experimentos: 1) Incubación 15min con S (10 μ M), seguido de incubación 20 min con E (50 μ M) o solvente y finalmente expuestas 15min a colil lisil fluoresceína (CLF, 2 μ M, sustrato de Bsep) y clorometil fluoresceína diacetato (CMFDA, 2,5 μ M, cuyo metabolito, GMF, es sustrato de Mrp2). Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CLF (cvaCLF) o GMF (cvaGMF). 2) Pre-incubación 15min con B (5 μ M) y luego se siguió igual que en 1). 3) Pre-incubación 30min con C (1 μ M) y luego se siguió igual que en 1). 4) Pre-incubación 15min con KT5720 (50nM) ó H89 (200nM) y luego se siguió igual que en 1). Resultados (media \pm ES): E redujo la cvaCLF y cvaGMF. S previno parcialmente, recuperando significativamente la reducción causada por E. B y C inhibieron la acción de S. En cambio KT5720 y H89 no inhibieron la acción de S.

Cva	Control	E	E-S	E-S-B	E-S-KT5720
E-S-H89	E-C	E-S-C			
CLF	100 \pm 0	52 \pm 2a	77 \pm 3b	57 \pm 6a	74 \pm 1b
71 \pm 1b	48 \pm 2a	48 \pm 3a			
CMFDA	100 \pm 0	64 \pm 2a	84 \pm 5b	64 \pm 3a	76 \pm 1b
78 \pm 3b	56 \pm 2a	55 \pm 3a			

^adiferente significativamente de control (p<0.05, n=3)

^bdiferente significativamente de control y de E, E-S-B y E-S-C (p<0.05, n=3)

Conclusión: S, protege parcialmente de la alteración funcional producida por E por un mecanismo en el que interviene el receptor adrenérgico β 2. Este mecanismo es a su vez independiente de PKA y dependiente de microtúbulos.

587 (388) ROL DE LA PROTEÍNA DE ANCLAJE DE PKA AKAP350 EN LA POLARIZACIÓN DE CÉLULAS HEPÁTICAS. Larocca M.¹; Mattaloni S.²; Ferretti A.³

Instituto de Fisiología Experimental, Fac. Cs. Bioq. Farm., CONICET-UNR^{1 2 3} <larocca@ifise-conicet.gov.ar>

El establecimiento de la polaridad basolateral/canalicular es un proceso finamente regulado, de importancia para las distintas funciones del hepatocito. La proteína quinasa A (PKA) estimula la biogénesis canalicular por mecanismos no totalmente comprendidos. La proteína de anclaje de PKA AKAP350 ensambla complejos proteicos que modulan la dinámica del citoesqueleto. Nuestro objetivo fue analizar si AKAP350 interviene en la generación y mantenimiento de polaridad en células hepáticas. Metodología: Generamos células HepG2 con 60-80% de disminución en la expresión de AKAP350 (AKAP350-) utilizando RNA de interferencia, y células HepG2 con delocalización centrosomal de AKAP350 (PACT) mediante transfección con el plásmido que codifica el dominio de localización centrosomal de AKAP350 fusionado a GFP, pEGFP-PACT. La localización de AKAP350, PKA y la proteína canalicular MRP2, y la estructura del citoesqueleto de actina en células HepG2 se analizó por microscopía confocal de inmunofluorescencia. El análisis morfológico se realizó usando el programa Image J. Resultados: AKAP350 y PKA mostraron colocalización en centrosomas de localización sub-canalicular. Las células hepáticas polarizadas contienen estructuras densas de actina que corresponden a citoesqueleto pericanalicular. Los grupos AKAP350- y PACT presentaron menor proporción de células con estas estructuras que sus respectivos controles (C) (C: 56 \pm 4 % vs AKAP 350-: 44 \pm 2 %*; C: 50 \pm 2 % vs PACT: 29 \pm 4 %*, *p<0,05), y disminución en la localización canalicular de MRP2 (AKAP350-: -41 \pm 8 %*; PACT: -20 \pm 2 %*; *p<0,01). Resultados similares se obtuvieron inhibiendo la formación de filamentos de actina submembrana con citocalasina B. Conclusión: AKAP350 recluta a PKA en un complejo proteico centrosomal de localización sub-canalicular, que interviene en la polarización de células hepáticas. El mecanismo involucrado podría comprender

la regulación de la dinámica del citoesqueleto apical de actina por proteínas de este complejo.

588 (521) FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA (PI3K) PREVIENE LA COLESTASIS POR ESTRADIOL 17 β -GLUCURÓNIDO (E217G): PARTICIPACIÓN DE AKT Y COOPERATIVIDAD CON PROTEÍNA QUINASA C DEPENDIENTE DE CA 2+ (PKCC). Boaglio A.¹; Zucchetti A.²; Sanchez Pozzi E.³; Mottino A.⁴; Crocenzi F.⁵; Roma M.⁶

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)^{1 2 3 4 5 6} <acboaglio@yahoo.com>

E₂17G induce colestasis aguda y reversible, produciendo endocitosis de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2 vía activación de PKC α y PI3K. En este trabajo, indagamos en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) si el efector cascada abajo de PI3K Akt está involucrado y si las vías PI3K y PKC α actúan cooperativamente. La inhibición farmacológica de Akt previno la disminución por E₂17G en la acumulación apical de CLF y GS-MF, sustratos fluorescentes de Bsep y Mrp2. El inhibidor de PI3K wortmanina (WM) y el de PKC α G γ 6976 previnieron aditivamente alteraciones en la acumulación de CLF y GS-MF, así como la endocitosis de los transportadores Bsep y Mrp2, indicando existencia de dos mecanismos de acción diferentes, uno probablemente endocitando transportadores (PKC α) y otro impidiendo su reinserción (PI3K). Para confirmar esta presunción, y dado que la reinserción pero no la endocitosis depende de microtúbulos, evaluamos la participación diferencial de los mismos en la prevención provista por G γ 6976 y WM. Colchicina (desorganizador de microtúbulos) impidió que WM previniera la disminución de la acumulación canalicular de CLF y GS-MF inducida por E₂17G, mientras que no afectó la capacidad de G γ 6976 para prevenir estas alteraciones, un hallazgo confirmado por inmunolocalización de Bsep y Mrp2. En el modelo de hígado aislado y perfundido de rata, G γ 6976 previno la disminución inicial del flujo biliar y de la excreción de glutation (sustrato de Mrp2) y de [³H]-taurocolato (sustrato de Bsep) inducida por E₂17G, un proceso que refleja endocitosis de transportadores. WM, en cambio, aceleró la recuperación de la función secretora de esos transportadores a la normalidad, indicativo de una acelerada reinserción de Bsep y Mrp2. Concluimos que la colestasis por E₂17G involucra la acción cooperativa de las vías de señalización PI3K-Akt y PKC α , promoviendo internalización de transportadores canaliculares (PKC α) y su posterior retención intracelular (PI3K).

589 (628) EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO (RE) EN LA ALTERACIÓN DE LA EXCRECIÓN DE SALES BILIARES INDUCIDA POR ESTRADIOL-17 β -D-GLUCURÓNIDO (E) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR). Barosso I.¹; Zucchetti A.²; Taborda D.³; Crocenzi F.⁴; Sánchez Pozzi E.⁵

Instituto de Fisiología Experimental (IFISE- Conicet)^{1 2 3 4 5} <barosso@ifise-conicet.gov.ar>

La activación del RE participa en efectos del estradiol tales como la activación de moléculas de señalización intracelular: PKC y PI3K. Ambas quinasas participan en la colestasis por E, su derivado glucuronizado, por lo que fue de interés evaluar el rol de RE en esta patología. La activación del RE se manifiesta por su fosforilación en ser118 y puede ser bloqueada por ICI 182780 (ICI). Métodos: Estudios funcionales: DAHR fueron tratadas con concentraciones crecientes de E (25-400 μ M) en presencia de ICI (1 μ M) y luego expuestas a colil-lisilfluoresceína (CLF, análogo fluorescente de sales biliares). Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CLF (cvaCLF). Activación de RE: Membranas totales de hepatocitos tratados con E (100 μ M) por 15 min fueron sometidas a Western blot (Wb) y reveladas con anti-RE fosforilado en ser118. Resulta-

dos (n=3): Las curvas concentración-respuesta mostraron que ICI aumentó IC50 de E (163±5µM vs 93±5µM, p<0.05). Wb reveló que E aumentó fosforilación de RE (Control: 100±0%, E: 335±19%, p<0.05). Dado que PKCα participa de la colestasis por E se analizó si el RE y PKCα compartían la misma vía o son activados independientemente. Para esto se evaluó el efecto conjunto de ICI y Gγ6976 (1µM), inhibidor de PKCα en cvaCLF y se evaluó el nivel de activación de PKC inducida por E (100µM) en presencia de ICI estimada por la translocación de PKC a membrana medida por Wb. ICI (44±7%, p<0.05) y Gγ6976 (42±3%, p<0.05) lograron el mismo grado de protección frente a E (32±3%, C:54±5%), la cual no mejoró en presencia de ambos (43±2%, p<0.05). Sin embargo, ICI no previno la activación de PKC inducida por E (%PKC en membrana: E:96±5%, E+ICI:92±5% Control:36±7%). Conclusiones: E activa el receptor de estrógenos y su bloqueo previene la colestasis. RE compartiría la vía de señalización con PKC aunque el bloqueo de RE no modifica la activación de PKC por lo que la unión de E a RE no sería previa a la activación de PKC.

INMUNOLOGIA 11

- 590 (631) EFECTO DEL LPS BACTERIANO SOBRE EL FENOTIPO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS Y EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE INMUNIDAD.** Leimgruber C.¹; Quintar A.²; Sosa L.³; Maldonado C.⁴

Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba.^{1 2 3 4}
<carolinaleimgruber83@gmail.com>

Previamente demostramos que las células musculares lisas (CML) prostáticas responden *in vivo* a infección bacteriana aguda con hipertrofia y expresión de TLR4. Debido a la importancia de la integridad de la capa muscular periacinar en la homeostasis y funcionalidad de la glándula, nuestro objetivo fue estudiar *in vitro* la respuesta de CML prostáticas a LPS, endotoxina de bacterias Gram negativas. Se realizaron cultivos primarios de células prostáticas de ratas Wistar con medio MCDB 131, específico para células estromales; al 6º día de proliferación, los cultivos fueron tratados con TGFβ₁ por 3 días para favorecer la diferenciación de las CML; luego se estimularon con LPS en concentraciones de 0.1, 1, 10 o 100 µg/ml durante 24hs. Los cultivos fueron procesados para análisis morfológico por microscopía óptica y electrónica, y para inmunocitoquímica (ICQ) y Western Blot de α-actina de músculo liso y vimentina. Las células controles mostraron una forma poliédrica e inmunoreactividad para α-actina. En respuesta a LPS y en forma dosis dependiente, las células se hicieron más alargadas, con mayor expresión de α-actina y de vimentina (ANOVA p<0,01 vs. control); en correlación, se observó gran desarrollo de organelas de síntesis proteica. Considerando estos hallazgos, se analizó la expresión de moléculas de inmunidad innata. Por ICQ se observó que LPS estimuló la expresión de TLR4 y de IL1β, particularmente a partir de la dosis de 1 µg/ml; por ELISA, se evidenció secreción de TNFα al sobrenadante, que alcanzó el máximo en la dosis más alta de LPS (ANOVA p<0,001vs control). Estas observaciones indican que las CML prostáticas responden a LPS con reorganización del citoesqueleto y activación celular hacia un fenotipo secretor. La expresión de moléculas de inmunidad innata evidencia que las CML tendrían un rol importante en la defensa de la glándula contra patógenos, que sin embargo podría comprometer la preservación de la estructura acinar.

- 591 (491) LA RESPUESTA INFLAMATORIA AL LIPOPOLISACÁRIDO ES MODULADA POR LA PROGESTERONA EN LINFOCITOS DE RATONAS NO PREÑADAS.** Wolfson M.¹; Vercelli C.²; Aisemberg J.³; Billi S.⁴; Franchi A.⁵

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos^{1 2 3 4 5}
<manuwolfson@gmail.com>

Diversas moléculas proinflamatorias tienen efectos duales en los eventos reproductivos ya que su síntesis es necesaria para que ocurran, pero cuando su producción está aumentada son nocivas para estos procesos. Entre ellas se encuentran el Oxido Nítrico (NO) y los endocannabinoides. Estos últimos compuestos son los análogos endógenos del THC, principio activo de la marihuana. Se ha demostrado una relación entre niveles elevados de Anandamida (AEA, principal endocannabinoide estudiado) y una baja actividad y expresión de la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH, enzima que metaboliza la AEA) con los abortos recurrentes en mujeres. Hemos observado que el lipopolisacárido (LPS) no modifica la actividad de la FAAH en linfocitos de animales preñados, pero sí la disminuye en animales no preñados. El objetivo de este trabajo fue estudiar el posible efecto protector de la progesterona (P) en linfocitos de ratones no preñados. Para ello, ratones hembra BALB/c fueron inyectados con a)vehículo, b)P, c)LPS, d)P+LPS o e)P+LPS+RU486. Encontramos que el tratamiento con LPS disminuye tanto la actividad (radioconversión) como la expresión (western blot, WB) de la FAAH (p<0,05), mientras que la P revierte los efectos de la endotoxina (p<0,05) y que el RU486, antagonista de los receptores de P, inhibe el efecto protector de la P sobre la actividad de la FAAH (p<0,05). La P también bloquea el efecto inductor del LPS sobre la expresión de la NOSintasa inducible (WB) (p<0,05) y la administración de RU486 revierte la protección de la P (p<0,05), sugiriendo la participación de sus receptores nucleares. Se determinó la presencia de los receptores de P (PRA y PRB) por RT-PCR y WB en linfocitos murinos de sangre periférica. Los resultados muestran la presencia de ambos receptores y que el LPS altera la relación PR-B/PR-A (p<0,05), hecho también revertido por la P (p<0,05). Estos resultados sugieren que la P, a través de sus receptores clásicos, modula la síntesis de moléculas proinflamatorias.

- 592 (797) ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE DOMINIO ÚNICO, BUENOS CANDIDATOS PARA EL DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES.** Alzogaray V.¹; Doña V.²; Chirido F.³; Goldbaum F.⁴; Urrutia M.⁵

Instituto Leloir¹; Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune - LISIN. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP. La Plata.^{2 3}; *Instituto Leloir^{4 5}* <urrugada@yahoo.com>

Cantidades residuales de agentes reductores y/o desnaturalizantes utilizados en el proceso de extracción de analitos suelen interferir con la determinación cuantitativa en los inmunoensayos. Así ocurre en la certificación de alimentos para celiacos, quienes necesitan una dieta libre de gliadinas (proteínas de trigo). Los camélidos (camellos, dromedarios, llamas) producen anticuerpos (acs) inusuales compuestos solo de cadenas pesadas, siendo su sitio de unión al antígeno solo la región variable de la cadena pesada (VHHs). Dada la alta estabilidad de Iso VHHs, el objetivo de este trabajo fue la generación de una biblioteca de fragmentos VHH y la selección de clones reactivos en condiciones desnaturalizantes. Partiendo del cDNA aislado de linfocitos de sangre periférica de llamas inmunizadas con gliadinas (GD) se generó una biblioteca de fragmentos VHHs con alta diversidad, conteniendo 8x10⁷ clones. El panning y la selección de la biblioteca se realizó mediante la técnica de display en fagos. Ensayos de unión por ELISA nos permitieron aislar clones con capacidad de unirse a GD. La estabilidad de estos clones se evaluó por ELISA indirecto incubándolos en presencia de etanol (Et), 2-mercaptoetanol (2ME), cloruro de guanidinio (G). Cuatro clones fueron estables en Et 15% y mostraron más de un 50% de reactividad en presencia de 0.5% 2ME y 0.5 mM G. El clon 26, tuvo capacidad de reconocer al antígeno aún en presencia de Et 15%, 2ME 0.5%, G 0,5M. Los cuatro VHHs seleccionados mostraron secuencias muy similares con CDR3s largos y dos cysteínas (cys) extras en el CDR3, separados por solo 4 residuos. Estas cys forman un puente disulfuro, disminuyendo la flexibilidad del loop, contribuyendo así a la estabilidad de estos VHHs. Se mencionaron otros VHHs altamente estables en otras condiciones desnaturalizantes. Los resultados indican que los VHH a diferen-

cia de los acs convencionales son buenos candidatos para el reconocimiento de antígenos en condiciones desnaturalizantes.

593 (728) DENDRITIC CELLS FROM OLD MICE HAVE A DIMINISHED CAPACITY TO ACTIVATE CD8+ T CELLS.

Zacca E.¹; Crespo M.²; Rufail M.³; Maletto B.⁴; Pistoressi M.⁵; Morón G.⁶

CIBICI-CONICET, Fac. Ciencias Químicas, UNCórdoba^{1 2 3 4 5 6} <ezacca@fcq.unc.edu.ar>

During aging, B and T cells manifest changes that affect their response to antigens (Ag). However, it is practically unknown how dendritic cells could participate in these changes. We have previously reported that DCs from 18/20-month-old mice (old, o) had a diminished ability to mature in the presence of LPS as well as a lower capacity to cross present in vitro Ovalbumin (OVA) to an OVA-specific, MHC I restricted hybridoma (B3Z cells) compared to 2/3-month-old mice (young, y). We first studied the content of DCs in lymphoid organs. We found the following values (young vs old mice): popliteal lymph node (LN), 0.6 ± 0.3 vs 0.7 ± 0.5 (ns); mesenteric LN, 1.7 ± 0.6 vs 3 ± 1 (ns); spleen, 1.9 ± 0.2 vs 1.2 ± 0.2 ($p < 0.001$); bone marrow, 2.1 ± 0.4 vs 5.8 ± 0.6 ($p < 0.0001$); liver, 3 ± 1 vs 6 ± 4 (ns). Then we tested the ex vivo capacity of DC to cross-present OVA in old mice. We injected i.v. OVA coupled to latex beads and 2 hs later we purified the splenic DC from young and old mice and incubated them with B3Z cells. We found that oDCs had a very limited capacity to activate the hybridoma, compared to yDC. Then, we tested the capacity to activate naïve T cells, cultivating T cells from young OT-I mice with oDC or yDC incubated in vitro with OVA+PolyU/DOTAP. oDC stimulated a less stronger proliferative response (yDCs vs oDCs, 76.4 ± 4.5 vs 16.0 ± 15.1 % of OT-1 T cells in proliferation), CD25 expression (61.1 ± 18.5 vs 17.0 ± 10.3 % of OT-1 T cells) and IFN γ secretion (11.6 ± 5.4 vs 2.6 ± 1.1 ng/mL) than yDC in OT-I T cells. Finally, we also found in the spleen of old mice 2 hs after injection i.v. with latex beads coupled to yellow green (YG), a lower proportion of YG+ DCs than in young mice. Altogether, these findings show that in spleen of old mice there is a lower content of DCs, which have a lower capacity to activate T cells than DCs from young mice. This deficiency could be related to a lower ability to capture Ag in vivo.

593b (535) INFLUENCIA DE UN ENTORNO INFLAMATORIO EN EL CRECIMIENTO DEL CÁNCER PROSTÁTICO. A A

Quintar 1, C Leimgruber 1, M Maccioni 2, C A Maldonado 1

1Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. 2CIBICI-CONICET, Dpto Bioquímica Clínica. Facultad de Cs. Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. <amado_quintar@yahoo.com.ar>

Existe abundante evidencia confirmando que el microambiente estromal en el cual se desarrollan los tumores epiteliales influencia profundamente la progresión de los mismos. Nuestro objetivo general es analizar el crecimiento de tumores prostáticos en estromas modificados por estímulos inflamatorios. Para tal fin, desarrollamos primero un modelo de prostatitis crónica (PCr) en ratas Copenhagen inoculando intraprostáticamente 107 UFC de E.coli y analizando la glándula a 28 días posteriores (PCr). El infiltrado inflamatorio fue confirmado por análisis histológico e inmunocitoquímico y consistió principalmente de células CD3+, CD8+ y en menor medida CD4+ y CD11b/c+ esparcidas ampliamente en el intersticio estromal. Asimismo, hubo hipertrofia y activación de la capa muscular periacinar α -actina+. Tanto los cultivos bacterianos como la inmunocitoquímica arrojaron resultados negativos para E.coli, indicando la ausencia de la bacteria en la cronicidad de la prostatitis. Posteriormente, se realizó implante ortotópico de la línea tumoral prostática MatLu (106 células por rata) en animales singénicos normales (MatLu) o con prostatitis crónica (PCr+MatLu). Luego de 20 días de crecimiento, se extrajo la próstata con el tumor y otras glándulas accesorias, que se

analizaron morfológicamente y por inmunocitoquímica, determinándose la incorporación de BrdU como índice de proliferación celular. El peso de la masa tumoral fue levemente inferior en PCr+MatLu, con una considerable disminución en la tasa mitótica y de células BrdU+ ($p < 0,01$ vs. MatLu). Los tumores desarrollados en PCr+MatLu presentaron además heterogeneidad en las poblaciones celulares intratumorales; con abundantes células fusiformes α -actina+ y un alto número de células infiltrantes CD3+ y CD8+ en comparación con MatLu. Estos datos sugieren que la inflamación crónica inducida por bacterias produce cambios en el microambiente estromal que origina señales inhibitorias para el crecimiento de tumores prostáticos.

ONCOLOGIA 8

594 (708) COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR CONFIEREN RESISTENCIA AL TAMOXIFENO MEDIANTE DIFERENTES MECANISMOS DE ACCIÓN. Pontiggia O.¹; Raffo D.²; Bal De Kier Joffé E.³; Simian M.⁴

Instituto de Oncología Angel H.Roffo^{1 2 3 4} <osvaldopontiggia@yahoo.com.ar>

Previamente demostramos que en el modelo LM05-MIX, derivado de un tumor mamario murino estrógeno dependiente, la población fibroblástica confiere a la epitelial resistencia al tamoxifeno (TAM), siendo componentes de matriz extracelular como la fibronectina (FN) y la laminina (LN) responsables de mediar este efecto protector. El objetivo de este trabajo fue investigar qué vías de señalización están involucradas en la inducción de resistencia y evaluar si el mismo mecanismo de acción media el efecto de la FN y la LN. Se sembraron células de la línea epitelial LM05-E sobre placas previamente cubiertas con LN o FN y se trataron con 1% SFBch + estradiol (10^{-8} M), con o sin 4-OH-TAM (10^{-6} M) más el agregado de inhibidores específicos de vías de señalización: de MAPK/ERK1/2 (PD98059; 10mM), de la vía PI3K/AKT (LY294002; 10mM), del receptor de factor de crecimiento epidérmico EGFR (AG1478; 6.4nM), MMPs (GM6001; 10mM) o el anticuerpo bloqueante de β 1-integrina (AIIB2; 0,15mM). Se midió muerte celular por marcación con iodo de propidio a las 48 horas. Se encontró en el caso de la FN que AIIB2 ($P < 0.01$), PD ($P < 0.001$) y LY ($P < 0.001$) fueron capaces de revertir la protección al TAM. Para la LN, se observó reversión al inhibir la vía PI3K/AKT ($P < 0.001$) o mediante la incubación con AG1478 ($P < 0.001$) o GM6001 ($P < 0.001$). Estos últimos dos inhibidores no tuvieron efecto sobre la resistencia mediada por FN. Estos datos sugieren que la resistencia inducida por FN involucra a la β 1-integrina río arriba. En el caso de la LN el efecto sería mediado por otra integrina en conjunto con mecanismos autócrinos y/o parácrinos que desencadenarían la activación de EGFR. Estos resultados confirman que el microambiente tumoral modula la respuesta a tratamientos hormonales. Además, sugieren que la resistencia se debe a múltiples factores que generan la activación de diferentes vías de escape. Este trabajo es apoyado por la Fundación Susan G. Komen for the Cure (MS, BCTR0600341).

595 (392) EFECTO INHIBITORIO DE ESTRÓGENOS EN CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL: EFECTO DE AGONISTAS ESPECÍFICOS DEL RECEPTOR DE ESTROGENO ALFA Y BETA. Wargon V.¹; Soldati R.²; Giulianelli S.³; Cerliani J.⁴; Do Campo P.⁵; Molinolo A.⁶; Vollmer G.⁷; Vanzulli S.⁸; Lanari C.⁹

IBYME^{1 2 3 4 5}; NIH, USA⁶; Technische Universität Dresden, Alemania⁷; Academia Nac. de Medicina⁸; IBYME⁹ <wargon@dna.uba.ar>

Los estrógenos pueden estimular o inhibir el crecimiento del cáncer de mama. En el laboratorio desarrollamos carcinomas mamaros murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona, que expresan receptores de estrógenos (RE) *alfa* (a) y *beta* (b), y receptores de progesterona (RP), cuyo crecimiento es inhibido

por 17- β -estradiol (E2). Habíamos demostrado *in vitro*, que tanto el agonista de REa 4,40,400-(4-propyl-(1H)-pyrazole-1,3,5-tryl)trisphenol (PPT) ó el del REB (4-hydroxy-phenyl)-propionitrile (DPN) inhibían el crecimiento de células epiteliales C4-HI. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto específico de los agonistas *in vivo* usando los tumores C4-HI y 32-2-HI. Se trataron ratones portadores de tumores sc (7/grupo) con E2, PPT o DPN (3mg/kg/día) por 2 semanas. Tres tumores por grupo fueron extirpados a las 24-72 hs y se evaluó morfología, índice mitótico y apoptótico, y la expresión de RE, RP, y proteínas apoptóticas por inmunohistoquímica. Los 3 compuestos mostraron efectos inhibitorios durante las primeras 72 horas de tratamiento ($p < 0.01$). Luego sólo el PPT inhibió el crecimiento tumoral aunque menos que el E2. Se observaron cambios morfológicos asociados a regresión y un incremento en el índice apoptótico ($p < 0.001$) con todos los tratamientos. El índice mitótico disminuyó en tumores tratados con E2 y PPT ($p < 0.001$). Todos presentaron un aumento en la expresión de Bax, ($p < 0.001$), laminina e integrina $\alpha 6$ y una disminución significativa en la expresión de REa, Bcl-x1 y Bcl-2 ($p < 0.001$). El aumento en la expresión del factor inductor de apoptosis (AIF) fue específico para DPN y la activación de caspasa 9 específica de PPT ($p < 0.001$). Demostramos la participación de la vía intrínseca de apoptosis en la inhibición tumoral mediada por REa y la superioridad terapéutica del PPT sobre el DPN *in vivo*, no detectada *in vitro*, sugiriendo la participación de cambios sistémicos inducidos por DPN que podrían estimular el crecimiento tumoral.

596 (663) DESARROLLO DE UN MODELO MURINO PARA EL ESTUDIO DEL FEOCROMOCITOMA (FEO). Fernández M.¹; Venara M.²; Nowicki S.³; Chemes H.⁴; Barontini M.⁵; Pennisi P.⁶

Centro de Investigaciones Endocrinológicas (CEDIE)^{1 2 3 4 5 6} <mfernandez@cedie.org.ar>

Previamente mostramos que la expresión de IGF-1R está elevada en Feos malignos humanos respecto de benignos, lo que sugiere un posible rol del sistema IGF/IGF-1R en la patogenia de esta neoplasia. Es sabido que el desarrollo de modelos murinos es de gran utilidad en el estudio del cáncer. Sin embargo, en el caso del Feo esto ha sido menos explorado. Objetivo: Desarrollar un modelo experimental para el estudio de Feo, utilizando una línea celular murina de feocromocitoma (MPC) en ratones inmunocompetentes. Diseño: Se cultivaron MPC en medio RPMI completo. Los niveles de IGF-1R, PY20, pAKT, AKT, p42/44 y ERK fueron estudiados por Western Blot en condiciones basales y bajo estímulo de IGF-1 (20nM). Se evaluó la proliferación en medio completo (RPMI 5% SFB, 10% SC) y con bajo suero (RPMI 0.5% SFB, 1% SC) con y sin estímulo de IGF-1 100 nM o 50 nM por 7 días. Se inyectaron ratones machos C57B6 de 6 a 8 semanas de edad ($n=22$) con 10⁶ MPC, por vía subcutánea y se registró peso, glucemia y crecimiento tumoral. Se recolectó orina de 12 horas para dosaje de catecolaminas, previo al sacrificio. Resultados: *In vitro*: se observó fosforilación de IGF-1R, AKT y ERK a los 5' de estímulo con IGF-1 y proliferación de MPC sólo en medio completo (basal). En el día 5 de cultivo se observó mayor número de células bajo estímulo de IGF-1 vs basal ($p=0,03$; $p=0,009$ ambas condiciones respectivamente). *In vivo*: todos los ratones desarrollaron tumores a partir de la semana 5, con histología de Feo. Los niveles de catecolaminas plasmáticas y urinarias se elevaron 10 veces por encima del control. Conclusión: Las células MPC expresan el IGF-1R que es funcional y cuya activación estimula la proliferación celular *in vitro*. Cuando son inyectadas en ratones inmunocompetentes las MPC son capaces de proliferar y generar tumores con características histológicas y secretorias de Feo. Estos resultados indican que el modelo es adecuado para el estudio de la biología del Feocromocitoma.

597 (686) INHIBIDORES DE MAPK Y NF-KB INDUCEN MUERTE AUTOFÁGICA Y APOPTÓTICA EN UNA LÍNEA TUMORAL PANCREÁTICA. Papademetrio D.¹; Simunovich T.²; Lombardo T.³; Cavaliere V.⁴; Costantino S.⁵; Álvarez E.⁶

Facultad de Farmacia y Bioquímica, cátedra de Inmunología, UBA^{1 2 3 4 5 6} <dpapademetrio@ffyba.uba.ar>

Las terapias antineoplásicas actuales frente a los tumores de páncreas están dirigidas a inhibir el crecimiento celular pero no logran inducir muerte. Varios tumores ponen en juego a la autofagia como mecanismo de resistencia frente a estímulos pro-apoptóticos. Nos proponemos evaluar si la línea celular PANC-1, que utiliza como mecanismo de resistencia a la autofagia, muere frente a la exacerbación de este mecanismo por UO126, inhibidor de MEK1/2, y CAPE, inhibidor de NF- κ B, y analizar si estas drogas logran inducir apoptosis post-inhibición de la autofagia. La capacidad de estas drogas de inducir muerte celular se determinó por anexina V-FITC/IP. El tratamiento con UO 10 μ M indujo valores de células anexina+ del (33,2 \pm 4,1)% y CAPE 180 μ M, del (26,6 \pm 3,2)%, luego de 4 días. Se realizaron ensayos similares pretratando a las células con 10mM de 3-MA (3-metil-adenina) inhibidor de la autofagia, obteniéndose valores similares. Del análisis morfológico por tinción con FDA/IP se observó que la muerte inducida por los inhibidores era compatible con un fenotipo autofágico, mientras que las células pretratadas con 3-MA, morían por apoptosis. Esto se corroboró por WB, mediante el análisis de los clivajes de LC3 y PARP, a fin de evaluar actividad de la vía autofágica y apoptótica, respectivamente. Además, se analizó la relación Beclin-1/BCL-XL con el mismo fin. Se observó que las células PANC-1 en estado basal clivan LC3 y PARP y que UO126 y CAPE aumentan el clivaje de LC3, mientras que estas drogas sobre las células pretratadas con 3-MA, aumentan el clivaje de PARP. Beclin-1/BCL-XL es mayor en las células tratadas con los inhibidores solos respecto a las células a la que se les inhibió previamente la autofagia (4,22 vs 3,19 para UO y 9,33 vs 7,21 para CAPE). Concluimos que UO126 y CAPE, inducen muerte de las células PANC-1 exacerbando el mecanismo autofágico. Sin embargo, cuando la autofagia es inhibida, las drogas logran direccionar el mecanismo de muerte hacia la apoptosis.

598 (774) GENES QUE TRANSMITEN ALTA PREDISPOSICIÓN A CÁNCER EN PACIENTES ARGENTINAS, SIGNIFICADO REGIONAL DE: MUTACIONES NOVELES Y SECUENCIAS VARIANTES DETECTADAS EN BRCA 1 Y 2, APC, RET, P53 Y MSH2. Neuman L.¹; Delettières D.²; Belli S.³; Nuñez L.⁴; Perazzo F.⁵; Podestá E.⁶; Solano A.⁷

IIMHNO Dpto de Bioquímica Facultad de Medicina UBA¹; Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas, «Norberto Quirno», CABA.²; Departamento de Endocrinología Hospital Dr Durand³; Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas, «Norberto Quirno», CABA.^{4 5}; IIMHNO Dpto de Bioquímica Facultad de Medicina UBA⁶; IIMHNO Dpto de Bioquímica Facultad de Medicina UBA; Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas, «Norberto Quirno», CABA.⁷ <asolano@cemic.edu.ar>

Aunque hay descriptas miles de mutaciones en genes asociados a cáncer (Ca) hereditario (He), se siguen describiendo mutaciones noveles y polimorfismos, dando lugar a la hipótesis de una posible regionalización en algunas de ellas. La mutación no detectada en el caso índice es un resultado genéticamente no informativo y esto es frecuente con técnicas indirectas o búsqueda en codones esperados o *hot spot*. El objetivo del trabajo es analizar por secuencia la presencia de mutaciones y polimorfismos en genes asociados a Ca He, con el fin de estudiar la posible regionalización de algunas mutaciones. Secuenciamos casos índice para los genes: BRCA 1-2 (Ca He de mama y ovario) $n=94$; APC (poliposis adenomatosa familiar) $n=62$; RET (Ca medular de tiroides familiar) $n=12$; MSH2 y MLH1 (síndrome de Lynch) $n=12$ y p53 (Li-Fraumeni, LF like y CaHe de mama) $n=42$. Detectamos mutaciones noveles en todos los genes analizados: 3 de 61 BRCA 1-2 (61 BRCA 1-2 total y 33 panel ashkenazi); 14 de 62 en el gen APC; 1 de 14 en protooncogen RET; 3 de 12 en gen MSH2. Además detectamos: a) dos pacientes con la mutación Ile2490Thr descrita originalmente en una paciente de origen sudamericano; b) el panel de mutaciones de la población ashkenazi no fue detectado en ninguna de las mujeres no judías; c) se detectó una

mutación no ashkenazi en BRCA1 en una mujer judía ashkenazi; d) un polimorfismo novel en APC f) la mutación del AGAAA1309 frecuente en el gen APC no refleja el origen étnico de nuestra población; e) una frecuencia mayor a la reportada de polimorfismos en el gen RET; f) frecuencia mayor a la reportada para el *codon Pro72* en el gen p53, asociado a alta predisposición a cáncer. Concluimos: a) la importancia de la secuencia total de los exones para un resultado informativo; b) las mutaciones detectadas contribuyen al conocimiento de las características clínicas asociadas a la población sudamericana y fortalecen la hipótesis de una regionalización, ya incipiente en otras partes del mundo.

INFECTOLOGIA 1

599 (148) EFECTO DIFERENCIAL DE SULFASALAZINA EN DOS MODELOS DE RESERVORIO DEL VIRUS VIH-1. Riva D.¹; Fernández Larrosa P.²; Melito V.³; Saracco M.⁴; Dolcini G.⁵; Martínez Peralta L.⁶; Mersich S.⁷

Depto. Qca. Biológica. FCEyN. UBA.¹; CNRS. Depto. Microbiología. Fac. Medicina. UBA.²; Depto. Qca. Biológica. FCEyN. UBA.³; CNRS. Depto. Microbiología. Fac. Medicina. UBA.⁴; Depto. Qca. Biológica. FCEyN. UBA.⁵; <diegoarielriva@gmail.com>

Uno de los mayores inconvenientes que existen para lograr la erradicación de la infección con el virus VIH-1 es la existencia de reservorios celulares infectados. Dado que los tratamientos antivirales actuales se asocian a diversos efectos adversos, el uso de agentes que ataquen blancos celulares, como NF-kappa-B o acetilación, es una novedosa estrategia antiviral. Entre dichos agentes, dos sustancias inmunomoduladoras como sulfasalazina (Sul) y curcumina (Cur), que regulan el estrés celular, podrían modificar la producción de partículas virales en células persistentemente infectadas con VIH-1. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la acción de Sul sobre dos modelos de persistencia viral, representados por células linfoblastoideas (H9+) y monocíticas (U1), que presentan diferente expresión de proteínas virales. Se determinó (a) la citotoxicidad celular (MTT), (b) la liberación de partículas virales (ELISA), (c) el estrés celular (sonda fluorométrica DCF), (d) la depolarización mitocondrial (sonda fluorométrica JC-1), (e) los niveles de superóxido dismutasa (espectrofotometría) y (f) los niveles de I-kappaB (western blot). La presencia de Sul, en concentraciones no citotóxicas, según (a), no afectó (b) en U1 mientras que disminuyó (b), en forma dosis dependiente, hasta un máximo de 45% para H9+. Sul 250µM resultó prooxidativo en ambas líneas celulares, aumentando (c) al doble luego de 24h de tratamiento. Sul 250µM no modificó (d), en ninguno de los reservorios; sin embargo redujo (e) a 0,56 veces en U1 y a 0,44 veces en H9+. La misma concentración de Sul, si bien no modificó (f) en H9+, redujo dicho parámetro a la mitad en U1. De nuestros datos se desprende que Sul posee un efecto prooxidativo, evidenciado como un estrés citoplasmático y que U1 posee un sistema NF-kappaB más sensible a la activación por ROS. Se concluye que Sul modularía diferencialmente la expresión viral, en reservorios de VIH, de acuerdo con el linaje celular en estudio.

600 (465) RELACIÓN ENTRE FAMILIAS DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE PSPA DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE CON SEROTIPOS Y PATOLOGÍAS. Zalazar F.¹; Baroni M.²; Giani R.³; Regueira M.⁴; Mayoral C.⁵

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral^{1 2 3}; INEI-ANLIS «Dr C. Malbrán»⁴; Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral⁵ <fzalazar@fbc.unl.edu.ar>

La morbi-mortalidad de neumonías y meningitis causadas por *Streptococcus pneumoniae* (Spn) marca la necesidad de vacunas antineumococcicas más efectivas que la actual 7-valente. Por esto, se están estudiando proteínas de superficie del Spn, como

PspA, para elaborar vacunas más eficaces. Hay 3 familias de PspA, capaces de generar anticuerpos con reacción cruzada entre distintos serotipos de la misma familia, lo que la convierte en candidata ideal. Nuestro objetivo fue identificar familias de PspA en aislamientos provenientes de niños con infecciones invasivas y relacionarlas con serotipos y patologías. Se aplicó una PCR con *primers* específicos de familia 1-3. El 59, 33 y 1% de los aislamientos fueron familias 1, 2 y 3, respectivamente. Un 7% fue no tipable. La familia 1 se identificó en 60 y 50% de neumonías y meningitis, respectivamente, mientras que la familia 2 se observó en el 33 y 40% de neumonías y meningitis. No hubo asociación entre familias y patologías (p=0.621). Hubo una asociación entre el tipo de familia con serotipos: el 1 y el 5 fueron sólo familia 1. El único aislamiento de familia 3 correspondió al serotipo 14, proveniente de meningitis. Este estudio provee información epidemiológica en aislamientos regionales de Spn (en relación a patologías invasivas y serotipos) pensando en una vacuna regional que utilice PspA como inmunógeno. Ésta tendría una protección mucho mayor que la 7-valente, y sería un factor importante para disminuir la tasa de morbi-mortalidad del Spn y su actual resistencia a los antimicrobianos.

601 (524) SÍNTESIS DE UN POSIBLE SENSOR DE OXÍGENO EN BRUCELLA ABORTUS. Almirón M.¹; Blesa J.²; Ugalde R.³

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas/ UNSAM-CONICET^{1 2 3} <almironm@gmail.com>

B. abortus, agente causal de la brucelosis, pertenece a las alfa-proteobacterias junto a los simbioses de plantas como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Estos últimos, expresan un sistema de dos componentes, denominado FixLJ, donde Fix L es la proteína sensora de gases. Una diferencia en la presión de los mismos le permite a las bacterias redireccionar su regulación genética para facilitar tanto la fijación del N₂ como la respiración bacteriana en micro o anaerobiosis. Varios autores, han desechado la posibilidad de que *Brucella* exprese dicho sistema dado que la búsqueda de homología in silico ha dado negativa buscando proteínas con dominio PAS. Sin embargo, pensando justamente en que *B. abortus* es un patógeno capaz de replicar intracelularmente y que expresa la proteína Irr, cuya unión al hemo se da en ausencia de ese dominio, es que decidimos intensificar la búsqueda. Así, hemos hallado las secuencias codificantes para FixL y FixJ en un operón. El gen putativo de *B. abortus* fixL fue amplificado, clonado y secuenciado por métodos habituales en genética. El fragmento de DNA que codificaría para la región citoplasmática ha sido clonado en un vector de expresión pTrcHis. A otro clon con este fragmento se le ha hecho una delección afectando la posible función kinasa. Proteínas del tamaño molecular esperado fueron expresadas por inducción y purificadas por cromatografía de los sobrenadantes de cultivos de *E coli* transformadas. Paralelamente, con el fragmento de DNA mutado y clonado, ahora en un vector suicida para *Brucella*, se construyó un mutante por recombinación homóloga en la cepa salvaje 2308. El mutante no presentó un fenotipo diferente al salvaje en cuanto a su viabilidad en distintas condiciones de oxigenación, sensibilidad al estrés oxidativo o capacidad de autoagregarse. Estos resultados nos permiten concluir que *B. abortus* posee un gen que codifica para un homólogo de FixL cuya expresión no resulta vital en las condiciones de vida libre ensayadas.

602 (545) ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO MOLECULAR PRELIMINAR DE LAS INFECCIONES POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN LA CIUDAD DE MAR DEL PLATA. Barbini L.¹; Tadey L.²; Campos R.³

Catedra de Virología Fac Farmacia y Bioquímica UBA; Lab Virología Instituto Nacional de Epidemiología¹; Catedra de Virología Fac Farmacia y Bioquímica UBA^{2 3} <lbarbini@ffyb.uba.ar>

La variabilidad del gen X y la proteína X del virus de hepatitis B incluyen variaciones de genotipo (gt) y otras que emergen en

la infección crónica. Entre las mutaciones asociadas a los mecanismos de patogenia, se encuentran las del BCP en los nucleótidos (nt) 1762-64, las cuales implican los cambios K130M y V131I en HBV-X y producen una disminución en la expresión del HBeAg. Otros cambios son C1858T y G1896A (codón stop HBeAg), que confieren el fenotipo HBeAg neg. OBJETIVOS Establecer la distribución de gt de HBV que circulan en Mar del Plata. Analizar la diversidad de secuencias del gen X y la aparición de mutaciones en la infección crónica (A1762T-G1764A, C1858T, A1896G). Se estudiaron sueros de pacientes con infección crónica. Se amplificó por nested-PCR la región comprendida entre los nt 1174-2247 y se secuenció entre 1374 y 1899. Las secuencias de HBV-X se obtuvieron por traducción de los genes. Los alineamientos de nt y proteínas se realizaron con ClustalX. Para determinar los gt, se reconstruyeron las relaciones filogenéticas usando los métodos de Neighbour Joining y Maximum likelihood. RESULTADOS Los gt se determinaron por agrupamiento de las secuencias en árboles filogenéticos. Resultaron en un 77,7% del gt F, correspondiendo el 66,6% al subgt Flb y el 11,1% al subgt Fiv; un 11,1% al A y un 11,1% al D. Al analizar las secuencias sobre los sitios de interés, se observó que del total de las muestras secuenciadas un 88,8% presentó el triplete AGG en 1762-64, mientras que el 11,1% evidenció AAG (gt Flb). Todas las secuencias se tradujeron a los aminoácidos KV en las posiciones 130-131 de HBV-X (*wild type*), independientemente del gt. El 88,8% de las muestras presentaban el nucleótido T, mientras que el 11,1% la C (gt A) en 1858. En 1896-1898 mostraron en un 88,8% el triplete GGG, mientras que el 11,1% presentó AGG (gt Fiv). CONCLUSIONES El gt de mayor prevalencia fue el F. La mayoría de las muestras presentan los nt del *wild type* en los sitios estudiados.

603 (656) REGULACIÓN CATABÓLICA POR CARBONO DE LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS EN CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TIPO A. Mendez M.¹; Goñi A.²; Grau R.³

Dpto de Microbiología, Fac de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR^{1 2 3} <marceloberme@yahoo.com.ar>

C. perfringens es una bacteria patógena, Gram positiva, anaeróbica, la cual posee la capacidad de sintetizar una amplia variedad de toxinas. *C. perfringens* es el agente causal de la gangrena gaseosa (GG), afectando al hombre como a los animales. De las toxinas que este patógeno produce, la fosfolipasa C (PLC) y la perfringolisina O (PFO) están directamente implicadas en la iniciación y avance post-infección de la GG. La PLC y PFO provocan la obstrucción de vasos sanguíneos aferentes a la zona de tejido infectado, generando hipoxia en el sitio de la infección, y permitiendo que esta bacteria anaeróbica comience a crecer. Además, estas dos toxinas provocan la destrucción del tejido infectado liberando nutrientes para el crecimiento de *C. perfringens* dentro del hospedador infectado. Considerando la importancia de esta toxinas en la GG y, por otro lado, que hay reportes previos de regulación por catabolito de la adherencia y gliding en *C. perfringens*, como de represión en la producción de toxinas en *C. difficile* por glucosa, se decidió estudiar como se ve afectada la expresión de PLC y PFO en *C. perfringens* dependiendo de la fuente de carbono disponible en el medio de crecimiento. Para realizar el estudio se midió la actividad lipasa (PLC) y hemolítica (PFO) de sobrenadantes de la Cepa 13 (GG en humanos) y mutante *ccpA* isogénica, en medio con y sin glucosa (sacarosa) adicionada. Además, se estudió la expresión de los genes de las toxinas *plc* y *pfoA* mediante fusiones reporteras a *gusA* en las dos cepas mencionadas en las condiciones descriptas. En este estudio se observó que la producción de PLC como de PFO es reprimida (en 50%) por glucosa y sacarosa, y que este fenómeno es mediado por CcpA (catabolite control protein A) para PLC, pero no completamente dependiente de CcpA para PFO. Este hallazgo es muy importante para comenzar a comprender cuales son las señales fisiológicas y medioambientales que regulan la producción de toxinas en *C. perfringens* y así su virulencia.

604 (795) DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE PCR EN MATERIA FECAL PARA ESTRONGILOIDISIS SIN REQUE-

RIMIENTOS DE KITS COMERCIALES. Repetto S.¹; Alba Soto C.²; Cuello M.³; Tekiel V.⁴; González Cappa S.⁵

Departamento de Microbiología Facultad de Medicina^{1 2 3}; UNSAM⁴; Departamento de Microbiología Facultad de Medicina⁵ <silvia_repetto@yahoo.com.ar>

El diagnóstico habitual de *Strongyloides stercoralis* (Ss) es por observación directa de larvas en heces (H). La expulsión de larvas fluctúa en infecciones crónicas asintomáticas dificultando el diagnóstico. Las complicaciones clínicas son frecuentes en pacientes tratados con corticoides. Métodos más sensibles permitirían el tratamiento precoz y disminuirían estas complicaciones. Sólo se ha reportado un trabajo donde emplean un kit comercial de purificación de ADN que permeabiliza la cutícula y elimina inhibidores en H pero encarece la técnica. Estandarizamos un método artesanal que combina un buffer de hidratación con glicina y diferentes métodos de lisis mecánica para desarrollar una PCR para Ss en H. El ADN se purificó a partir de 1g de H conteniendo larvas (200 a 400). Las muestras se incubaron 12h (T°amb) en GTES (100mM glicina, 0,05% SDS, 10mM Tris/HCL, pH:8 y 1mM EDTA 0,5M), se lisaron por congelación/descongelación y sonificación e incubaron 12 h (37°C) con buffer de lisis (100mM EDTA, 100mM NaCl, 100mM Tris pH:7,5 y 0,5% SDS, proteinasa K 100µg/ml). Luego de dos rondas de extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), el ADN se precipitó con 2,5vol etanol 100% y se lavó con etanol 70%. La concentración y pureza se estableció por espectrofotometría. El rendimiento fue de 1.5 a 23,3 µg de ADN/g de H, con relación 260/280 entre 1,7 y 1,8. En la amplificación se emplearon: ADN 5 µl, BSA 100mg/ml, 2mM de Mg²⁺, 0,5µM de cada cebador (dirigidos contra 18S de rRNA), 0,4µM de dNTPs y 0,01U/µl de Taq polimerasa, en vol final: 20µl. Las condiciones de ciclado: 95°C 3 min y 35 ciclos de 95°C 5 s, 55°C 1min y 72°C 45s y con 72°C 5min. Se amplificó una banda única para Ss (100pb). En ausencia de BSA no se amplificó ADN de Ss. Concluimos que la extracción de ADN fue altamente satisfactoria y la PCR con BSA permitió detectar Ss en H. Estos resultados apoyan el desarrollo de una técnica sensible para el diagnóstico precoz de Ss en inmunocomprometidos.

605 (245) SITUACIÓN DE BIOSEGURIDAD Y SEGURIDAD EN LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y ANÁLISIS CLÍNICOS DE ARGENTINA. Stanganelli C.¹; Canalejo K.²; Costa H.³; Narbaitz M.⁴; Salamone G.⁵; Austin J.⁶; Fink S.⁷

Comité de Bioseguridad IHema Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5 6 7} <ctstanganelli@hematologia.anm.edu.ar>

Se realizó una encuesta sobre temas de Bioseguridad/Seguridad a 63 alumnos (52 mujeres) participantes de cursos de Bioseguridad en el Laboratorio. Formación de los encuestados: 12 químicos/bioquímicos, 37 biólogos/biotecnólogos, 3 veterinarios, 1 ingeniero agrónomo, 1 médico, 1 arqueólogo, 1 enfermero y 7 técnicos. Seis alumnos provenían de actividades aplicadas y 57 de investigación; 72% residían en la ciudad de Buenos Aires y Gran Buenos Aires y 28% en el interior del país. La encuesta constó de 60 preguntas y se eligieron las 25 más representativas para este informe. Más del 76% de los encuestados tienen gestión organizada de residuos, lavado en el laboratorio y procedimientos para descontaminar equipos, previo a mantenimiento. Entre el 67 y 76% guardan bajo llave material peligroso o equipos costosos; usan material plástico en lugar de vidrio; disponen de ropa, elementos de protección personal, botiquines de primeros auxilios y limitan la cantidad de químicos combustibles en el laboratorio. Entre el 60 y 65% tiene iluminación y señalización de salidas; procedimiento de descontaminación periódica de centrifugas; medios para lavado de ojos y modo de comprobación de esterilización. Entre el 50 y 58% reciben indicaciones especiales para mujeres en edad fértil; separan sustancias químicas incompatibles y tienen suficiente espacio de trabajo. El 43-44% realiza evaluaciones de riesgo y tiene programa de inmunización o almacenamiento seguro. El 38% posee duchas de emergencia y el 36% alarma para incendio. Sólo el 22% mantiene registros de

enfermedades y accidentes. El 63% adiestra en prácticas de Bioseguridad, el 53% en tratamiento de roturas/derrames de material biológico, el 34% en derrames químicos y el 51% tiene socorristas para primeros auxilios. La gestión de residuos está entre los temas mejor resueltos, mientras que el registro de accidentes/enfermedades entre los peores. Las mejoras necesarias pueden en parte resolverse con cambios de organización.

605b (706) INTERACCIONES BACTERIANAS DE PATÓGENOS CAUSANTES DE OTITIS MEDIA. M L González^{1,2}, N Gobbato³, G Delgado⁴, M Rubio⁴, M I Mesurado⁵, A Villagra de Trejo⁴, A Ramos³, J C Valdez³

¹Servicio de Bacteriología, Hospital del Niño Jesús; ²Lab de Citometría de Flujo, Fac de Medicina, U.N.T. ³Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán; ⁴Servicio de Bacteriología. Hospital del Niño Jesús; ⁵Servicio de Otorrinolaringología. Hospital del Niño Jesús <logonzalez@hotmail.com>

Streptococcus. Pneumoniae(Sp), *Haemophilus influenzae*(Hi), *Moraxella catarrhalis* (Mc) y *Staphylococcus aureus* (Sa) colonizan la nasofaringe y también producen otitis. La colonización implica una interacción entre bacterias patógenas y comensales y elementos de la respuesta inmune del hospedador. Objetivos: Aislar patógenos causantes de otitis, evaluar la interacción de las mismas en la formación de biofilm, viabilidad y capacidad de inducción de apoptosis en PMN (las células más frecuentes en estas infecciones). Secreciones de oído medio de 21 niños con otitis aguda obtenidas por timpanocentesis fueron analizadas por técnicas microbiológicas y PCR. Con las bacterias aisladas se analizó la capacidad que cada una de ellas y las mezclas de las mismas tienen para formar biofilm por la técnica de cristal violeta (DO540), para inducir apoptosis y necrosis sobre PMN por expresión de Anexina V y IP mediante Citometría de flujo y para sobrevivir en cocultivos midiendo la viabilidad de las bacterias (UFC). Resultados : Aislamientos: Sp=33%, Hi=19%, Sa=43%, Mc=4%. Fueron detectados Sp y Hi por PCR en el 20 % de los cultivos negativos. Todas las especies forman biofilm (Mc=3,36 Sp=2,72 Hi=2,56 Sa=1,71). El Sa reduce la producción de biofilm del Sp ($p<0.005$) y de Mc ($p<0.0001$) e inhibe el crecimiento de ambas en cocultivos. Mc potencia la formación de biofilm asociado a Sp ($p<0.01$), prevaleciendo Mx en el cocultivo. Sp y Hi no antagonizan en la formación de sus biofilms pero prevalece Hi en el cocultivo. El Sa no modifica las asociaciones de Sp+Hi+Mc. La inducción de apoptosis es mayor para Sa=72,4% y Mc=70,7% y la necrosis para Sa=2,80 y Mc=2,80. Las asociaciones más virulentas son Hi+Sp+Sa=74,74 y Hi+Sp=73. Conclusiones: La PCR permite detectar bacterias no determinadas por cultivo. Hay asociaciones positivas y negativas en el biofilm y competencia de supervivencia en los co-cultivos. Sobre los PMN las asociaciones bacterianas inducen apoptosis y necrosis en diferente grado.

INMUNOLOGÍA 12

606 (416) RESPUESTA TEMPRANA FRENTE A LA INFECCIÓN DEL PATÓGENO RESPIRATORIO BORDETELLA PERTUSSIS: CARACTERIZACIÓN DE LAS POBLACIONES LEUCOCITARIAS INVOLUCRADAS. Moreno G.¹; Errea A.²; Roberts R.³; Graieb A.⁴; Van Maele L.⁵; Sirard J.⁶; Hozbor D.⁷; Rumbo M.⁸

Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune.^{1,2}; IBBM³; Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune.⁴; U801. Pasteur Institute. Lille France⁵; U801. Pasteur Institute. Lille France⁶; IBBM⁷; Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune.⁸ <grismoreno@yahoo.com>

Bordetella pertussis (Bp) es una bacteria gram-negativa que causa la enfermedad respiratoria tos convulsa o coqueluche hoy considerada resurgente. El avance en el conocimiento del proce-

so infeccioso de *B. pertussis* ha incrementado en los últimos años pero aún quedan aspectos que deben profundizarse. El objetivo del presente trabajo fue evaluar durante las etapas tempranas de la infección por Bp la dinámica de acceso, el patrón de expresión génica y la contribución de las distintas poblaciones leucocitarias en la contención de la infección. Se empleó el modelo murino de infección intranasal empleando una dosis de 1.108CFU/40µl. A las 2, 6 y 24 hs postinfección se analizó el influjo de las distintas poblaciones celulares en lavado broncoalveolar. Se observó que a las 6 hs post infección el influjo de la población neutrofílica (PMN, CD11c-, CD11b+, GR1+) es significativa: 7.105 ± 1.105 cél/pulmón, duplicándose este valor a las 24 horas y remplazando a los macrófagos alveolares (MA) (CD11c+, CD11b+, GR1-) como población mayoritaria en vías respiratorias bajas. A los distintos tiempos se obtuvieron PMN y MA por separación inmunomagnética y se analizó su perfil transcripcional mediante qPCR sobre múltiples marcadores. Se observó inducción de expresión de CXCL10 (FI 300±100), IL1β (FI 150±50), IL6 (FI 20±10) en PMN, mientras que los MA en condiciones de infección sobreexpresaron IL1β (FI 25±2), TNFα (FI 50±20) Colesterol25hidroxilasa (FI 9±2). En base a estos resultados se realizó un ensayo de colonización bacteriana comparando ratones control y depletados de neutrófilos. En los ratones depletados el número de bacterias recuperadas fue superior al del grupo control: 7.7 ± 0.12 vs 8.4 ± 0.53 logCFU/pulmón a las 24 hs y 7.15 ± 0.21 vs 8.36 ± 0.026 log CFU/pulmón a las 48 hs. Todos estos resultados marcan la relevancia de los neutrófilos en la eliminación de un patógeno respiratorio como Bp en tiempos tempranos de la infección, situación hasta el momento no bien caracterizada.

607 (729) EL RECEPTOR TLR2 Y LA CITOQUINA IL6 SON CLAVES EN LA SOBREVIDA DE CARDIOMIOCITOS DE RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI. Ponce N.¹; Cano R.²; Carrera - Silva A.³; Gea S.⁴; Aoki M.⁵

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba.^{1,2,3,4,5} <nponce@fcq.unc.edu.ar>

Crecientes evidencias demuestran que el sistema inmune innato cardíaco además de constituir una primera línea de defensa, activa programas citoprotectores. Sin embargo, su participación en la supervivencia de células cardíacas infectadas con *Trypanosoma cruzi* aún no ha sido explorado. Previamente observamos que la infección protege de la apoptosis a cultivos de cardiomiocitos de ratones BALB/c, iniciando una potente liberación de IL6 y un sostenido incremento en la expresión de TLR2 pero no de TLR4. Teniendo en cuenta que ratones C57BL/6 (B6) presentan diferente susceptibilidad a la infección, el objetivo fue estudiar la respuesta de células cardíacas de esta cepa y la posible participación de IL6 como mediador anti-apoptótico. Se analizó además, en cultivos de BALB/c el rol de TLR2. Para ello, cultivos primarios fueron infectados con tripomastigotes (Tulahuen 1:1) y mantenidos en medio deficiente de suero por 48h, algunos fueron tratados con anticuerpo bloqueante anti-IL6 o con el anticuerpo control, otros fueron transfectados con el plásmido dominante negativo para TLR2 (DN-TLR2) o con el vector vacío previo a la infección, además se procesaron cultivos sin infectar. Por citometría de flujo, observamos que la infección ejerce una significativa disminución en el porcentaje de apoptosis en células de B6 (23.7 ± 2.6 medio vs 8.9 ± 0.6 infectados, $P < 0.005$), lo que fue revertido por la acción del anticuerpo anti-IL6 (19.7 ± 1.5 bloqueante vs 9.3 ± 1.2 control, $P < 0.02$). La producción de IL6 fue de 17 ng/ml (ELISA) siendo indetectable en el control sin infectar y en el infectado tratado con el anticuerpo bloqueante. La tasa de apoptosis fue entre dos y tres veces superior en los cultivos infectados transfectados con DN-TLR2 vs los transfectados controles. Los resultados demuestran que el efecto cardioprotector de la infección es independiente de la cepa murina y que el sistema innato participaría como mediador de la supervivencia, cobrando relevancia los ligandos parasitarios de TLR2

- 608 (542) RESPUESTA INMUNOENDÓCRINA EN TUBERCULOSIS: DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LEPTINA, IL-6 Y PROTEÍNA C REACTIVA (PCR).** Santucci N.¹; D'attilio L.²; Besedovsky H.³; Del Rey A.⁴; Bay M.⁵; Bottasso O.⁶

Instituto de Inmunología. Facultad de Cs. Biomédicas. Universidad Nacional de Rosario^{1 2}; Institute of Physiology and Pathophysiology, Marburg, Alemania^{3 4}; Instituto de Inmunología. Facultad de Cs. Biomédicas. Universidad Nacional de Rosario^{5 6} <nataliasantucci@yahoo.com.ar>

La pérdida de peso en los pacientes tuberculosos es una característica prominente de la enfermedad. Su mecanismo no está del todo aclarado, aunque las hormonas y citocinas desempeñan un papel significativo en el estado metabólico del huésped. La leptina constituye un nexo entre inmunidad y nutrición ya que reduce la ingesta, aumenta el gasto energético y favorece la producción de citocinas pro-inflamatorias. En función de lo expuesto, estudiamos los niveles plasmáticos de leptina, IL-6 (ELISA), PCR (Ultrasensible Turbitest) e IMC (peso/altura²) en 48 pacientes con TB pulmonar activa HIV negativos (11 leves, 19 moderados y 18 severos), 20 convivientes íntimos -HHC- y 29 controles sanos -Hco-, sin diferencias significativas en cuanto a edad y sexo entre los grupos. HHC mostró los mayores niveles de leptina respecto a Hco y a TB ($p < 0.001$). Dentro de pacientes hubo una disminución de la hormona según la progresión de la enfermedad. En los Hco leptina se correlacionó positivamente con IMC ($p < 0.05$). Los niveles de IL-6 y PCR se mostraron aumentados en los pacientes respecto a los grupos Hco y HHC ($p < 0.001$). Considerando que el grupo HHC existe una alta chance de infección subclínica, los resultados sugieren un diferente perfil de los marcadores inmunoendócrinos según se trate de un estado de relativa protección o franca patología

- 609 (289) ANTICUERPOS SÉRICOS BETA1-ADRENÉRGICOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL.** Segovia M.¹; Borda E.²; Ganzinelli S.³; Sterin Borda L.⁴

Catedra de Farmacología Facultad de Odontología Universidad de Buenos Aires¹; Catedra de Farmacología Facultad de Odontología Universidad de Buenos Aires; CONICET^{2 3 4} <marcelasegovia@gmail.com>

La enfermedad periodontal (EP) es el resultado de una reacción autoinmune, inducida por un desequilibrio entre la agresión bacteriana y la resistencia del huésped. Existen antecedentes que demuestran una asociación entre periodontitis avanzada y enfermedad coronaria. En este trabajo exploramos factores inmunológicos no aterogénicos, capaces de reconocer epitopes del periodontal y miocardio. Se realizó un chequeo de 41 pacientes con EP crónica avanzada y 25 sujetos normales, con el objeto de identificar anticuerpos contra membrana de fibroblastos gingivales y membrana cardíaca. El suero EP y la IgG correspondiente fueron estudiados por citometría de flujo y ELISA, utilizando como antígenos membrana de fibroblastos gingivales humanos y de miocardio de rata, así como péptidos sintéticos con secuencias aminoácidas idénticas al segundo dominio extracelular de los receptores humanos β 1adrenérgico y M2 colinérgico. Se observó que el 97% de los pacientes con EP dieron positivo para anticuerpos anti membrana cardíaca y anti membrana de fibroblastos gingivales y que el 95% resultaron positivos sobre el péptido β 1adrenérgico y negativos (100%) sobre el péptido M2 colinérgico. Los sujetos normales dieron negativos con todos los antígenos. Por su parte, la fracción IgG purificada a partir del péptido β 1adrenérgico (IgG anti b1) se mostró biológicamente activa sobre el cultivo de fibroblastos y sobre la actividad cardíaca, inhibiendo en un 71±7% (n=6) la síntesis de ADN de los primeros e incrementando la contractilidad miocárdica en un 42±4% (n=10). La fracción eluída de la columna (IgG no anti β 1) resultó negativa en ambos ensayos. Se concluye que los anticuerpos séricos anti β 1 adrenérgicos están elevados en la EP y ejercen un efecto biológico directo sobre los fibroblastos gingivales y el miocardio.

- 610 (431) DESARROLLO DE BIBLIOTECAS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES DE LLAMA (VHH) PARA LA CARACTERIZACIÓN DE NOROVIRUS NORWALK Y HOPKINS.** Bok M.¹; Garaicoechea L.²; Wigdorovitz A.³; Green K.⁴; Bok K.⁵; Parreño V.⁶

Grupo de virus Gastroentericos, Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar^{1 2 3}; Norovirus, Gastroenteritis Unit, National Institute of Health, USA^{4 5}; Grupo de virus Gastroentericos, Instituto de Virología, CICVyA, INTA Castelar⁶ <mbok@cni.inta.gov.ar>

Los Norovirus son la mayor causa de gastroenteritis epidémica no bacteriana en adultos. Dado que el virus no replica in vitro, su caracterización es genética. El desarrollo de anticuerpos monoclonales recombinantes de llamas (VHH) a partir de bibliotecas anti- Norwalk y anti-Hopkins permitirá su caracterización antigénica. Se inmunizaron 2 llamas, con 3 dosis de 300 μ g cada una, de "virus like particles" (VLPs) de los genotipos Norwalk y Hopkins. Se compararon los resultados obtenidos con una llama no inmunizada. La respuesta de IgG sérica fue seguida semanalmente por ELISA y las células secretoras de anticuerpos (CSAc) se evaluaron a los 4 y 7 días post inmunización por ELISPOT. La llama inmunizada con VLPs Norwalk desarrolló una fuerte respuesta hacia el antígeno homólogo, alcanzando un título de 1/600 000 a los 35 días post inmunización (dpi). A su vez, presentó una respuesta a las VLPs Hopkins con un título final de 1/1000 a los 28 dpi. La llama inmunizada con VLPs Hopkins desarrolló una fuerte respuesta hacia el antígeno homólogo, alcanzando un título de 1/800 000 y presentó una seroconversión a las VLPs Norwalk, con un título de 1/10 000 a los 28 dpi. Luego de la segunda inmunización (28 dpi), la llama inmunizada con Norwalk presentó 1583 y 900 CSAc antígeno específicas (Norwalk) al día 4 y 7 post inmunización, respectivamente. En la llama inmunizada con Hopkins, se cuantificaron 100 CSAc hacia el día 4 post inmunización. Los resultados parciales obtenidos indican que las llamas fueron inmunizadas correctamente con ambas VLPs, respondiendo con altos títulos de anticuerpos y CSAc contra su antígeno específico y contra el otro genotipo estudiado. La respuesta de anticuerpos y CSAc demuestra un reconocimiento del antígeno que permitirá el posterior desarrollo de la biblioteca. Se realizó una tercera inmunización a los 90 dpi, aislando los linfocitos del día 4 post inmunización final, para comenzar con el desarrollo de la biblioteca de VHH, actualmente en curso.

- 611 (9) LAS METALOPROTEASAS DE MATRIZ ESTÁN IMPLICADAS EN EL DAÑO OSTEOARTICULAR POR BRUCELLA ABORTUS.** Scian R.¹; Barrionuevo P.²; Giambartolomei G.³; Fossati A.⁴; Baldi P.⁵; Delpino V.⁶

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) Conicet^{1 2 3 4 5 6} <romini84@gmail.com>

La localización osteoarticular es la más común de la brucelosis activa. En las infecciones osteoarticulares por otras bacterias se demostró que la respuesta inmune inflamatoria está implicada en el daño óseo, ya sea estimulando la formación de osteoclastos (mayor remoción ósea) y la producción de metaloproteasas de matriz (MMPs) (remoción de la matriz ósea) o induciendo apoptosis de osteoblastos (menor síntesis de la matriz ósea). El objetivo general de este trabajo fue dilucidar el rol de las MMPs como determinantes del daño osteoarticular por *Brucella abortus*. Se estudió la producción de MMPs por parte de osteoblastos humanos (hFob) infectados con *Brucella abortus*. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indicaron que los osteoblastos producen MCP-1 por lo tanto, se analizó el rol de los monocitos humanos (THP-1) en la producción de MMPs durante la infección por *B. abortus*, y los efectos de los sobrenadantes de monocitos infectados sobre osteoblastos y viceversa. La producción de MMPs se analizó por zimografía y por ELISA. Los resultados obtenidos indicaron que los osteoblastos y monocitos infectados producen MMP-2 y MMP-9, respectivamente. En monocitos, la producción de MMP-9 fue debida en gran

parte a las lipoproteínas de *B. abortus*, (según se determinó usando como modelo L-Omp19), a través de la unión al receptor TLR-2 y debida fundamentalmente a TNF-alfa, y no a IL-1-beta según se determinó usando anticuerpos monoclonales específicos para bloquear los receptores. Los sobrenadantes de monocitos infectados indujeron la producción de MMP-2 por parte de osteoblastos y esta inducción fue mediada por TNF-alfa. Por otro lado los sobrenadantes de osteoblastos indujeron la producción de MMP-9 por parte de monocitos y esto se debió a la presencia de GM-CSF en el sobrenadante. Esta respuesta podría tener un rol preponderante en la inflamación crónica y en la destrucción de hueso que es observada en la brucelosis osteoarticular.

612 (77) 4-1BB: UN REGULADOR DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE CÉLULAS INMUNES DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS ACTIVA. Fernández Do Porto D.¹; Jurado, J.²; Pasquinelli V.³; Alvarez I.⁴; Aspera R.⁵; Moracho L.⁶; Musella R.⁷; Abbate E.⁸; García V.⁹

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA¹ ; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{2 3 4 5} ; División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz^{6 7 8} ; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires⁹ <dariofd@gmail.com>

La molécula coestimuladora 4-1BB pertenece a la familia de receptores del TNF y la interacción con su ligando tiene un rol central en la regulación inmunológica. Dado que la función de la vía 4-1BB:4-1BBL en la infección bacteriana intracelular no ha sido reportada en humanos, en este trabajo estudiamos la expresión y función de 4-1BB y su ligando durante la tuberculosis (TB) humana. La expresión de 4-1BB y 4-1BBL fue estudiada en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con TB por citometría de flujo (CF). La estimulación con sonicated de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) aumentó la expresión de 4-1BB en Linfocitos T (LT) (control: 8±3%, *Mtb*: 29±6%, p<0.05, test Wilcoxon) y de 4-1BBL en monocitos (control: 1±0%, *Mtb*: 19±9%, p<0.05). Seguidamente demostramos que el bloqueo de 4-1BB:4-1BBL produce una disminución de la proliferación (incorporación de [³H]TdR) de CMSP en respuesta al antígeno (*Mtb*: 14173±4240 cpm, *Mtb*+α-4-1BB: 7427±4297 cpm; *Mtb*+α-4-1BBL: 5740±3224 cpm, p<0.05). Contrariamente, el bloqueo de la vía incrementó la apoptosis (expresión de Anexina V por CF) de LT estimulados con *Mtb* (*Mtb*: 31±3%, *Mtb*+α-4-1BB: 46±8%; *Mtb*+α-4-1BBL: 46±10%, p<0.05) y la producción de TNF-α (expresión intracitoplasmática por CF) por células CD14⁺ (*Mtb*: 12±2% *Mtb*+α-4-1BB: 41±6%, p<0.05). Interesantemente, al investigar la expresión intracitoplasmática por CF luego del bloqueo de 4-1BB en células estimuladas con *Mtb*, observamos una significativa disminución de los LT CD3⁺IFN-α⁺ (*Mtb*: 11±2%, *Mtb*+α-4-1BB: 4±1%, p<0.05). En conjunto, nuestros resultados demuestran que las interacciones 4-1BB:4-1BBL aumentan la supervivencia y proliferación celular durante la respuesta del huésped contra *Mtb*, modulando funciones efectoras cruciales para la defensa contra el patógeno.

613 (412) ASOCIACIÓN Y FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE MUERTE PROGRAMADA-1 (PD-1) Y EL IFN-γ EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA CONTRA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. Alvarez I.¹; Jurado J.²; Pasquinelli V.³; Fernández Do Porto D.⁴; Aspera R.⁵; Musella R.⁶; Abbate E.⁷; Branda A.⁸; De La Barrera S.⁹; García V.¹⁰

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina^{1 2 3 4 5} ; División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz, Argentina^{6 7 8} ; Academia Nacional de Medicina, Argentina⁹ ; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina¹⁰ <ivanabelenalvarez@yahoo.com.ar>

PD-1 es una molécula de señalización inhibitoria en la respuesta inmune adaptativa pero poco se conoce sobre su rol en

la respuesta innata. En tuberculosis (TB) las funciones de las células NK son reguladas por señales activadoras e inhibitorias. Aquí investigamos la potencial asociación y función de PD-1 y la producción de IFN-γ por NK de pacientes con TB. La estimulación con *Mtb* incrementó los niveles de PD-1 de NK de sangre periférica (SP) y fluidos pleurales (FP) simultáneamente con un aumento en la producción de IFN-γ por estas células (*p<0,05. Test de Wilcoxon). Interesantemente, la modulación del ambiente de citoquinas por IL-4 e IL-17 disminuyó significativamente el IFN-γ producido por las NK conjuntamente con la expresión de PD-1 en SP y FP, denotando la existencia de una relación entre expresión de PD-1 e IFN-γ (*p< 0,05. Test de Wilcoxon). Además, el agregado de IFN-γ+*Mtb* aumentó PD-1 en NK y la neutralización de esta citoquina disminuyó la expresión del receptor (*p<0,05. Test de Wilcoxon). Seguidamente estudiamos la potencial asociación entre expresión de PD-1 y secreción de IFN-γ en NK. Observamos que el aumento de PD-1 inducido por *Mtb* correlacionó directamente con la producción de IFN-γ en células NK de pacientes con TB (*p=0,03 Coeficiente de Spearman r 0,6154). Estos datos confirman que el IFN-γ modula a PD-1 en células NK durante la TB. Más aún, mediante el estudio de la coexpresión de PD-1 e IFN-γ observamos que entre las células NK IFN-γ⁺, las PD-1⁺ mostraron una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia media (IFM) del IFN-γ respecto a las PD-1⁻ (IFM IFN-γ SP PD-1⁻ 46,82±6,08; PD-1⁺ 28,55±1,57. FP PD-1⁻ 34,75±3,29; PD-1⁺ 28,55±2,39; *p<0,05. Test de Wilcoxon). En conjunto, nuestros datos demuestran una asociación directa entre PD-1 e IFN-γ, en células NK del sitio de infección y de SP de pacientes con TB, y la existencia de un mecanismo de feedback negativo mediante el cual PD-1 inhibiría la secreción de IFN-γ en células NK.

614 (91) TNF-A E IFN-γ REGULAN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LA VÍA 4-1BB/4-1BBL EN LA RESPUESTA INMUNE CONTRA M. TUBERCULOSIS. Aspera R.¹; Fernández Do Porto D.²; Jurado J.³; Álvarez I.⁴; Cialella L.⁵; Musella R.⁶; Abbate E.⁷; Pasquinelli V.⁸; García V.⁹

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4} ; División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz^{5 6 7} ; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{8 9} <rominaaspera@hotmail.com>

La protección contra *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) depende de la generación de citoquinas proinflamatorias, especialmente IFN-γ y TNF-α. Resultados de nuestro laboratorio demostraron que la vía de 4-1BB, un coestimulador de la familia del TNF que interacciona con 4-1BBL, disminuye las células CD14⁺ secretoras de TNF-α mientras que aumenta las CD3⁺ productoras de IFN-γ durante la infección por *Mtb*. En este trabajo, investigamos la modulación de la expresión de 4-1BBL por IFN-γ y TNF-α en tuberculosis. Observamos que la expresión de 4-1BBL en monocitos aumentó marcadamente tanto por adición de TNF-α exógeno como por bloqueo de IFN-α; mientras que los niveles de 4-1BBL disminuyeron por agregado de IFN-α exógeno y por bloqueo de TNF-α. Asimismo, la estimulación de las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis con *Mtb* ± anticuerpos bloqueantes α-4-1BB o α-4-1BBL indujo un aumento significativo de TNF-α (*Mtb* ng/ml: 27,5±8,5, *Mtb* + α-4-1BB: 33,6±10, *Mtb* + α-4-1BBL: 35,2±11,5, p<0.05), y una marcada disminución de IFN-γ (*Mtb* ng/ml: 29,1±5,3, *Mtb* + α-4-1BB: 13,2±4,3, *Mtb* + α-4-1BBL: 15,8±5,8, p<0.05). Estos datos demuestran que las interacciones 4-1BB:4-1BBL inducen efectos opuestos sobre la secreción de IFN-γ y TNF-α determinada por ELISA. Considerando estos resultados, estudiamos la potencial regulación cruzada entre ambas citoquinas. Interesantemente, el IFN-γ aumentó significativamente el TNF-α inducido por *Mtb* (p< 0.05). En contraste, el agregado de TNF-α exógeno disminuyó marcadamente la producción de IFN-γ (p< 0.05). En conjunto, nuestros datos sugieren que la regulación cruzada entre el IFN-γ y el TNF-α podría actuar como un freno pro-inflamatorio evitando

el daño inducido por respuestas Th1 exacerbadas. Más aún, la vía de 4-1BB en tuberculosis podría regular positivamente la producción de IFN- γ a través de una fina modulación de la producción de TNF- α .

- 615 (345) LACTOBACILLUS RHAMNOSUS CRL 1505 AUMENTA LA INMUNIDAD INNATA CONTRA STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE EN RATONES DESNUTRIDOS.** Herrera M.¹; Salva S.²; Villena J.³; Barbieri N.⁴; Alvarez S.⁵

Instituto de Bioquímica Aplicada. Universidad Nacional de Tucumán¹; Centro de Referencia para Lactobacilos^{2,3,4}; Centro de Referencia para Lactobacilos. Instituto de Bioquímica Aplicada. Universidad Nacional de Tucumán⁵
<matias@fbqf.unt.edu.ar>

Infecciones por *S. pneumoniae* son comunes y muy severas en huéspedes inmunocomprometidos. En este trabajo se investigó el efecto de *L. rhamnosus* (Lr) sobre la respuesta inmune innata contra *S. pneumoniae* (Sp), en un modelo de desnutrición proteica. Ratones suizos desnutridos fueron renutridos durante 7d con dieta balanceada (DB) o DB suplementada con Lr (DB+Lr). El día 8, estos animales, controles bien nutridos (N) y desnutridos (D) fueron desafiados intranasalmente con Sp (10^5 cél/ratón). El día 0 y a diferentes tiempos post-infección se realizaron las siguientes determinaciones: cultivo de pulmón y hemocultivo; histopatología pulmonar; número de leucocitos y neutrófilos en fluido broncoalveolar (BAL); porcentaje de células NBT+ y concentración de IL-6, TNF- α e INF- γ por ELISA. Además, en sangre y médula ósea (MO) se hizo recuento total y diferencial de leucocitos, actividad peroxidásica y expresión de Gr-1 y CD-34 por citometría de flujo. Antes del desafío con Sp la administración de DB+Lr indujo: incremento significativo ($p<0.05$) del número de leucocitos en sangre, normalización del número de células Gr-1+ en sangre y MO, actividad peroxidásica mayor que los N ($p<0.05$), e incremento del pool mitótico y de células CD34+ en MO. El desafío con Sp mostró que los ratones D fueron más susceptibles a la infección, mientras que los tratados con DB+Lr se comportaron como los N. En este grupo se encontró: aumento del número y actividad de neutrófilos en sangre y en BAL con respecto a N ($p<0.05$) y normalización del porcentaje de células Gr-1+ en sangre y MO. La renutrición con DB+Lr indujo también la normalización del perfil de citoquinas estudiado, tanto antes como durante la infección por Sp. Por lo tanto, la suplementación de una DB con *L. rhamnosus* CRL1505, es capaz de incrementar la respuesta inmune innata contra *S. pneumoniae* en ratones inmunocomprometidos por desnutrición.

- 616 (684) INFLUENCIA DEL RECEPTOR DE MANOSA EN EL BALANCE ARGINASA/INOS DURANTE LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI EN MACRÓFAGOS IN VITRO.** Garrido V.¹; Dulgerian L.²; Stempin C.³; Cerban F.⁴

CIBICI-CONICET, Fac. de Ciencias Químicas UNC^{1,2,3,4}
<vgarrido@fcq.unc.edu.ar>

Receptores tipo lectina C (CLRs) como el receptor de manosa (RM) y la lectina de macrófagos (Mf) que une galactosa (MGL) podrían estar involucrados en la interacción del Mf con el *T. cruzi*. Previamente demostramos que la preincubación de células J774 con albúmina manosilada (AlbM), ligando específico del RM, pero no con N-acetil-galactosamina, ligando de MGL, seguida de la infección con *T. cruzi*, produce un aumento en la actividad de arginasa (ARG) y una disminución de iNOS. Debido a que el balance ARG/iNOS está involucrado en el control de la sobrevivencia de *T. cruzi* en Mf, realizamos ensayos de IFI para determinar la influencia de los distintos ligandos de CLRs sobre la proliferación parasitaria en Mf. Observamos un aumento de parásitos cuando células se preincubaron con concentraciones crecientes de AlbM. Además, se demostró una disminución de p-JNK cuando las células se preincubaron con AlbM. Para conocer si era necesario una interacción conjunta de AlbM con *T. cruzi* para producir este efecto se preincubaron células J774 con AlbM durante 2h y luego se las lavó o no, para eliminar la AlbM y se infectaron con *T.*

cruzi. Observamos niveles similares de ARG en ambos casos, indicando que no es necesaria la interacción conjunta, por lo que postulamos que la interacción de AlbM con el RM podría estimular su sobre-expresión en la superficie del Mf. Para ello se incubaron células J774 con AlbM-FITC durante 15, 30, 60 y 120 min, analizando por citometría de flujo la variación del RM en la superficie. Observamos una disminución del RM a los 30 min y una sobre-expresión a los 120 min. Esto permitiría un mayor ingreso de parásitos al Mf con el consecuente aumento de ARG y la disminución de iNOS. Para determinar si este fenómeno es particular de *T. cruzi*, se preincubaron las células con AlbM durante 2h, se trataron con LPS y no se observaron cambios en ARG. Estos resultados indicarían que la unión del RM con su ligando específico podría influenciar la entrada del *T. cruzi* en Mf.

- 617 (94) CÉLULAS B IGA+ Y NIVELES DE INTEGRACIÓN VIRAL EN LA INFECCIÓN DEL VIRUS DEL TUMOR MAMARIO MURINO. INFLUENCIA DEL RECEPTOR DE TIPO TOLL 4.** Cabrera G.¹; Mundiñano J.²; Maglioco A.³; Costa H.⁴; Badano N.⁵; Nepomnaschy I.⁶; Piazzon I.⁷

ILEX-CONICET, Academia Nacional de Medicina^{1,2,3,4,5,6,7}
<galt132000@yahoo.com.ar>

El virus del tumor mamario murino (MMTV) se transmite durante la lactancia. En las placas de Peyer (PP) de ratones neonatos, la presentación de un superantígeno viral por células dendríticas (CDs) y células B infectadas causa una fuerte respuesta inmune T que sería crítica para la proliferación de las células B infectadas y la amplificación viral. Además mostramos que el MMTV interacciona con el receptor de tipo Toll 4 (TLR4) y que la infección causa en las PP aumentos en células B IgA+, las cuales podrían estar involucradas en el transporte del virus a la glándula mamaria. El objetivo de este estudio fue analizar la influencia del receptor TLR4 sobre las alteraciones causadas por la infección del MMTV en células IgA+B220^{high} y B220^{low}- en las PP y sobre los niveles de infección. Se determinó por citometría de flujo (FACS) que la infección con MMTV causa en las PP de los ratones C3H/HeN (HeN) un mayor aumento en el porcentaje y número de células IgA+B220^{high} e IgA+B220^{low}- que en los ratones C3H/HeJ, deficientes en TLR4 (HeJ). Día 7 de infección. Número de células IgA+B220^{high}/PP (10^3), HeN no infectado (NI): 0.26 ± 0.06 ; HeJ (NI): 0.30 ± 0.06 ; HeN infectado (I): 1.79 ± 0.72 ; HeJ (I): 0.78 ± 0.05 ($p<0.05$ (media \pm DS, n=4)). Número de células IgA+B220^{low}-/PP (10^3), HeN (NI): 0.06 ± 0.01 ; HeJ (NI): 0.03 ± 0.01 ; HeN (I): 0.39 ± 0.08 ; HeJ (I): 0.14 ± 0.05 ($p<0.05$ (media \pm DS, n=4)). Para analizar la influencia del receptor TLR4 sobre los niveles de infección se utilizaron las cepas de ratones deficientes en TLR4 C3H/HeJ y C.3H/Tlr4^{Lps}-^d, y sus respectivos controles, C3H/HeN y BALB/c. Los resultados mostraron que el virus infecta con menor eficiencia ratones deficientes en TLR4. Dado que en presencia de un TLR4 funcional la infección del MMTV causa un mayor aumento de células B IgA+ en las PP y se observan mayores niveles de carga viral, los resultados sugieren que el MMTV es capaz de tomar ventaja de este receptor para establecer la infección.

- 618 (82) LAS LIPOPROTEÍNAS DE BRUCELLA ABORTUS PROMUEVEN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES.** Bregante J.¹; Barrionuevo P.²; Delpino M.³; Giambartolomei G.⁴

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA). Laboratorio Inmunogenética, Hospital Clínicas. UBA. Buenos Aires, Argentina.^{1,2}; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA). Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA. Buenos Aires, Argentina.³; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (CONICET/UBA). Laboratorio Inmunogenética, Hospital Clínicas. UBA. Buenos Aires, Argentina.⁴ <julieta.bregante@gmail.com>

La brucelosis es una zoonosis causada por bacterias del género *Brucella*. Se caracteriza por inflamación tisular, la cual es acompañada por un característico infiltrado leucocitario a través del endotelio vascular. En este trabajo investigamos la capacidad

de *B. abortus* y sus componentes de activar células endoteliales vasculares. Para esto, incubamos cultivos primarios de células endoteliales provenientes de venas de cordón umbilical (HUVEC) con *B. abortus*. La bacteria fue capaz de infectar HUVEC e indujo de manera dosis-dependiente el aumento de la expresión de CD54, CD106 y CD62 E, y la producción de IL-8 e IL-6, respuestas características de la activación del endotelio. Para determinar el componente bacteriano responsable de dicha activación evaluamos la capacidad del LPS y las lipoproteínas de *B. abortus* de modular la expresión de las moléculas de adhesión y la producción de IL-8 e IL-6. El LPS de *B. abortus* fue incapaz de mediar la activación de las células endoteliales en el rango de concentraciones utilizado. Por el contrario, la proteína L-Omp19 (utilizada como modelo de lipoproteína de *Brucella*) indujo el aumento de la expresión de CD54, CD106 y CD62 E, y la producción de IL-8 e IL-6, de manera dosis-dependiente. Dicha capacidad de activación residió en el dominio lipídico de la proteína, ya que la versión no lipídada de la misma fue incapaz de inducir estos cambios. Estos resultados demuestran que las lipoproteínas de *Brucella* son capaces de inducir la activación de células endoteliales y proponen a estas moléculas como factores cruciales en la patogénesis de la inflamación en brucelosis.

- 619 (315) CEPAS PERTENECIENTES AL LINAJE HAARLEM DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTI-RESISTENTES A DROGAS DE ARGENTINA INDUCEN EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE IL-23R E IL-1 β .** Basile J.¹; Geffner L.²; Yokobori N.³; Ritacco V.⁴; García A.⁵; Cuffré M.⁶; Abbate E.⁷; Sasiain M.⁸; De La Barrera S.⁹

Neumonología Hospital Muñiz^{2 6 7}; *Academia Nacional de Medicina*^{8 9} <juan.basile@gmail.com>

El aumento de tuberculosis (TB) multi-resistente a drogas (MDR-TB) es un problema creciente. Estudios previos indican que no sólo las células Th1, sino también las Th17 desempeñan un papel importante en la inmunidad frente a TB. Previamente demostramos que las cepas MDR de *Mt*b inducen IL-17 diferencialmente siendo la cepa M la mayor inductora de IL-17. Objetivo: evaluar el papel de IL-23 e IL-1 β en la respuesta Th17 inducida por las cepas MDR (M y 410) y sensible (Hs) de la familia Haarlem. Métodos: Células mononucleares de sangre periférica (CM) de pacientes MDR-TB e individuos sanos (N) (ex vivo) fueron cultivadas durante 48 h con o sin *Mt*b. Se evaluó la expresión de IL-23R e IL-17 en células T CD4⁺ y CD8⁺, ex vivo y a 48hs. Además se diferenciaron a macrófagos (M Φ) y se pulsaron 5 o 18 h con las cepas determinándose la expresión de IL-1 β por citometría de flujo. Además se evaluó el papel de IL-23/IL-1 β en la respuesta Th17 agregando anticuerpos neutralizantes al cultivo de CM y determinando la expresión de IL-17 en células T CD4⁺ y CD8⁺. Resultados: a) ex vivo: se halló un alto porcentaje de células CD4⁺/CD8⁺ IL-23R⁺ en MDR-TB (p <0,05). b) 48 horas: M, 410 y Hs aumentaron la expresión de IL-23R en células CD4⁺ y CD8⁺ en MDR-TB (p <0,05) mientras sólo M aumentó IL-23R en N (p <0,05). Por otra parte, el mayor nivel de IL-23R fue inducido por M en ambos grupos (p <0,05) MDR-TB y N. c) Los bloques de IL-23 e IL-1 β inhibieron parcialmente la expresión de IL-17 en células CD4⁺ y CD8⁺, d) si bien todas las cepas indujeron expresión de IL-1 β en M Φ a 5 y 18h, el pico de expresión para 410 y Hs fue a 5h mientras que % M Φ -IL-1 β ⁺ inducido por M que se mantuvo a 18 h. Conclusión: IL-23 e IL-1 β son necesarias en la respuesta Th17. Los altos niveles de IL-23R podrían explicar el aumento de Th17 en MDR-TB. Además, la expresión sostenida de IL-23R en células T y de IL-1 β en M Φ podría favorecer la fuerte respuesta Th17 inducida por M.

- 620 (368) BAFF BLOCKADE AFFECTS GERMINAL CENTRE ARCHITECTURE AND HEART INFILTRATION FAVOURING PARASITE REPLICATION IN EXPERIMENTAL CHAGAS DISEASE.** Bermejo D.¹; Amezcua-vesely M.²; Acosta-rodríguez E.³; Montes C.⁴; Gruppi A.⁵

CIBICI; Facultad de Ciencias Químicas; Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3 4 5} <danbermejo@fcq.unc.edu.ar>

T. cruzi-infected mice develop splenic massive and persistent follicular and extrafollicular reactions accompanied with high seric concentration of BAFF (B cell activating factor). We determined that BAFF is mainly produced by peritoneal and bone marrow cells. To analyze BAFF role in B cell response in Chagas' disease, BALB/c mice were infected with 500 tripomastigotes and injected i.p. three-times/week with 150 μ g of BR3:Fc (to block BAFF activity) or controls. BAFF blockade decreased the number of mature B cells from spleen and lymph node but not from bone marrow and peritoneum. Consistently, spleen histology showed that BR3:Fc-treated infected mice present less number of conventional follicles and a disorganized architecture than infected mice. Antibody response was compartmentalized with peritoneum cells producing higher amounts of antibodies than spleen, lymph node and bone marrow cells. BAFF blockade affected ANA-IgG and parasite-specific IgM but not parasite-specific IgG production, favored parasite replication and lymphoid infiltration in heart. Together, our results show for first time an active role for BAFF in a parasite infection shaping B cell repertoire and parasite control.

- 621 (575) BRUCELLA ABORTUS INFECTA E INHIBE LA EXPRESIÓN DE MHC- II EN MACRÓFAGOS ALVEOLARES MURINOS.** Ferrero M.¹; Barrionuevo P.²; Giambartolomei G.³; Baldi P.⁴

IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2 3 4} <ferrerom@ffyub.uba.ar>

Los macrófagos alveolares son las primeras células del sistema inmune en contactar a los patógenos inhalados y pueden responder a la infección secretando citoquinas. Tanto en humanos como en animales *Brucella* puede ingresar por vía inhalatoria y luego diseminarse sistémicamente. Estudiamos la capacidad de *B. abortus* 2308 para infectar, inducir la secreción de citoquinas y modular la expresión de MHC-II en macrófagos alveolares murinos. Las células fueron obtenidas de lavados bronquioalveolares en ratones Balb/c y fueron infectadas ex vivo durante 2 hs con *B. abortus* a una razón bacteria/célula de 100. *B. abortus* se adhirió (1,58 \pm 0,13 x 10⁵ UFC/pocillo), invadió y replicó intracelularmente en macrófagos alveolares (el número de UFC aumentó ~ 2 log a 48 hs p.i.). La infección indujo la secreción de TNF- α (926 \pm 334,1 pg/ml y 643,4 \pm 66,9 pg/ml a 24 y 48 hs p.i. respectivamente, vs 0 pg/ml del control sin infectar) y KC (22790 \pm 3830 pg/ml vs 292,5 \pm 28,12 pg/ml del control sin infectar a las 24 hs p.i., y 49715 \pm 945,5 pg/ml vs. 445 \pm 21,2 pg/ml a las 48 hs) pero no de MCP-1. La infección con *B. abortus* redujo la expresión de moléculas MHC-II inducida por interferón gama (INF- γ). Este fenómeno también fue inducido por *B. abortus* muerta por calor lo que sugiere la participación de un componente estructural de la bacteria. El LPS de *Brucella* redujo la expresión de MHC-II sólo a alta concentración (5 μ g/ml), a diferencia del LPS de *E. coli* (control positivo) que tuvo efecto inhibitorio a dosis 50 veces menores. L-Omp19, una lipoproteína de membrana externa de *Brucella*, pero no su versión no lipídada, también redujo en forma dosis-dependiente la expresión de MHC-II. *Brucella abortus* puede infectar macrófagos alveolares y modular en estas células la expresión de MHC-II inducida por INF- γ , lo que le permitiría evadir la vigilancia inmunológica y lograr la diseminación sistémica desde el pulmón.

- 622 (736) LAS CEPAS LOCALES DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS (MTB) MULTI-RESISTENTE A DROGAS (MDR) INDUCEN DIFERENCIALMENTE PD-1 Y PD-1 LIGANDOS.** Sabio Y García C.¹; Schierloh P.²; Yokobori N.³; González A.⁴; Asquineye Y.⁵; De La Barrera S.⁶; López B.⁷; Sasiain M.⁸

IIHema, Academia Nacional de Medicina^{1 2 3}; *Servicio Neumonología, Hospital Posadas, Pcia. de Buenos Aires*⁴; *IIHema, Academia Nacional de Medicina*⁵; *Servicio de Micobacterias, ANLIS-Malbrán*⁶; *IIHema, Academia Nacional de Medicina*⁸ <carmensabio@hematologia.anm.edu.ar>

En Argentina los brotes de MDR-TB emergieron en los 90. Ciertas cepas de brote como IM (linaje Haarlem) y Ra (linaje LAM) se diseminaron a la comunidad, subrayando su peligrosidad. Además se definió un número de genotipos de cepas MDR que causaron casos únicos y que no se han transmitido a otras personas por más de una década como 410 (Haarlem). Los linfocitos T (LT) productores de IFN- γ tienen un rol significativo en el establecimiento de la respuesta inmune efectiva contra Mtb. La activación de LT requiere del reconocimiento específico del Mtb a través del TCR y de moléculas co-estimuladoras. Un balance entre señales activadoras e inhibitorias asegura el correcto desarrollo de la respuesta protectora. Estudios in vitro demostraron que la unión de PD-1 (programmed death-1), receptor inhibitorio inducido por activación, a sus ligandos PD-L1 y PD-L2 inhibe las funciones mediadas por TCR siendo éstas mediadas por IFN- γ . Previamente demostramos que M es pobre inductora de IFN- γ y CTL en individuos sanos (HS) y en pacientes con tuberculosis (TB) induce IL-4. Por lo tanto el objetivo del trabajo es evaluar la expresión de PD-1 y PD-Ls inducida por M, Ra y 410. Métodos: PBMC de HS y pacientes TB se cultivaron con las cepas y H37Rv como control (5d). Macrófagos (Mac) autólogos se cultivaron 6d y se pulsaron 18 hs con los antígenos. Se determinó la expresión de PD-1 y PD-Ls por FACS en CD4 y CD8 y Mac. Resultados: PD-1 aumentó en CD4 y CD8 de HS con Mtb. En TB, 410 y Ra indujeron más PD-1 que H37Rv ($p < 0.05$), y M no indujo PD-1 en CD8. PD-L1 y PD-L2 fueron inducidos en CD4 y CD8 de HS ($p < 0.05$). En TB, M no indujo PD-L1 en CD8. En Mac, Mtb indujo PD-L1 en HS y TB. Además las cepas MDR indujeron mayor expresión de PD-L2 que H37Rv en TB. Conclusión: La falta de up-regulación de PD-1 y su ligando PD-L1 por M así como la mayor expresión de PD-L2 por las cepas MDR podrían estar interfiriendo la regulación de las funciones efectoras en CD8 observadas en TB.

- 623 (558) UTILIDAD DE PROTEÍNAS DEL SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO IV DE BRUCELLA PARA EL DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS HUMANA Y ANIMAL.** Pollak C.¹; Delpino M.²; Fossati C.³; Baldi P.⁴

IDEHU Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2 3 4} <coralinaus@hotmail.com>

La supervivencia intracelular de Brucella se debe a factores de virulencia secretados a través de un sistema de secreción tipo IV (SST4), codificado por 12 genes del operón VirB. En este trabajo evaluamos si durante la infección con Brucella se producen anticuerpos contra las proteínas VirB7 y VirB9 del SST4, haciendo posible su uso como antígenos en ensayos diagnósticos. Las proteínas fueron obtenidas en forma recombinante en E. coli fusionadas a una cola de 6-His y purificadas por columnas de Ni-NTA. Con estas proteínas se diseñaron ensayos de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos en humanos y caninos infectados. Se analizaron los sueros de 34 pacientes con brucelosis documentada. Fueron positivos para anticuerpos anti-VirB7 20 pacientes (59%) y para anti-VirB9 15 pacientes (44%). Notoriamente, 6 pacientes negativos para anti-VirB7 fueron positivos para anti-VirB9, con lo cual el total de enfermos positivos para uno o ambos ensayos fue de 26 (76%). Se analizaron también muestras seriadas de 12 perros con infección documentada, totalizando 62 sueros. Los anticuerpos anti-VirB7 fueron siempre positivos en 4 animales, fueron positivos en casi todo el seguimiento en otros 6, y siempre negativos en 2. Para anti-VirB9 los números fueron 3, 5 y 4 perros, respectivamente. También en los perros se hallaron casos positivos para anti-VirB7 y negativos para anti-VirB9 ($n = 15$) y viceversa ($n = 4$), con lo cual el total de sueros positivos para al menos uno de los ensayos fue de 47 (76%). Decidimos evaluar si un ELISA que combine ambos antígenos tiene mayor capacidad de detección que cualquiera de los ELISAs individuales. Nuestros resultados preliminares con sueros caninos indican que esto es efectivamente así. Estos resultados sugieren que las proteínas VirB pueden tener aplicación diagnóstica en brucelosis. Recientemente hemos obtenido la proteína VirB2 en forma recombinante y pensamos incorporarla a esta evaluación.

- 624 (38) EL COMPLEMENTO COMO FACILITADOR DE LA INFECCIÓN DE MACROFAGOS POR HIV ASOCIADO A ERITROCITOS.** García M.¹; Dos Ramos Farias M.²; Rabinovich R.³; Avila M.⁴

Centro Nacional de Referencia para el SIDA-Facultad de Medicina-UBA^{1 2 3 4} <mnoeg@hotmail.com>

Antecedentes: Eritrocitos (E) de individuos HIV+ presentan antígeno p24 (Agp24), RNA-HIV y anticuerpos anti-HIV. Se ha descrito adhesión del HIV al E formando inmunocomplejos, asociado a complemento o unido al antígeno Duffy. En hígado y bazo los macrófagos realizan el clearance de los E devolviéndolos a la circulación. Los macrófagos son importantes en la primoinfección de HIV dado que en general son las cepas macrofagotrópicas las que inician la infección y contribuyen a su mantenimiento. En este trabajo se estudió el potencial infectivo del HIV asociado a E en macrófagos. M y M: A partir de buffy coat de dadores se obtuvieron E y monocitos, estos fueron diferenciados a macrófagos (MDM). Los E fueron incubados con: a- virus de la cepa macrofagotrópica BAL; b- virus BAL + complemento (suero humano normal); c- virus BAL + anticuerpos anti-HIV (pool de sueros inactivados, con western blot+, PCR- y Agp24-) + complemento. Se cuantificó Agp24 asociado a E. Los MDM fueron incubados 2 horas a 37 °C con E descritos en a, b y c. Se determinó Agp24 en sobrenadante de cultivo a los 2-14 días post inoculación (dpi). A los mismos días se realizó inmunofluorescencia para Agp24 en los MDM. Resultados: En las tres formas ensayadas in vitro, el virus se unió a E en cantidades similares a las presentes en pacientes. En los MDM inoculados con E del grupo a, no se recuperó Agp24 del sobrenadante de cultivo. Sin embargo, la fluorescencia para Agp24 reveló marca positiva para Agp24, observándose vesículas fluorescentes en MDM a los 11 dpi compatibles con fagocitosis. En los MDM incubados con E del grupo c, no se recuperó Agp24 del sobrenadante. En MDM incubados con E del grupo b se recuperó Agp24 de 2-14 dpi. Conclusiones: La glicoproteína viral activa el sistema de complemento, el cual se deposita sobre el virus favoreciendo su unión al E. Dado que el HIV así unido mantiene su infectividad sobre MDM, esta fracción viral podría ser importante en las primeras etapas de la infección.

- 625 (703) ROL DE LA INTERLEUQUINA 12 (IL-12) EN LA POLARIZACIÓN DE TIMOCITOS DURANTE LA INFECCIÓN POR TRIPANOSOMA CRUZI.** Rodríguez Galan M.¹; Correa S.²; Cerbán F.³; Young H.⁴

Inmunología. Dpto. de Bioq. Clínica. CIBICI-CONICET. Fac. de Ciencias Químicas. U.N. de Córdoba. Córdoba. Argentina.^{1 2 3}; Laboratory of Experimental Immunology. Center for Cancer Research. National Cancer Institute-Frederick, National Institutes of Health. Maryland, USA.⁴ <crodr2@yahoo.com.ar>

La IL-12 es una citoquina pro-inflamatoria producida por células dendríticas (CDs) y fagocitos. En órganos linfáticos secundarios, la IL-12 es un potente inductor de interferón-gama y es un factor crítico en la diferenciación Th1 de células T. Varios laboratorios han demostrado que la IL-12 puede ser expresada en el timo por CDs residentes como así también por células epiteliales tímicas y estromales. El rol de la IL-12 en el timo no está bien definido aunque se la postula como un importante mediador en procesos como maduración de timocitos, selección negativa e involución tímica. Previamente hemos demostrado que la expresión sistémica de IL-12 \pm IL-18 in vivo luego de la inyección hidrodinámica de sus cDNAs, indujo cambios fenotípicos en timocitos CD4+ ó CD8+ acorde a un perfil de activación (aumento de CD69 y CD44 $p < 0,05$) junto a marcadores asociados a un perfil de tipo Th1 (aumento de CCR5 e IFN γ , $p < 0,05$). Con la intención de estudiar si estos cambios ocurren en un sistema biológico, evaluamos dichos marcadores en ratones B6 infectados con T. cruzi donde observamos expresión sistémica de IL-12 ($p < 0,05$). En el día del onset, observamos aumento de CD69 y CCR5 en ambas poblaciones tímicas, sin embargo CD44 dismi-

nuyó en CD4+ y aumentó en CD8+ luego de la infección ($p < 0.05$). La expresión de citoquinas tipo Th1 como INF γ y TNF α en sobrenadantes de timocitos estimulados *in vitro* con anti-CD3 fue significativamente mayor en animales infectados respecto a controles ($p < 0.05$). De manera interesante, el aumento en la expresión de CD69 y CCR5 se revirtió en animales infectados pero deficientes en IL-12 ($p < 0.05$). Sin embargo la expresión de INF γ y TNF α no se vio afectada en estos animales. Estos resultados demuestran que la expresión sistémica de IL-12 durante un proceso infeccioso podría diferenciar timocitos durante su etapa de maduración intratímica condicionando su comportamiento posterior como célula T madura en órganos linfáticos periféricos.

626 (456) RECLUTAMIENTO DE CELULAS PROINFLAMATORIAS QUIMOQUINA DEPENDIENTE EN PULMÓN CON UNA INFECCIÓN INTRAGÁSTRICA CON YERSINIA ENTEROCOLITICA. Gutierrez J.¹; Ponce V.²; Di Genaro M.³; Gomez N.⁴

Área de Microbiología, Inmunología Fac. Qca, Bioqca y Farmacia UNSL^{1,2}; Inmunología. Área de Microbiología, Facultad de Qca, Bioqca y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis; IMIBIO-SL (CONICET-UNSL)³; Área de Mrología Qca, Bioqca y Farmacia UNSL⁴ <ngomez@unsl.edu.ar>

Yersinia enterocolitica es una enterobacteria que afecta tanto al hombre como a los roedores. Para superar la infección por esta bacteria es necesaria una efectiva respuesta inmune mediada por diferentes tipos celulares y por citoquinas. El objetivo fue determinar si la expresión de quimoquinas se correlaciona con los cambios histopatológicos del pulmón tanto en ratones wild-type (WT) como knock-out (KO) en IL-12p40 C57BL/6, tanto en fase aguda como crónica, con una infección con *Yersinia*. Ratones WT y KO fueron infectados por vía intragástrica con 2×10^7 - 2×10^8 unidades formadoras de colonias de *Y. enterocolitica* O:3. A los 3, 14 y 21 días post-infección (p.i.) los ratones fueron sacrificados. Se realizó RT-PCR a partir de tejido pulmonar. Se evaluó la expresión de mRNA de las quimoquinas MIP-2, KC, y MCP-1 y analizaron evidencias histopatológicas de injuria. La expresión de KC fue mayor en ratones WT, respecto del grupo KO, alcanzando su mayor pico el día 14 y manteniéndose hasta el día 21 después de la infección ($p < 0.05$). MIP-2 se expresó en mayor medida en el grupo WT respecto del KO ($p < 0.05$) manteniéndose elevada hasta el día 21, lo que correlacionó con el flujo de neutrófilos al sitio de infección. La expresión de MCP-1 fue mayor los días 14 y 21 en ratones WT, comparada con el grupo KO ($p < 0.05$). El análisis histopatológico mostró daño pulmonar moderado en ambos grupos, siendo mayor en KO (score 7) comparados con WT (score 5). Se concluye que una menor expresión de quimoquinas atrayentes de polimorfonucleares y macrófagos estaría mediando una respuesta inmune deficiente en ratones KO con respecto al grupo WT. Esta situación es coincidente con un menor reclutamiento de polimorfonucleares en ratones KO en IL-12p40 que son esenciales para la defensa del pulmón frente a una infección bacteriana.

627 (87) LAS VÍAS DE PD-1 Y 4-1BB REGULAN LAS POBLACIONES TH17 Y TH1 DURANTE LA INFECCIÓN POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. Jurado J.¹; Alvarez I.²; Fernandez Do Porto D.³; Aspera R.⁴; Abad S.⁵; Musella R.⁶; Abbate E.⁷; Pasquinelli V.⁸; Garcia V.⁹

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{1,2,3,4}; División Tisioneumonología, Hospital FJ Muñiz^{5,6,7}; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{8,9} <jjurado80@gmail.com>

La inmunidad Th1 es crítica para prevenir la tuberculosis pero se desconoce por qué no es suficiente para erradicar al patógeno. La vía Th1 se encuentra intrínsecamente relacionada a la Th17

por lo cual es necesario investigar la participación de ambos linajes durante la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Al estimular células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis (TB) con un sonicado de *Mtb* observamos inducción de IL-17 (Medio: 36 ± 13 pg/ml; *Mtb*: 610 ± 79 pg/ml) e incremento del % de linfocitos T (LT)CD4⁺IL-17⁺ (Medio: $\%2 \pm 0.4$; *Mtb*: $\%17 \pm 3$). El agregado de IFN γ exógeno no modificó el % de LTCD4⁺IL-17⁺, pero sí disminuyó la producción de IL-17 (*Mtb*+rIFN γ : 201 ± 54 pg/ml) y la intensidad de fluorescencia media (IFM) en LTCD4⁺IL-17⁺. Sorpresivamente al bloquear el IFN γ la producción de IL-17 (*Mtb*+ α IFN γ : 350 ± 70 pg/ml), el % de LTCD4⁺IL-17⁺ (*Mtb*+ α IFN γ : $\%8 \pm 2$) y la IFM disminuyeron significativamente, sugiriendo que el desarrollo de LTh17 requeriría de la población Th1. Seguidamente estudiamos la expresión/función de PD-1 y 4-1BB, coestimuladores que podrían modular el microambiente de citoquinas en TB. Más del 90% de LTCD4⁺IL-17⁺ expresaron PD-1 y 4-1BB luego de estimulación con *Mtb*. Asimismo, del total de los LTCD4⁺PD-1⁺ el 20% fueron IL-17⁺, el 40% IFN γ ⁺ y < 5% IL-17⁺IFN γ ⁺. Así, el 65% de LTCD4⁺PD-1⁺ expresaron IL-17 y/o IFN γ . Observamos resultados similares sobre la población LTCD4⁺4-1BB⁺. Interesantemente, al bloquear la vía de PD-1 se incrementó significativamente la IL-17, mientras que observamos el efecto inverso al bloquear 4-1BB (*Mtb*: 420 ± 56 pg/ml; *Mtb*+PD-1+PDLs: 822 ± 186 pg/ml; *Mtb*+4-1BB: 306 ± 47 pg/ml). Estos resultados sugerirían un rol inhibitorio de la vía de PD-1 y estimulador de 4-1BB sobre la producción de IL-17. Previamente observamos el mismo efecto sobre la producción de IFN γ . En conjunto demostramos que en TB, las poblaciones Th1 y Th17 coexisten, se regulan entre sí y son moduladas por las mismas vías de coestimulación.

628 (673) IMPORTANCIA DE LA VÍA PD-1/PD-LS EN LA INMUNOSUPRESIÓN Y EN EL PERFIL DE CITOQUINAS GENERADO DURANTE LA INFECCIÓN CON TRYPANOSOMA CRUZI. Dulgerian L.¹; Garrido V.²; Stempin C.³; Cerbán F.⁴

CIBICI-CONICET, Fac. Ciencias Químicas-UNC^{1,2,3,4} <ldulgerian@fcq.unc.edu.ar>

Durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi*, la respuesta proliferativa de las células T hacia antígenos parasitarios como hacia mitógenos se encuentra suprimida. Diversos trabajos le otorgaron una participación importante a los macrófagos (Mf), los cuales son activados alternativamente en presencia de *T. cruzi*, generando un aumento en la producción de IL-10 y en la actividad de arginasa, favoreciendo de este modo la replicación parasitaria. Debido a que PD-1/PD-Ls aumentan su expresión en Mf peritoneales y en células T durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* y que el bloqueo de PD-L2 genera un aumento en la actividad y expresión de arginasa, nos propusimos evaluar si esta vía está involucrada en la inmunosupresión observada durante la infección y cual es el perfil de citoquinas generado. Para cumplimentar con el primer objetivo, células T CD90.2+ fueron purificadas y co-cultivadas con Mf F4/80+ (purificados de ratones infectados o normales) en presencia de Concanavalina A. Luego de 72 hs de cultivo se determinaron las cpm, previo agregado de Timidina [H3]. La proliferación de células T CD90.2+ fue restaurada cuando las células fueron tratadas con anti-PD-1 y anti-PD-L1, pero no con anti-PD-L2. En relación al segundo objetivo, determinamos IL-10 e IFN- γ por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de células peritoneales de ratones infectados y de células peritoneales infectadas *in vitro* tratadas con anti PD-1/PD-Ls. Luego de 48 hs de cultivo, observamos un aumento de IL-10 y una disminución de IFN- γ en células peritoneales tratadas con anti-PD-L2, 15 días post infección. Además, en los sobrenadantes de cultivos de células infectadas *in vitro*, tratadas con anti-PD-L2, IL-10 también se vio incrementada. Estos resultados sugieren que durante la infección con *T. cruzi*, la interacción de PD-1/PD-L1 suprimiría la proliferación de linfocitos T y que PD-L2 estaría involucrada en la modulación del perfil de citoquinas pro- y anti-inflamatorias.

- 629 (790) ANÁLISIS FINAL DEL REPERTORIO DE DOMINIOS VH DE LOS ANTICUERPOS ENCONTRADOS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CRÓNICA DE CHAGAS: NUEVAS PERSPECTIVAS.** Cauerhff A.¹; Grippo V.²; Mahler E.³; Gomez K.⁴; Elias F.⁵; Berek C.⁶; Levin M.⁷

IBBA-CONICET, Fundación Instituto Leloir; INGEBI-CONICET¹; INGEBI-CONICET^{2 3 4}; Deutsches Rheumaforschungszentrum, Berlin, Germany^{5 6}; INGEBI-CONICET⁷ <anacauer@gmail.com>

La enfermedad de Chagas crónica (cChHD) producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* es una enfermedad de evolución lenta que termina con una cardiopatía inflamatoria que puede conducir a la muerte. El parásito puede conducir a la exposición de ciertos antígenos y epitopes crípticos y en consecuencia a la inducción de la inflamación. El objetivo de este estudio es analizar el repertorio de genes VH de pacientes con cChHD para determinar si el uso de determinadas familias de genes es distintivo de dicha enfermedad en comparación con individuos sanos. El material genético de los LB fue extraído mediante microdissección, luego el ADN fue purificado, amplificado y secuenciado. Se analizaron cuatro pacientes con diferente grado de inflamación. En el paciente 1, con estructura miocárdica conservada, se amplificaron VHs pertenecientes a las familias de segmentos génicos VH1, VH3 y VH4 y de los segmentos JH4 y JH6. La longitud de los CDR3Hs fue de 14 aminoácidos en promedio, la comparación de las secuencias nucleotídicas de los VHs con las líneas germinales mostró un promedio de 29 mutaciones por VH. En el paciente 2 con inflamación activa se encontraron secuencias derivadas de los segmentos JH4, JH5 y JH6, y de las familias VH1 y VH4. La longitud de los CDR3Hs fue de 16 de aminoácidos, la cantidad de mutaciones fue de 34 por VH. El paciente 3 mostró inflamación severa, sus secuencias VH derivan de los genes JH4 y JH6 y de las familias VH1, VH3, y VH4. La longitud del CDR3H fue de 14 aminoácidos, y el número de mutaciones por VH fue de 25. Además, se analizaron 74 secuencias de un cuarto paciente que fueron seleccionadas usando phage display y antígenos de *T. cruzi*, las secuencias derivan de las familias VH1, VH3, VH4, VH5, VH6 y VH7. Como conclusión se observó que el número de mutaciones no se correlaciona con el grado de inflamación y que el repertorio de los pacientes con cChHD no difiere significativamente del encontrado en pacientes sanos.

- 630 (214) KIR-HLA AGAINST HIV-1 INFECTION IN DISCORDANT COUPLES.** Habegger De Sorrentino A.¹; Sinchi J.²; Fernandez H.³; Lopez R.⁴; Iliovich E.⁵

Histocompatibilidad. Hospital J.C. Perrando Chaco^{1 2 3}; Infectología Hospital J.C. Perrando Chaco^{4 5} <msp.histocompat@ecomchaco.com.ar>

The aim of this study was to investigate the genetic factors (HLA and KIR) which can contribute to the protection against HIV infection in infected individuals' partners who were highly exposed but persistently seronegative. We obtained DNA samples from 201 healthy controls and from 17 HIV serodiscordant heterosexual couples (17 HIV-1 negative individuals who are the couple of 17 HIV-1 positive patients.). The inhibitory KIR 3DL1 and the activating KIR 3DS1 were studied by using PCR with sequence specific primers according to the Norman's technique et al. The HLA-A and HLA-B locus alleles were genotyped by generic PCR locus-specific and analyzed by using reverse hybridization with sequence specific oligonucleotides. A significant decrease of HLA-B Bw4 / KIR3DS1 in HIV (+) versus HIV (-) ($P=0.00024$) was observed. No difference was observed when comparing HLA-B Bw4 / KIR3 DL1 $p=0, 61$, HLA-B Bw4 / KIR 3DS1 (-) ($p=0.14$) o HLA-B Bw4 / KIR 3DL1 (-) ($p=1.0$). The alleles group Bw4 which were present in HIV (-) couples were: B44/B51/B52/B57 ($p = 0,012$). The most frequent among them was the HLA-B * 44 (OR =0.12, $p=0.014$) allele. It was observed that the binding of KIR 3DS1 with some HLA-B* alleles which contain the Bw4 motif as a probable ligand, seem to have a protective effect against HIV infection in the seronegative partners of HIV infected individuals

- 631 (187) CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES P DE TRYPANOSOMA CRUZI EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS.** Gomez K.¹; Longhi S.²; Pérez Prados G.³; Salzberg S.⁴; Levin M.⁵

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)^{1 2}; Servicio de Cardiología. Hospital de Agudos Juan A. Fernandez, Buenos Aires, Argentina^{3 4}; Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI)⁵ <gomez@dna.uba.ar>

Los pacientes con Cardiopatía Chagásica crónica (CChC) poseen anticuerpos contra las proteínas ribosomales P del parásito *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*) que se unen y activan a los receptores cardíacos β -adrenérgicos y muscarínicos. Este trabajo propone estudiar la respuesta inmune celular contra las proteínas ribosomales del parásito con el propósito de investigar el rol de las mismas en la inmunopatogénesis de esta Enfermedad. En este estudio prospectivo a ciego, incluimos pacientes con la forma Indeterminada (electrocardiograma (ECG) normal), pacientes con CChC con o sin cardiomiopatía sintomática y diferentes grados de alteraciones en el ECG, e individuos sanos. Las células polimorfonucleares (PMN) aisladas de sangre periférica se incubaron con lisado de *T.cruzi* y las proteínas ribosomales P2 β , CP0, así como otras proteínas inmunogénicas (B13, IF8 y JL7). La proliferación se determinó por incorporación de 3H-timidina y se analizó, por FACS, la expresión de CD25 y HLA-DR en las poblaciones T, y CD5 y CD25 en las células B. Se estudió la respuesta humoral por ELISA y por Western-blot. Hasta el momento, los resultados mostraron que todos los pacientes desarrollaron anticuerpos contra las proteínas analizadas. Sin embargo, sólo se observó un aumento de la proliferación celular en presencia de la proteína ribosomal CP0 que se correlacionó con un aumento de la expresión de HLA-DR en linfocitos CD4+, mientras que el lisado de *T.cruzi* indujo un incremento de la proliferación de las células PMN y de la expresión de CD25 en linfocitos CD4+. Por otro lado, no se halló expresión de CD25 ni HLA-DR en las poblaciones CD8+, y sólo en dos pacientes se detectó un aumento de expresión de CD5 en las poblaciones CD19+. Puesto que es necesario incluir un número elevado de pacientes en este tipo de estudios, la correlación entre los parámetros linfocitarios y la patología cardíaca se realizará una vez finalizado el estudio, con la apertura de los datos clínicos del paciente.

NEUROCIENCIAS 5

- 632 (33) EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO DE DOSIS SUB-TÓXICAS DE ZNTE EN PARÁMETROS EXPLORATORIOS Y SOCIALES DE RATAS PRE-PUBERALES. EVIDENCIAS PRELIMINARES.** Alvarez Toro E.¹; Ratti S.²

Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, IMBECU-CONICET^{1 2} <ealvarez@fcm.uncu.edu.ar>

Los compuestos inorgánicos denominados "elementos trazas" han llamado la atención en biología molecular y neurofarmacología por su participación a bajas concentraciones con sistemas enzimáticos y regulación de la expresión génica en la célula. Nuestro laboratorio se interesó en evaluar la posibilidad que un tratamiento prolongado con estos elementos pudiera afectar parámetros comportamentales de exploración e interacción social, importantes en las conductas de relación y enfrentamiento en la rata. Se trabajó con crías provenientes de parejas expuestas a ZnTe (0.3 μ g/L) disuelto en el agua de beber. Ratas con agua corriente se consideraron control. Se dispuso de 2 grupos: (1) control (n=21) y (2) ZnTe (0.3 μ g/L, n=12). Los animales fueron expuestos al tratamiento desde su nacimiento hasta el día 30, donde se testaron en una caja de detección automática de activi-

dad conductual (OVM) y 24 h después a una prueba de interacción social (interacción intruso-huesped). Los resultados mostraron que el tratamiento con ZnTe no afectó la duración de la preñez, número de crías, conducta maternal ni la actividad motora general comparada a control. Sin embargo, la exploración subterránea (*head-dipping*), la actividad exploratoria vertical (*rearing*) y la exploración focalizada se modificaron significativamente, comparada a control (6.5±0.7 veces Vs 3±0.4 veces en 5 min, p<0.01, ZnTe Vs Control; 6.5±0.8 veces Vs 12±1 veces en 5 min, p<0.01; 20.26±4.69 seg Vs 42.11±8.43 seg en 5 min, p<0.05). En la prueba de interacción social, los animales tratados con ZnTe presentaron una latencia de inicio de contacto con el intruso significativamente mayor que los controles (42.5±26 seg Vs 13±2.1 seg en 3 min, p<0.01); un menor número de contactos (6.5±0.5 Vs 12±0.9 en 3 min, p<0.01) y una menor proporción de conducta «α» hacia el intruso (36.6±8.4% Vs 76.4±3.3%, p<0.01). Los resultados apoyan la idea que los elementos trazas afectan a nivel central las conductas exploratorias en la rata.

633 (136) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ST8SIALIII Y ÁCIDOS DISIÁLICOS EN EL CEREBRO DE RATONES DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL. Rinflerch A.¹; Burgos V.²; Loresi M.³; Argibay P.⁴

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires^{1 2 3 4}
<adriana.rinflerch@hospitalitaliano.org.ar>

Durante el procesamiento de las proteínas, éstas sufren modificaciones post y cotraduccionales. Entre ellos la adición de ácidos siálicos, que es catalizada por sialiltransferasas específicas. Tienen un rol importante en el SNC al evitar las interacciones homofílicas de N-CAM (molécula de adhesión celular neural) y otras moléculas, durante el desarrollo del sistema nervioso. Una variedad de ácidos siálicos se encuentran presentes en el cerebro de mamíferos entre ellos los ácidos disíalicos, cuyo rol aun es desconocido pero se sabe por evidencias *in Vitro* que son catalizados por la sialiltransferasa ST8SialIII. El objetivo del presente trabajo fue detectar y analizar los niveles de expresión de los ácidos disíalicos y la enzima ST8SialIII durante distintos estadios del desarrollo postnatal del sistema nervioso del ratón, mediante Inmunohistoquímica y PCR en tiempo real respectivamente. Muestras de Hipocampo, Bulbo y Corteza y Cerebelo de Ratones C57BL/6 Neonatos, de 5 días de vida. Jóvenes (AA1) de 2 meses, jóvenes de 4,5 meses (AA2) y Seniles de 10 meses de vida, fueron procesadas para cuantificación relativa de la expresión de la enzima ST8SialIII por PCR en tiempo real y para análisis inmunohistológico con un anticuerpo específico para ácidos disíalicos (S2-566). El nivel de expresión de la enzima ST8SialIII se mantiene constante durante los diferentes estadios en el Hipocampo, Bulbo y Corteza. En cambio presenta una disminución significativa (p<0.01) en Cerebelo de Seniles (0,3480 ± 0,1803) respecto a los Neonatos (1,0 ± 0,1060) y esta disminución es gradual. En los análisis histológicos pudimos observar el mismo patrón de expresión de ácidos disíalicos: constante en Hipocampo, Bulbo y Corteza, y una importante disminución de las marcas en Cerebelo. Estos resultados indican que la enzima ST8SialIII podría estar implicada en la síntesis de Disia *in vivo* y que ocurre una disminución dependiente de la edad en el cerebelo de los ratones.

634 (223) LA RESACA ALCOHÓLICA. ASPECTOS BIOQUÍMICOS EN LA ACCIÓN DE UN ANTIOXIDANTE. Karadayian A.¹; Bustamante J.²; Cutrera R.³; Loes Arnaiz S.⁴

*Dpto de Fisiología Facultad de Medicina UBA*¹ ; *Laboratorio de Radicales Libres en Biología FFyB UBA*² ; *Dpto de Fisiología Facultad de Medicina UBA*³ ; *Laboratorio de Radicales Libres en Biología FFyB UBA*⁴
<analia11@hotmail.com>

La resaca alcohólica se define como el período que tiene lugar luego de una ingesta copiosa de alcohol (OH), cuando éste

desaparece de la circulación sanguínea (alcoholemia=0). En humanos, durante dicho lapso, se presentan síntomas desagradables que comprometen el estado físico y anímico. En animales de experimentación, se observan alteraciones similares. Por otra parte, es conocido el rol de la melatonina (MT) por su acción antioxidante y neuroprotectora. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran un efecto benéfico de este metoxiidol sobre la coordinación neuromuscular en ratones machos durante la resaca. El objetivo de este trabajo fue estudiar la posible acción neuroprotectora y/o antioxidante de la melatonina en corteza cerebral en este modelo. Ratones machos adultos Swiss recibieron MT en el agua de bebida (25µg/ml) durante siete días o agua con vehículo. Al día siguiente se les administró una inyección i.p. de alcohol (3,8mg/kg) o salina. Al cabo de seis horas (alcoholemia=0) los animales fueron sacrificados y se evaluaron en corteza cerebral diferentes parámetros de la función mitocondrial: consumo de oxígeno, producción de peróxido de hidrógeno y óxido nítrico, así como la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial. Los resultados obtenidos mostraron que la velocidad de respiración aumenta significativamente durante la resaca (p<0.05). Se observa además que, durante este mismo período, la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial tiende a disminuir (p= 0.06). Ambas disminuciones se ven pronunciadas con melatonina (p<0.05). Asimismo, ésta reduce la producción de especies reactivas oxidantes independientemente de si los animales estaban o no en resaca. Esto demuestra que la melatonina actúa de manera complementaria durante la resaca alcohólica: protege del daño por radicales libres y restaura la respiración celular, permitiendo recuperar la homeostasis celular, alterada previamente durante esta etapa.

635 (296) EFECTO PROTECTOR DE MELATONINA ANTE ESTÍMULOS ADVERSOS CRÓNICOS EN RATA PREÑADA. Conti R.¹; Ponce R.²; Vermouth N.³

*Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba*¹ ; *Bioquímica y Biología Molecular, Fac. de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba; Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba*^{2 3}
<rominanataliaconti@hotmail.com>

La melatonina (Mel) es una hormona conocida por su importancia cronobiológica y sus propiedades antioxidantes, citoprotectoras y antiapoptóticas. El estrés gestacional durante un período crítico del desarrollo embrionario reprograma las respuestas endocrinas y de comportamiento en crías de mamíferos, e induce alteraciones a largo plazo en la regulación de los ejes hipotalámico-hipofisario-adrenal y hipotalámico-hipofisario-gonadal. El objetivo de este trabajo fue examinar el posible rol protector de la Mel administrada a ratas preñadas sometidas a luz constante (LL) o estrés crónico variado (ECV). Se analizó el comportamiento de ansiedad y capacidad fertilizante en crías nacidas de ratas tratadas con LL o ECV desde el día 10 al 20 de preñez a las que se les administró Mel (1 mg/Kg) en los últimos 5 días de gestación. El comportamiento de ansiedad se determinó con el test del laberinto en cruz elevada (*elevated plus-maze*) en crías de 60 días. A los 90 días se evaluó la capacidad fertilizante de esas crías y se estudió la histología del testículo. Como control se utilizaron crías de madres no tratadas. En crías nacidas de madres tratadas con LL o EVC se observaron alteraciones significativas en los parámetros registrados con el test, indicando mayor grado de ansiedad (p<0,05). Sólo el 27,3% y el 40% de los machos LL y EVC, respectivamente, fueron capaces de preñar una hembra receptiva, no observando cambios significativos en la espermatogénesis. La administración de Mel a las madres tratadas con LL o EVC previno en crías los efectos producidos por ambos tratamientos, no observando cambios significativos en los parámetros estudiados, respecto a las crías nacidas de madres controles. En conclusión, los resultados corroboran resultados previos acerca del rol protector de Mel sobre la programación materna e indicarían que la hormona posiblemente desencadene un mecanismo antioxidante con acción neuroprotectora, restaurando las conductas estudiadas.

636 (653) RESPUESTA DE LA ADRENODOXINA REDUCTASA EN MITOCONDRIA DE CEREBRO DE RATÓN FRENTE A AGENTES PORFIRINOGÉNICOS. Lavandera J.¹; Sampayo R.²; Battlle A.³; Buzaleh A.⁴

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET¹; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA²; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET³; Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP), CONICET; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA⁴ <chacabuco27@hotmail.com>

Los citocromos P450 (CYP) mitocondriales son proteínas integrales de membrana, y reciben electrones por reacciones de monooxigenación del NADPH vía dos proteínas solubles en la matriz, la NADPH adrenodoxina reductasa (AdR, EC 1.18.1.2) y la adrenodoxina. Participan fundamentalmente en el metabolismo de compuestos endógenos, aunque su rol en el metabolismo de xenobióticos es controversial. Las Porfirias son enfermedades metabólicas debidas a alteraciones en la biosíntesis del hemo, siendo los fármacos los principales desencadenantes. Una de las causas de la patofisiología del ataque agudo sería la limitada disponibilidad de hemo, cofactor de hemoproteínas como los CYP. Previamente observamos alteraciones en la actividad y expresión de la enzima NADPH citocromo P450 reductasa, responsable de transferir electrones al CYP en microsomas, por algunas drogas porfirinogénicas en encéfalo de ratón. El objetivo fue determinar si se producían alteraciones en la actividad y expresión de AdR en mitocondria de encéfalo de ratón frente a la administración de diferentes agentes porfirinogénicos. La actividad se midió según lo descrito por Sahara *et al.* (FEBS Lett. 1972, 28:45) y la expresión por Western Blot. La actividad de AdR disminuyó por la administración aguda de Enflurano (38%) e Isoflurano (68%), Veronal (60%) y Griseofulvina (Gris) tópica (70%) ($p < 0,05$) (Control actividad AdR=21,8±7,4 nmol/mg) La expresión de AdR aumentó entre 110 y 170% ($p < 0,05$) por Enflurano agudo, Isoflurano crónico y Veronal mientras que la Gris causó una disminución del 40% ($p < 0,05$). En conclusión, el sistema de monooxigenasas de Fase I mitocondrial se vio alterado de manera similar al microsomal. Dado que el sistema de CYP mitocondrial puede ser una fuente de radical oxígeno, cualquier alteración sobre el CYP o la enzima que le provee equivalentes de reducción, tendría consecuencias sobre las funciones biológicas de la mitocondria, afectando la homeostasis celular.

637 (670) RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II EN EL PRECONDICIONAMIENTO HIPOXICO EN CEREBRO DE RATA NEONATA SOMETIDA A HIPOXIA-ISQUEMIA. López Aguilera F.¹; Alvarez D.²; Plateo G.³; Seltzer A.⁴

IHEM Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Cuyo^{1 2 3 4} <franciscolopezaguilera@yahoo.com.ar>

En experimentos previos demostramos una disminución del tamaño de la lesión por efectos del preconditionamiento hipóxico (PCon) en el cerebro de ratas neonatas. Nuestro objetivo fue evaluar si los receptores de Angiotensina II participan en este fenómeno. El PCon consistió en someter a 3 sesiones de 30 min de autoasfixia a crías de ratas WKY de 7 días de edad. Todos los animales fueron lesionados (L) por hipoxia/isquemia (H/I), mediante ligadura permanente de la arteria carótida derecha en el día 8 postnatal y evaluados a las 24 - 48h y 7 días post lesión. Los controles (C) fueron sometidos a una lesión simulada. La magnitud de la injuria fue observada mediante marcadores IHQ de gliosis y vascularización: GFAP y Vimentina (Vim). La expresión de Vim y de los receptores de Angiotensina II se determinó por IHQ y WB. Resultados: A las 24 h post H/I los animales L presentaron edema del hemisferio ipsilateral y astrocitosis. En el área adyacente al cuerpo calloso, los astrocitos aparecen reactivos en ambos hemisferios. Se observaron numerosos astrocitos Vim + en el hemisferio lesionado y en todo el hipocampo. En los anima-

les PCon observamos una menor astrogliosis GFAP+, una ausencia de astrocitosis Vim+ y un incremento de vascularización Vim+ en la corteza cerebral. En los grupos L y PCon detectamos un aumento de la expresión de los receptores AT2 en las células piramidales del hipocampo en el hemisferio contralateral y en la corteza temporal en ambos hemisferios. La cuantificación de estos receptores por WB en homogenatos de cerebro demostró un aumento significativo $C100 \pm 0.577n=3$; PCon $152.5 \pm 16.5 n=3$ $p < 0.02$, Student t Test en los PCon respecto a los controles que se revierte gradualmente a tiempos posteriores. Conclusión: Los receptores AT2 aumentan su expresión en áreas periféricas a la lesión. Estos resultados sugieren que podrían estar mediando acciones neuroprotectoras en la zona de penumbra y estos efectos serían más acentuados en los animales PCon.

638 (680) MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES INDUCIDA POR MANGANESO EN CÉLULAS GLIALES. Alaimo A.¹; Gorojod R.²; Sapienza C.³; Kotler M.⁴

Laboratorio de Apoptosis, Dpto de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4} <aalaimo@qb.fcen.uba.ar>

La exposición crónica al Manganeso (Mn) conduce a su acumulación en el Sistema Nervioso Central y al establecimiento de una patología caracterizada por anormalidades neurológicas semejantes a las de la enfermedad de Parkinson (Manganismo). Las células gliales poseen un mecanismo de transporte de alta afinidad para el Mn, el cual se acumula en las mitocondrias. Objetivo: estudiar las vías de señalización involucradas en la apoptosis de células de glioma C6 expuestas a $MnCl_2$ (Mn^{2+}). Resultados: El Mn $750 \mu M$ generó citotoxicidad (50%, $p < 0.001$) y aumento en los niveles de ROS (77%, $p < 0.001$). Los antioxidantes NAC 10mM, Melatonina 0.5mM, GSH 1mM y ASA 1mM, previnieron la muerte en un 17 ($p < 0.01$), 35, 38 y 42% ($p < 0.001$) respectivamente. Se detectaron aumentos en los niveles de proteínas de la Vía Extrínseca: FAS-L (67%, $p < 0.01$) y Caspasa 8 (135%, $p < 0.001$). El inhibidor de caspasa 8, Z-IETD-FMK ($10 \mu M$) recuperó en un 40% la viabilidad celular. La implicancia de la Vía Intrínseca se demostró mediante: WB a través del clivaje total de Bid ($p < 0.001$) y un marcado aumento de p53 ($p < 0.001$) y mediante el análisis de la morfología mitocondrial y el balance de los eventos de fusión/fisión empleando MitoTracker Red y microscopía de fluorescencia. Se establecieron 3 categorías de células: con mitocondrias normales (tubulares), intermedias (tubulares con regiones globulares) y fragmentadas (globulares). El Mn^{2+} promovió la fisión mitocondrial determinada por la disminución de mitocondrias tubulares (60%; $p < 0.01$) y el aumento de las intermedias (96%; $p < 0.001$) y fragmentadas (67%; $p < 0.01$). Además, el Mn^{2+} produjo clivaje de OPA-1 (proteína implicada en la formación de redes tubulares cuyo clivaje induce fragmentación mitocondrial) y este disminuyó (90%) en presencia de Z-IETD-FMK. Conclusión: las células C6 incubadas con Mn^{2+} se comportan como células tipo II implicando a la cascada de muerte intrínseca, donde OPA-1 desempeña un rol relevante en el mantenimiento de la red mitocondrial.

639 (694) ROL DE LA VÍA LISOSOMAL EN LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR MANGANESO EN CÉLULAS DE GLIOMA C6. Gorojod R.¹; Alaimo A.²; Sapienza C.³; Kotler M.⁴

Laboratorio de Apoptosis. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.^{1 2 3 4} <rgorjod@qb.fcen.uba.ar>

El Manganeso (Mn) es un elemento esencial para el desarrollo y función del cerebro. La sobreexposición a este metal provoca su acumulación en la astrogliya produciendo Manganismo, un síndrome con características similares al Parkinson. Dado que hemos demostrado que la apoptosis inducida por Mn involucra un aumento de ROS, nuestra hipótesis de trabajo propone que esta condición podría comprometer la integridad lisosomal. Emplean-

do células C6 de glioma de rata, se evaluó la toxicidad del $MnCl_2$ 750 μ M a distintos tiempos. Empleando el ensayo de MTT, se detectó una disminución en la viabilidad de $6\pm 2\%$ ($p < 0.05$) y $40\pm 2\%$ ($p < 0.001$) para 6 y 24hs, respectivamente. En cambio, el ensayo con Neutral Red, un colorante vital que se acumula en lisosomas, mostró un aumento a las 6hs de incubación ($45\pm 4\%$, $p < 0.001$) y una disminución ($39\pm 4\%$, $p < 0.001$) a las 24hs con respecto al control. Por esta razón, se analizó la integridad de los lisosomas mediante microscopía de fluorescencia empleando naranja de acridina. Se observó un aumento a las 6hs en el número de células presentando fluorescencia roja, característica de la tinción lisosomal ($144\pm 28\%$, $p < 0.05$). Los resultados obtenidos por tinción con monodansylcadaverina confirmaron la ausencia de procesos autofágicos. Tanto la preincubación con un inhibidor de la bomba de protones lisosomal (Bafilomicina A1 0,1nM) como con un inhibidor de Catepsina D (Pepstatina A 10 μ M) protegieron a las células de la toxicidad inducida por Mn (24hs), conduciendo a una recuperación de la viabilidad de $19\pm 2\%$ ($p < 0.05$) y $40\pm 2\%$ ($p < 0.001$) respectivamente, medida por ensayo de MTT y de $15\pm 3\%$ ($p < 0.05$) determinada por Neutral Red para ambos inhibidores. Además, mediante análisis WB se demostró que ambos compuestos inhiben significativamente el clivaje de caspasa 8 inducido por Mn. Nuestros resultados sugieren un rol para la vía lisosomal en el daño celular inducido por Mn y señalan a la caspasa 8 como un participante central en la señalización de muerte.

640 (707) ROL DE LA ACUAPORINA 4 EN EL DESARROLLO DE UNA ENFERMEDAD DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: NEUROMIELITIS ÓPTICA (NMO). Fernández J.¹; Melamud L.²; Rivarola V.³; Ford P.⁴; Villa A.⁵; Capurro C.⁶

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.^{1 2 3 4}; *Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía.*⁵; *Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina.*⁶ <jmfur@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 localizada en los astrocitos. Sin embargo, el rol que jugaría la AQP4 en el desarrollo de la NMO es totalmente desconocido. Recientemente demostramos que los cultivos primarios de astrocitos de rata constituyen un modelo adecuado para evaluar los mecanismos de acción de la IgG-NMO. Por lo tanto, en este trabajo utilizamos estos cultivos para investigar si la expresión y función de la AQP4 se modifican ante la exposición a la IgG-NMO. Para ello expusimos a los cultivos de manera breve (1 h) o prolongada (12 h) a sueros, controles y de pacientes con diagnóstico de NMO, previamente deplegados. Luego se realizaron estudios moleculares y funcionales con técnicas de inmunocitoquímica y videomicroscopía de fluorescencia. Los estudios de inmunocitoquímica mostraron que luego de 1 h de incubación los sueros de pacientes NMO, pero no los controles, reconocen antígenos en la superficie de los astrocitos. Esta marca específica desaparece luego de someter a los astrocitos a 12 h de incubación con los sueros, sugiriendo la desaparición del antígeno de la membrana. En paralelo, los estudios funcionales de medición de la permeabilidad al agua mostraron que mientras 1 h de incubación de los astrocitos con los sueros de pacientes NMO produce una tendencia a la inhibición de la permeabilidad al agua, esta se vuelve significativa ante una incubación prolongada (τ , s^{-1} control vs. NMO: 13.7 ± 1.73 vs. 50.50 ± 5.17 , $p < 0.001$, $n=3$). Estos resultados sugieren que el suero de los pacientes NMO induciría una inhibición de la funcionalidad de la AQP4 lo cual podría implicar a este canal en la patogenia de la enfermedad.

641 (719) ESTADO EMOCIONAL Y PERFIL LIPÍDICO PERINATAL EN ADOLESCENTES. Cruz M.¹; Hernando P.²; Vargas P.³; Fracchia L.⁴

Cátedra de Metodología de la Investigación, Facultad de Medicina. UNTucumán^{1 2 3 4} <bqcaricruz@yahoo.com.ar>

El embarazo se acompaña de cambios en el metabolismo materno de las lipoproteínas para satisfacer las demandas nutricionales del feto. Numerosos estudios han documentado que alteraciones del ánimo están asociadas con bajos niveles plasmáticos de colesterol. Objetivo: Analizar la posible asociación entre disturbios emocionales y modificaciones en el perfil lipídico durante la gestación y el posparto de embarazadas adolescentes. Se estudiaron 47 adolescentes embarazadas, de 13 a 19 años de edad, nulíparas, que se encontraban cursando el tercer trimestre de gestación. Previo consentimiento informado, se aplicó el Cuestionario de Salud Prenatal (*Malaise Inventory*, MI) y los criterios diagnósticos del DSM IV. Se tomó una muestra sanguínea en ayunas. Colesterol, triglicéridos y lipoproteínas fueron medidos en suero por métodos enzimáticos. Durante el posparto, se aplicó la Escala de Depresión Postnatal de Edimburgo (EDP) y se analizaron los mismos parámetros bioquímicos. Los resultados mostraron una prevalencia del 32% ($n=15$) de disturbios emocionales en el preparto. En el postparto ($n=14$) se encontró un 42% ($n=6$) de depresión. El delta (Δ) entre el pre y postparto para colesterol total fue significativamente ($p < 0.05$) más elevado, debido al descenso brusco de este en las madres con depresión, comparadas con las madres no deprimidas. No se encontraron diferencias significativas para el resto de las fracciones. Aunque estos hallazgos no son concluyentes, probablemente debido al escaso tamaño muestral, indicarían que la mayor diferencia en el descenso de colesterol total, avalaría la hipótesis que lo postula como uno de los causantes de depresión posparto.

642 (754) LA MUERTE OLIGODENDROGLIAL MEDIADA POR LA HIPOXIA-ISQUEMIA Y LA CORRECCIÓN DEL DAÑO POR LA APOTRANSFERRINA. Guardia Clausi M.¹; Pasquini L.²; Pasquini J.³

Depto de Química Biológica IQUIFIB Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA^{1 2 3} <mgclausi@yahoo.com.ar>

En trabajos previos demostramos que una única inyección de apotransferrina (aTf) intracraneal (ICI) en ratas de 3 días produce una aceleración en la maduración de células oligodendrogliales (OLGc) (Marta et. al., 2000). Con el fin de investigar si la aTf protege a las células precursoras oligodendrogliales (OPCs) luego de una hipoxia-isquemia cerebral (H/I), empleamos el modelo de daño desarrollado por Vannucci (1981) y estudiamos sus efectos sobre la sustancia blanca en ratas neonatas antes y 24 h post ICI de aTf. La H/I produce un severo daño en la sustancia blanca 48 h después del insulto, que es máximo 3 días post H/I, con depósitos de hierro muy elevados en cuerpo calloso (CC) y un gran número de OLGc que sufren apoptosis. Concomitantemente se desarrolla un proceso inflamatorio con elevada astrogliosis y activación de células de la microglía. Luego de 2 semanas de H/I se observó una disminución en los marcadores de oligodendrocitos maduros -anhidrasa carbonica II, 2'3' nucleótido cíclico hidrolasa y proteína básica de mielina (MBP); parámetros que fueron corregidos por una simple inyección de aTf 24 h después de la H/I. Los estudios en la zona subventricular (SVZ) tras 3 días de daño indican que una población de células madres marcadas con nestina desaparece tras la inyección de aTf para convertirse en células positivas para PDGF receptor α , que indicaría una diferenciación aumentada hacia el destino oligodendroglial (Guardia Clausi y col., enviado). Realizamos cultivos de neuroesferas de la SVZ de animales sometidos a H/I e inyectados con aTf para caracterizar sus poblaciones, viabilidad y capacidad de proliferación. Las neuroesferas de ratas tratadas con aTf poseen mayor capacidad de proliferación y diferenciación hacia el linaje

oligodendroglial en coincidencia con lo observado en la SVZ. Concluimos que la aTf es capaz de producir un incremento en la diferenciación de los OPCs que se generan durante el daño de la H/I con el objeto de reparar el daño.

643 (32) LATERALIZACIÓN DE LOS CIRCUITOS NEURALES DEL HIPOCAMPO EN LA ADQUISICIÓN DE UNA RESPUESTA DE EVITACIÓN CONDICIONADA. Alvarez Toro E.¹; Banzan A.²

Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, IMBECU-CONICET¹ ² <ealvarez@fcm.uncu.edu.ar>

En los últimos años se ha acumulado una gran cantidad de evidencias sobre la lateralización de circuitos neurales pareados en el cerebro que controlan diversas funciones fisiológicas. Trabajos previos de este laboratorio han mostrado que el hipocampo (HPC) participa modulando la lateralidad de conductas espontáneas de decisión exploratoria. El objetivo de esta investigación fue evaluar si la lateralización neuronal del HPC regula también los mecanismos de memoria y aprendizaje. Se usaron ratas macho adultas, las que se implantaron en ambos hipocampos con cánulas de microinyección ($N=115$), formándose los grupos hipocampo derecho (HPC_D , $n=31$), hipocampo izquierdo (HPC_I , $n=43$) y ambos hipocampos (HPC_{ID} , $n=41$). Distintos grupos fueron microinyectados en HPC_I , HPC_D o HPC_{ID} , con 0.2, 2, y 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de lidocaína y salina. Salina en ambos HPC, se consideró «control» ($n=11$). Todos los animales se sometieron al protocolo establecido de aprendizaje de una respuesta de evitación condicionada a un tono de ultrasonido, como se ha descrito en trabajos previos. Los resultados mostraron que la proporción de animales controles con latencia de escape < 30s en los últimos 4 ensayos y una eficiencia de aprendizaje > 60% (CAR, respuestas positivas acumuladas), fue de 77.7% en ambos casos. La administración de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de lidocaína en ambos HPC significativamente disminuyó la proporción de animales con latencia < 30s y CAR > 60% a un 10% en ambos casos ($p < 0.01$ Vs control). A la misma dosis de lidocaína, solamente el bloqueo del HPC_D disminuyó significativamente la proporción de animales con criterio de aprendizaje comparado con el bloqueo del HPC_I (25% en latencia y 40% CAR Vs Control ($p < 0.025$); 45.5% en latencia y 45.5% en CAR, HPC_I Vs Control, n.s.). Las otras dosis de lidocaína tuvieron el mismo efecto en los distintos grupos. Se concluye que aparentemente el HPC no manifiesta lateralidad para modular la memoria y el aprendizaje.

644 (131) EVOLUCIÓN PSIQUIÁTRICA POSTQUIRÚRGICA DE PACIENTES CON EPILEPSIA DEL LÓBULO TEMPORAL REFRACTARIA CON ANTECEDENTES DE PSICOSIS. D'alesio L.¹; Scévola L.²; Oddo S.³; Kauffman M.⁴; Papayannis C.⁵; Donnoli V.⁶; Kochen S.⁷

Centro de Epilepsia Hospital Ramos Mejía, Instituto E de Robertis, CONICET¹ ² ³ ⁴ ⁵ ; Centro de Investigación en Esquizofrenia, Hospital Borda.⁶ ; Centro de Epilepsia Hospital Ramos Mejía, Instituto E de Robertis, CONICET⁷ <ldalessio@intramed.net.ar>

Introducción. Los pacientes con epilepsia temporal refractaria (ELTR) candidatos a cirugía de la epilepsia, constituyen una población con una alta prevalencia de trastornos psicóticos. Si bien no existen contraindicaciones psiquiátricas absolutas para efectuar cirugía de la epilepsia en estos pacientes, existen reportes contradictorios: mientras algunos mejoran de su condición psiquiátrica previa, otros pueden desarrollar psicosis de novo. **Objetivos:** Determinar los subtipos de psicosis en una población de pacientes con ELTR candidatos a cirugía de la epilepsia, y establecer la evolución psiquiátrica luego de la cirugía, en pacientes con antecedentes de psicosis (GP) y en pacientes sin antecedentes de psicosis (GC). **Material y métodos:** En todos los pacientes incluidos en este trabajo se realizó una evaluación neurológica com-

pleta, estudios electrofisiológicos, (Video- EEG, EEG interictal), y estudios de imágenes, (resonancia magnética nuclear estructural) para confirmar el diagnóstico de ELTR. La evaluación psiquiátrica se realizó antes y después de la cirugía (mínimo un año), de acuerdo a las entrevistas estructuradas del DSM IV, (SCID-I Y II) y la Clasificación Ictal. **Resultados.** Se incluyeron 40 pacientes con ELTR operados. 15 pacientes presentaban antecedentes de psicosis. Los trastornos psicóticos más frecuentes fueron la psicosis postictal transitoria (episodio psicótico breve) en 7 pacientes. 25 pacientes con ELTR sin antecedentes de psicosis fueron analizados como grupo control. Luego de la cirugía, 4 pacientes del GP desarrollaron psicosis. No encontramos trastornos psicóticos postquirúrgicos en el GC ($p < 0.05$). **Conclusiones:** La presencia de síntomas psicóticos prequirúrgicos se asoció a la aparición de psicosis postquirúrgica, sin embargo la mayoría de los pacientes con antecedentes de psicosis postictal de breve duración no desarrollaron psicosis postquirúrgica.

645 (139) ALTERACIONES DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA EN EL GIRO DENTADO DE RATONES TRANSGÉNICOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER. MODULACIÓN POR EXPOSICIÓN A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO. Beauquis J.¹; Galván V.²; Roig P.³; Gorostiza O.⁴; De Nicola A.⁵; Saravia F.⁶

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET¹; University of Texas, Health Science Center, San Antonio, Estados Unidos.² ; Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET³ ; Buck Institute for Age Research, Novato, Estados Unidos.⁴ ; Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET; Depto. de Bioquímica Humana, F de Medicina, UBA.⁵ ⁶ <beauquis@dna.uba.ar>

En la literatura existen numerosos reportes que le atribuyen propiedades protectoras a la estimulación cognitiva en ciertos desórdenes neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (AD). Nuestro objetivo fue explorar el efecto del enriquecimiento ambiental (EE) sobre las distintas etapas de la neurogénesis hipocampal en un modelo de AD y su potencial correlación con la función cognitiva. Ratones hembra transgénicos (tg) portadores de las mutaciones *Swedish* e *Indiana* en la proteína precursora de amiloide y sus controles no tg fueron alojados durante 3 meses en jaulas especiales conteniendo material de nido, tubos, una casa y juguetes plásticos o en jaulas standards (CS), desde los 5 a los 8 meses de vida. La tasa de proliferación celular medida por inmunohistoquímica para Ki67 en el giro dentado fue menor en los ratones tg comparados con los no tg y no se encontró efecto del EE. En consonancia, los tg mostraron un menor número de células doublecortin+. La supervivencia de las nuevas células se estudió administrando bromodesoxiuridina (BrdU) 21 días antes del sacrificio. El EE indujo un incremento en las células BrdU+ en ambos grupos (no-tg CS 59.8 ± 11.4 ; no-tg EE 135.2 ± 16.9 , $p < 0.01$ vs. no-tg CS; tg CS 21.3 ± 7.05 ; tg EE 64 ± 11.3 , $p < 0.05$ vs. tg CS células BrdU+). La relación $\text{BrdU} + \text{NeuN} / \text{BrdU} +$ calculada sobre la base de co-localización de BrdU con el marcador neuronal NeuN mediante microscopía confocal fue menor en los tg CS y el EE lo incrementó, sugiriendo que el EE estimula la etapa de diferenciación de la neurogenesis en el ratón tg. Evaluamos la memoria de trabajo en un laberinto en Y: la alternancia espontánea mejoraría en los ratones tg expuestos a EE. Sin embargo, no encontramos diferencias en cuanto al número de placas $A\beta+$ en la región CA1 entre los grupos transgénicos. Nuestros resultados sugieren un importante papel de los estímulos sociales, sensoriales y cognitivos en la reversión de la neuropatología hipocampal de la AD.

646 (184) EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD Y FACTIBILIDAD DE UN DIARIO BÁSICO DE CEFALÉAS. UN ESTUDIO MULTICÉNTRICO EN EUROPA Y LATINOAMÉRICA, DESARROLLADO POR EL EUROHEAD PROJECT. RESULTADOS PRELIMINARES. Figuerola M.¹; Milanov I.²; Jensen R.³; Tassorelli C.⁴; Pereira Monteiro J.⁵; Osipova V.⁶

CEDIE, CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez; Hospital de Clínicas José de San Martín UBA¹; EUROHEAD, Bulgaria²; EUROHEAD, Dinamarca³; EUROHEAD, Italia⁴; EUROHEAD, Portugal⁵; EUROHEAD, Rusia⁶ <mfiquerola@intramed.net>

En ausencia de marcadores biológicos el diagnóstico diferencial de las cefaleas depende mayoritariamente de una pormenorizada historia clínica y un examen físico normal. En la práctica clínica, los pacientes tienen dificultad para recordar las características y frecuencia de los ataques en el momento de la consulta. Con el objeto de evaluar la utilidad y factibilidad de un diario diagnóstico básico traducido al idioma oficial de cada país para el diagnóstico de migraña, cefalea tipo tensión y cefalea por abuso de medicación en 5 países de Europa y 2 de Latinoamérica, se estudiaron 610 pacientes divididos en dos grupos. En el grupo 1 (n=306, edad 39±0.7 años, 79% mujeres) el diagnóstico fue realizado basándose en la entrevista médica, el examen físico y el Diario Básico de la Cefalea, mientras que el grupo 2 (n=304, edad 39±0.69 años, 77% mujeres) se llegó al diagnóstico por la entrevista con el médico especialista y el examen físico sin el soporte del Diario. Además del Diario, los pacientes del grupo 1 respondieron un cuestionario sobre aceptación y dificultades de este instrumento, y los médicos intervinientes sobre utilidad del mismo. El Diario fue completado correctamente por el 95.7% de los pacientes. La cantidad de años con cefalea (14.7 vs 15.1 años), el número total de crisis mensuales (12.5 vs 13.3 crisis) y el número de días con consumo de analgésicos en el mes (9.2 vs 10.1 días) fueron similares en ambos grupos. Con respecto al diagnóstico de cefalea por abuso de medicación, el Diario más la entrevista demostró ser más eficaz que la entrevista sola (20.6% vs 14.5%; p<0.05). Con estos resultados preliminares podemos decir que este diseño de Diario Básico de la Cefalea es útil para diagnóstico diferencial, puede ser usado adecuadamente por el paciente, es aceptado por pacientes y médicos y demostró ser mejor para evaluar la cefalea por abuso de medicación que la historia del paciente relevada en la entrevista.

646b (474) EFECTO TERAPÉUTICO DE LA MELATONINA EN EL DETERIORO COGNITIVO MÍNIMO: UN ESTUDIO RESPECTIVO. APLICACIÓN EN NUEVOS PACIENTES Y AMPLIACIÓN DE SEGUIMIENTO. A M Furio 1, L I Brusco 1, D P Cardinali 1

¹Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires <amfurio@fmed.uba.ar>

El Deterioro Cognitivo Mínimo (DCM) es un síndrome caracterizado por alteraciones en la memoria que preceden a la demencia. Aproximadamente el 20% de los pacientes que presentan DCM progresan hacia Enfermedad de Alzheimer. En este estudio retrospectivo se evaluaron las funciones cognitivas de 60 pacientes, la mitad de los cuales habían recibido 3 - 9 mg de melatonina diaria 30 min antes del horario del sueño durante 18 a 24 meses, además de la medicación habitual. Los pacientes fueron evaluados inicialmente y al fin del tratamiento mediante una batería de test neuropsicológicos que incluyeron: Mini Mental test, Dígito Símbolo, ADAS, Trail A Y B y Rey Verbal. También se administró un inventario de Beck para evaluar depresión y un cuestionario de sueño y vigilia. Con excepción de Dígito Símbolo, los test neuropsicológicos mostraron una mejoría significativa p < 0.001 después del tratamiento con melatonina y en comparación con el grupo control. (test no paramétrico Mann-Whitney U-test). De manera concomitante disminuyó el puntaje del inventario de Beck y de la escala de somnolencia (p < 0.01) lo que indica una mejoría significativa del estado anímico y de la calidad sueño-vigilia. Estos resultados indican que la melatonina podría ser utilizada dentro del tratamiento del DCM como medicación adyuvante.

647b (530) GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NEUROESFERAS A PARTIR DE CÉLULAS MADRE TUMORALES OBTENIDAS DE GLIOMAS HUMANOS DE ALTO GRADO.

G A Videla Richardson 1, D D Fernandez Espinosa 1, M E Scassa 1, V Heyd 1, H Martinetto 2, N Arakaki 2, G E Sevlever 3

¹Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular-FLENI-Buenos Aires; ²Laboratorio de Neuropatología-FLENI-Buenos Aires; ³Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular y Laboratorio de Neuropatología-FLENI-Buenos Aires <lbdc@fleni.org.ar>

Actualmente se postula que los tumores gliales se originan en células madre o en células precursoras que no han completado el proceso de diferenciación; estos tumores contendrían un número limitado de células madre tumorales (CMT). La expansión in vitro de este tipo celular hipotético ofrecería un sistema sumamente útil para el estudio de la biología de estos tumores. En este trabajo, a partir de gliomas de alto grado, pudimos aislar neuroesferas, cultivando la masa tumoral en un medio libre de suero suplementado con bFGF y EGF. De esta forma caracterizamos una subpoblación celular que se mantuvo en adhesión sin proliferación y otra subpoblación fenotípicamente diferente, que permaneció en suspensión formando agregados a partir de sucesivas divisiones celulares (neuroesferas). Esta última presenta características y marcadores de las denominadas CMT (CD133), las cuales serían responsables del origen y la propagación de estas neoplasias. Los tumores utilizados fueron caracterizados histológica y molecularmente; todos ellos presentaron características típicas de glioblastoma (GBM): necrosis en empalizada, hiperplasia microvascular junto con amplificación de EGFR y delección de CDKN2A en varios casos. En ambas subpoblaciones se midió la expresión de distintos componentes del sistema de control del ciclo a través de qPCR. Mediante inmunocitoquímica pudimos observar la presencia de marcadores neuronales tales como O4, GFAP, Map2, Tuj1 y Nestina. Además, en cada una de las muestras tumorales se determinó el grado de eficiencia de formación de neuroesferas. Este trabajo demuestra la factibilidad de establecer cultivos de este tipo de células, lo que nos permitirá en el futuro ampliar el espectro de nuestros estudios para comprender los mecanismos de la gliomagénesis.

647c (247) MECANISMOS INTRACELULARES INVOLUCRADOS EN LA MODULACIÓN DE LA CAPTACIÓN NEURONAL DE NORADRENALINA (NA) EN EL HIPOTÁLAMO POSTERIOR (HP) POR ENDOTELINA 1 (ET1). S I Hope 1 2, H Granchetti 3, L Bianciotti 4, M S Vatta 3

¹Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET); ²Cátedra de Fisiología. FFYB.UBA; ³Cátedra de Fisiología (IQUIMEFA-CONICET). FFyB.UBA; ⁴Cátedra de Fisiopatología. FFyB.UBA <shope@ffyb.uba.ar>

La captación neuronal de NA constituye el mecanismo más importante de regulación de la concentración de la amina en el espacio sináptico y es el responsable de la terminación de la acción del transmisor. En trabajos previos demostramos que la ET1 disminuye la captación neuronal de NA en el HP en un 33.9% y sus efectos son mediados por receptores ETB. Sobre la base de éstos antecedentes se investigó las vías intracelulares involucradas. Los estudios se realizaron en HP de ratas Sprague Dawley macho (250-300 g). La captación neuronal de NA se determinó in vitro durante 5 min. (Hope y col. Neurochem Int. 53, 207, 2008) en presencia o ausencia de ET1 y los inhibidores de diferentes intermediarios intracelulares. Los resultados se expresan como %±ES (ANOVA y test de Student-Newman-Keuls; *p<0.05 y n:5-8). El decremento de la captación de NA producido por la ET1 10nM se bloqueó en presencia del inhibidor general de la óxido nítrico sintasa (NOS) y el de la isoforma neuronal (L-NAME 10µM, ET-1 72.9±2.6 vs ET-1+L-NAME 103.0±6.5* y ET-1+7-NI 101.6±2.6*, respectivamente). El mismo comportamiento se observó con los inhibidores de la Guanilato Ciclasa soluble, la PKG y la PKA (ET-1 68.3±1.6 vs ET-1+ODQ 95.5±7.0*; ET-1+KT5823 108.7±11.6* y ET-1+H-89 93.6±2.6*, respectivamente). Por su parte, tanto el inhibidor de la PLC como el de la PKC no modificaron el efecto de la ET-1 (ET-1 62.5±1.0 vs ET-1+U73122

64.0±2.0 y ET-1+GF109203x 55.3 ±1.4, respectivamente). Cabe aclarar que ninguno de los inhibidores utilizados modificaron per se la captación neuronal de NA. Éstos resultados nos permiten concluir que en el HP la disminución de la captación neuronal de NA producido por la ET1 está modulado por la vía del óxido nítrico/ GMPC/ PKG y la de AMPc/PKA.

PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR 3

- 647 (44) OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA VARIANTE DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA IN VITRO.** Mattio M.¹; Ceaglio N.²; Amadeo I.³; Perotti N.⁴; Oggero M.⁵; Kratje R.⁶; Etcheverrigaray M.⁷

Laboratorio de Cultivos Celulares- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral- CC 242-Ciudad Universitaria- 3000- Santa Fe- Argentina^{1, 2}; Zelltek S. A.-CC 242-Ciudad Universitaria- 3000- Santa Fe- Argentina³; Laboratorio de Cultivos Celulares- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- Universidad Nacional del Litoral- CC 242-Ciudad Universitaria- 3000- Santa Fe- Argentina^{4, 5, 6, 7} <mmattio@fbc.unl.edu.ar>

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) es un factor de crecimiento hematopoyético utilizado en el tratamiento de anemias causadas por insuficiencia renal crónica o por quimioterapias. En los últimos años, ha sido propuesta para tratar anomalías del sistema nervioso debido a su rol antiapoptótico y neuroprotector. En este caso, su actividad eritropoyética puede producir efectos adversos como policitemia, hipertensión y fenómenos protrombóticos. El objetivo del presente trabajo es la obtención y caracterización de una nueva combinación de glicoisofomas de EPO, a la que denominamos neuroepoetin (rhNEPO), que exhiba características neuroprotectoras y sin efectos indeseados. Dicha variante fue obtenida mediante una purificación alternativa de la EPO producida en células CHO, presentando una composición de isoformas de carácter más básico por isoelectroenfoque (rango de pI 4,2-6,1) y con menor contenido de ácido siálico (AS), determinado por el método del peryodato-resorcinol (6,9 moles AS/ mol de rhNEPO en comparación con 11,7 correspondientes a la rhEPO). Dichas características determinaron una menor actividad eritropoyética *in vivo* en ratones BALB/c normocitémicos (6.200 UI/mg con respecto a 132.000 UI/mg para la rhEPO). Además, ensayos *in vitro* en líneas celulares nerviosas PC-12 y SH SY5Y tratadas con 38 y 190 ng/ml de rhEPO y rhNEPO, 24 horas previas y durante la inducción de apoptosis mediante supresión de suero y factor de crecimiento neuronal (PC-12) o adición de estaurosporina (SH-SY5Y), mostraron un efecto protector estadísticamente significativo (p<0,05). La evaluación de la farmacocinética, tras una administración subcutánea de rhNEPO en ratas Wistar, demostró un mayor clearance plasmático (3,60 ml/min) y un menor tiempo de vida media (7,1 h) con respecto a la rhEPO (0,28 ml/min y 8,7 h, respectivamente). Estos resultados estimulan el estudio de la rhNEPO como una droga potencial para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso.

- 648 (105) MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL ARN MENSAJERO DE INTEGRINA BETA 1 (ITGB1) EN GLÁNDULA MAMARIA.** Naipauer J.¹; Gattelli A.²; Vinuesa A.³; Degese S.⁴; Quaglino A.⁵; Lamarre J.⁶; Coso O.⁷; Kordon E.⁸

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.¹; LEGMA – DQB; IFIBYNE – CONICET²; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.^{3, 4}; LEGMA – DQB; IFIBYNE – CONICET⁵; DBMS, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Canada⁶; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Cien-

cias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.⁷; LEGMA – DQB; IFIBYNE – CONICET⁸ <naipauer@fbmc.fcen.uba.ar>

Las integrinas pertenecen a una superfamilia de receptores heterodiméricos. Son la principal conexión entre la célula y el ambiente. Previamente obtuvimos la secuencia del cDNA correspondiente a una nueva especie de ARNm de Itgb1 (Itgb1-C) 578pb mas corta que la anteriormente reportada. Las diferentes especies de ARNm resultan del uso de sitios alternativos de poliadenilación, con secuencias ricas en AU (ARE) presentes en la forma mas larga, Itgb1-L. Estas dos isoformas del ARNm estarían diferencialmente reguladas en diferentes tejidos y a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo de la glándula mamaria. Nuestro objetivo es caracterizar la regulación de la estabilidad de la forma Itgb1-L en células mamarías bajo condiciones de proliferación o de involución del tejido. Encontramos que los estrógenos (E) producen un incremento en la isoforma Itgb1-L en mamas de ratones (ctrl 0,12±0,07; E 0,16±0,09). Asimismo el estímulo con EGF sobre células HC11 produjo un aumento de esta isoforma (ctrl 0,75±0,09; EGF 0,94±0,10). El análisis de expresión de las isoformas de los ARNm de Itgb1 durante la involución mamaria post-lactancia mostró una marcada disminución de los niveles de expresión de Itgb1-L. Utilizando un dispositivo que permite analizar a nivel bioquímico los efectos del estiramiento en células epiteliales HC11 nuestros estudios muestran que el estrés mecánico análogo al que sufren las células de una mama en el destete, lleva a una disminución de la isoforma Itgb1-L. En base a nuestras observaciones de los niveles de degradación del ARNm de la isoforma Itgb1-L concluimos que es menos estable que la isoforma Itgb1-C. Estos datos nos sugieren que la presencia de secuencias 3'UTR regulatorias podrían proveer una instancia de regulación, alternativa a la regulación del promotor para determinar con mayor precisión la abundancia de Itgb1 en las diferentes situaciones fisiológicas que atraviesa la glándula mamaria durante su desarrollo.

- 649 (226) LA ACTIVACIÓN MUSCARÍNICA POTENCIA EL EFECTO DEL PACLITAXEL EN CÉLULAS MCF-7.** Jacob M.¹; Español A.²; Diez R.³; Sales M.⁴

2ª Cátedra de Farmacología- Facultad de Medicina- UBA¹; CEFYBO-CONICET²; 2ª Cátedra de Farmacología- Facultad de Medicina- UBA³; CEFYBO-CONICET⁴ <guillermina_j@hotmail.com>

La resistencia a la quimioterapia es un problema crítico en la terapéutica tumoral. La combinación de drogas antitumorales es una posibilidad para mejorar su efecto individual, cuando se observa resistencia. El factor nuclear kappa B (NF-κB) tiene un rol central tanto en la organogénesis como en la tumorigénesis de la glándula mamaria. Es sabido que las drogas anti-tumorales pueden activar la vía del NF-κB e inducir resistencia a su utilización. Previamente demostramos que la activación de receptores muscarínicos en células tumorales de mama murina promueven la muerte celular. Nos propusimos investigar el papel de la activación muscarínica en el efecto citotóxico del paclitaxel (Ptx) en células MCF-7 (derivadas de un adenocarcinoma mamario humano) y la participación del factor NF-κB. La proliferación celular se determinó por el ensayo colorimétrico de MTT y se expresó como porcentaje de inhibición de la proliferación respecto del control sin tratamiento. Determinamos que tanto el Ptx como el agonista muscarínico carbacol (CARB) inhiben la proliferación en forma concentración-dependiente siendo las concentraciones efectivas máximas 10⁻⁸M y 10⁻⁷M respectivamente. El efecto inhibitorio máximo observado fue de 33±3% para Ptx y 34±2% para el CARB respectivamente (p<0,01 vs. control). En los ensayos siguientes se utilizaron concentraciones sub-umbrales que no tuvieron efecto sobre la proliferación de células MCF-7 ni MCF-10A (células de mama normal). La combinación de Ptx 10⁻¹¹M y CARB 10⁻⁸M inhibió la proliferación de células tumorales en un 39±4% (p<0,001 vs. control) sin modificar la viabilidad de células normales. El pretratamiento con MG-132 (inhibidor del NF-κB) aumenta el efecto de la combinación Ptx+CARB (50±6% p<0,05 vs. Ptx+CARB sin

MG-132). Concluimos que la asociación de un quimioterápico con un agonista muscarínico potencia el efecto citotóxico en células tumorales de mama, el cual podría incrementarse en presencia de inhibidores de la vía del NF- κ B.

- 650 (243) CÉLULAS GERMINALES DE RATONES MACHOS HÍBRIDOS INFÉRTILES CON FUSIONES ROBERTSONIANAS PRESENTAN CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS, ESTRUCTURALES Y ULTRAESTRUCTURALES DE APOPTOSIS.** Díaz De Barboza G.¹; Rodríguez V.²; Ponce R.³; Theiler G.⁴; Maldonado C.⁵; Tolosa De Talamoni N.⁶

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba^{1 2}; Química y Física Biológicas, Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba^{3 4}; Centro de Microscopía Electrónica, Universidad Nacional de Córdoba⁵; Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba⁶ <gabyediaz@yahoo.com>

Fusiones cromosómicas Robertsonianas desencadenan alteraciones de la espermatogénesis y causan infertilidad masculina. Ratonos *Graomys* híbridos infértiles (2n=38) surgidos del cruzamiento de machos *G.centralis* (2n=42) y hembras *G.griseoflavus* (2n=34) presentan fusiones Robertsonianas. Previamente demostramos que en los híbridos un elevado número de células de la progeie espermatogénica muere por apoptosis. En este trabajo estudiamos las características morfológicas y ultraestructurales de células germinales normales y con evidencias inmunohistoquímicas de apoptosis en ratones híbridos y parentales empleados como controles. Las células en proceso apoptótico se identificaron mediante inmunolocalización de Bax, citocromo c y por técnica de TUNEL. Las características estructurales y ultraestructurales se analizaron por métodos histológicos y por microscopía electrónica. Los resultados revelaron en híbridos un marcado deterioro espermatogénico con arresto a nivel de espermatozoides primario en paquitene. Un elevado número de este tipo celular mostró inmunotinción positiva para Bax, citocromo c y TUNEL y alteraciones morfológicas. El estudio ultraestructural reveló abundantes espermatozoides con mitocondrias de localización perinuclear, membrana nuclear alterada y condensaciones de la cromatina compatibles con características apoptóticas. Se encontraron escasas espermátides que tenían estructuras atípicas. Las especies parentales revelaron ciclo espermático completo con características morfológicas y ultraestructurales normales, presentando doce estadios germinales compatibles con los descriptores para otras especies de ratones. La presencia de fusiones Robertsonianas en híbridos alteraría la expresión de ciertos genes provocando arresto de la serie espermatogénica e induciendo la infertilidad. Los ratones *Graomys* híbridos representan un modelo experimental adecuado para el estudio de alteraciones moleculares desencadenadas por fusiones cromosómicas que causan infertilidad.

- 651 (334) VIP INHIBE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR TNF-ALFA EN CÉLULAS ACINARES DE RATONES NOD POR FOSFORILACIÓN DE BAD VÍA PROTEÍNA KINASA A.** Calafat M.¹; Azzam S.²; Hauk V.³; Perez Leiros C.⁴

Laboratorio de Inmunofarmacología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.^{1 2 3 4} <mcalfat@qb.fcen.uba.ar>

El papel del epitelio secretor apoptótico como un disparador pro inflamatorio de la disfunción exocrina se esta explorando actualmente en pacientes con Síndrome de Sjögren y en modelo de ratón diabético no obeso (NOD). El péptido intestinal vasoactivo (VIP) tiene efectos anti-inflamatorios en varios modelos de inflamación crónica. En trabajos previos demostramos que los acinos NOD son más sensibles a la apoptosis inducida por TNF- α y que VIP inhibe este efecto a través de receptores VPAC1 acoplados

a una vía de señalización por PKA. BAD es un miembro de la familia BH3. En su forma desfosforilada, BAD interactúa con Bcl-XL inhibiendo su acción anti apoptótica. BAD es la primera proteína proapoptótica que se ha demostrado que es inhibida por fosforilación. El objetivo de este trabajo es por un lado, caracterizar la vía de transducción inducida por VIP para modular la apoptosis y por otro es cuantificar el nivel endógeno de VIP en el inicio de la disfunción secretoria. Se emplearon hembras de 16 semanas, la apoptosis se determinó por Hoescht, Caspasa 3, expresión de bax, TP53INP1 (RT-PCR) y BAD fosforilado en la serina112 por Western Blot. Receptor 1 y 2 de VIP (VPAC1 y VPAC2) por RT-PCR. Se determino por Real Time RT-PCR la concentración relativa de RNAm de VIP en glándulas totales. En acinos de ratones NOD VIP (10^{-7} M) induce significativamente la fosforilación de BAD (UA: X \pm ES; BASAL 31 \pm 3; TNF 14 \pm 5; VIP144 \pm 9*, *P<0.05 vs BASAL TNF.) La preincubación con H89 ((inh de PKA, 1 μ M) inhibe parcialmente este efecto. (UA: X \pm ES; VIP 144 \pm 9; H89 109 \pm 8). A las 16 semanas la expresión endógena de RNAm de VIP es significativamente menor en glándulas de NOD vs controles (UA: X \pm ES; BALB/c 166 \pm 10; NOD 50 \pm 7*, *P<0.05 vs BALB/c).VIP ejerce sus función a través del receptor VPAC1 activando a PKA, la cual fosforila a BAD, inhibiendo su acción apoptótica. En glándulas de ratones NOD DE 16 semanas la expresión de RNAm de VIP es mínima.

- 652 (353) LA HISTAMINA COMO MODULADOR AUTÓCRINO Y/O PARÁCRINO DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS DE LEYDIG MA-10.** Mondillo C.¹; Medina V.²; Pagotto R.³; Rogic G.⁴; Rivera E.⁵; Besio Moreno M.⁶; Pignataro O.⁷

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)¹; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB), Universidad de Buenos Aires²; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)^{3 4}; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB), Universidad de Buenos Aires⁵; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)^{6 7} <mondillo@dna.uba.ar>

La histamina (HA) es una amina biogénica que se sintetiza a partir de L-histidina, en una reacción catalizada por la enzima L-histidina descarboxilasa (HDC). La expresión de HDC no se circunscribe a los mastocitos, y se ha reportado que HA actuaría como factor de crecimiento autocrino y/o paracrino en diversos modelos experimentales, incluyendo células normales y tumorales. Con referencia al testículo, hasta la fecha sólo se ha reportado expresión de HDC en células germinales murinas. En nuestro laboratorio demostramos que las células MA-10 y Leydig de rata expresan los subtipos de receptores histaminérgicos H1 y H2. También demostramos que HA ejerce un efecto dual, concentración-dependiente, sobre la esteroidogénesis. Objetivo: Investigar el posible papel de HA como modulador autocrino y/o paracrino de la proliferación de células de Leydig (CL), utilizando la línea MA-10 como modelo experimental. Métodos: Se evaluó la expresión de HDC por inmunocitoquímica (ICQ) y Western Blot (WB). La actividad de la enzima se determinó midiendo el 14 CO₂ liberado a partir de la descarboxilación específica de L-carboxyl- 14 C-histidina. Para evaluar proliferación celular se empleó la técnica de incorporación de timidina tritiada. Resultados: Se observó expresión de HDC por ICQ y WB. También se detectó actividad enzimática (780 pmol 14 CO₂/10⁶ cél x h). El tratamiento con HA 1nM durante 24 horas produjo un incremento significativo de la proliferación celular (CT: 130657 \pm 12815cpm; HA: 254789 \pm 13290cpm; p<0,001 vs CT). Se obtuvieron resultados similares en presencia de amthamina (A), un agonista específico H2 (CT: 139685 \pm 7624cpm; A: 249267 \pm 15895cpm; p<0,001 vs CT). Conclusión: Los resultados sugieren que las CL MA-10 son capaces de sintetizar HA. La misma cumpliría un papel en la regulación autocrina y/o parácrina de la proliferación celular, siendo H2 al menos uno de los receptores involucrados en el mecanismo de acción. (Subsidios: CONICET, UBA X218 y ANPCYT-PICT 2005 5-38281).

653 (489) EL TRATAMIENTO CONJUNTO DE CALCITRIOL Y DL-BUTIONINA-S,R-SULFOXIMINA INHIBE LA PROLIFERACION DE CELULAS DE CANCER DE COLON. Picotto G.¹; Liaudat C.²; Bohl L.³; Tolosa De Talamoni N.⁴

Laboratorio "Dr. F. Cañas", Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.^{1 2 3 4} <gpicotto@criba.edu.ar>

Los estudios epidemiológicos sugieren que el 1,25(OH)₂D₃ o calcitriol disminuye el riesgo de contraer cáncer de colon. Se ha demostrado que reduce la proliferación de células de cáncer de colon debido en parte al incremento del estrés oxidativo. Sin embargo, el uso del calcitriol produce efectos secundarios indeseables tales como la hipercalcemia. Ello ha llevado al desarrollo de estrategias terapéuticas que reduzcan los efectos secundarios. El objetivo de nuestro trabajo fue medir el efecto del calcitriol y de DL-butionina-S,R-sulfoximina (BSO), inhibidor de la síntesis de glutatión (GSH), sobre la proliferación de células de cáncer de colon (Caco-2) y evaluar los posibles mecanismos involucrados. Las células se trataron con diferentes dosis de calcitriol (1-200 nM), de BSO (2-500 mM), o con ambas drogas o vehículo (etanol < 0.1%) a distintos tiempos. La proliferación celular se determinó por la técnica de violeta de cristal. La actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), fosfatasa alcalina (FAL) y los niveles de GSH se midieron por espectrofotometría. Los datos indican que tanto BSO como calcitriol inhibieron el crecimiento de las células Caco-2, efecto que fue dependiente del tiempo y de la concentración. La mayor disminución de la proliferación celular se observó a las 96 hs, siendo este efecto mayor con la administración conjunta. Los niveles de GSH descendieron con BSO y con el tratamiento combinado a las 6 hs. Se observó aumento significativo en la actividad de FAL por los tratamientos con calcitriol y combinado, de CAT sólo con el tratamiento combinado y SOD permaneció sin modificación. En conclusión, BSO potencia el efecto antiproliferativo de 1,25(OH)₂D₃ sobre las células de cáncer de colon mediante aumento del estrés oxidativo, por depleción de GSH, el cual no puede ser compensado por la modificación del sistema antioxidante enzimático. El incremento de FAL sugiere una inducción de la diferenciación celular debida al calcitriol.

654 (502) EL COACTIVADOR DE RECEPTORES NUCLEARES RAC3 INHIBE LA AUTOFAGIA. Fernández Larrosa P.¹; Ruiz Grecco M.²; Alvarado C.³; Rubio M.⁴; Micenmacher S.⁵; Costas M.⁶

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari^{1 2 3 4 5 6} <pabloferla@hotmail.com>

El coactivador de receptores nucleares RAC3 esta sobreexpresado naturalmente en diversos tumores. Demostramos que RAC3 es un coactivador del factor de transcripción NF-κB, involucrado en respuestas proliferativas, anti-apoptóticas, y de diferenciación. A pesar de que RAC3 tiene actividad anti-apoptótica, se desconoce su capacidad de regular la autofagia. Sin embargo, se sabe que al aumentar la actividad de NF-κB, la autofagia es inhibida; y que la autofagia actúa como supresor del desarrollo tumoral en etapas tempranas. Por ende, nuestro objetivo fue evaluar si RAC3 modula la autofagia, y si dicha modulación es vía la activación de NF-κB. Células de la línea celular HEK293 fueron transfectadas con un plásmido que expresa RAC3 o con el vector vacío como control. Luego de 24 hs, las células fueron incubadas en condiciones de ayuno durante 6 hs, y tratadas con MDC para detectar la formación de autofagosomas. Las células con autofagia fueron observadas en un microscopio de fluorescencia, y contadas sobre un total de 200 células. Para analizar si su acción es vía NF-κB, las células fueron transfectadas con RAC3 mutado en su capacidad de migrar al núcleo, o cotransfectadas con RAC3 e IKBss (IKB super-represor con capacidad de inhibir constitutivamente a NF-κB). En condiciones de ayuno, las células transfectadas con RAC3 sólo mostraron autofagia en un 10%; mientras que en el control, el porcentaje de células positivas aumentó a un 70% (p<0,01). Cuando se realizó la transfección con RAC3 mutado o la

cotransfección RAC3/IKBss, los niveles de autofagia fueron del 35-30%. En conclusión, la sobreexpresión de RAC3 puede inhibir la autofagia inducida por ayuno, y dicha modulación sólo puede ser explicada parcialmente por la activación de NF-κB. Es posible que RAC3 tenga la capacidad de modular los niveles de autofagia a nivel citoplasmático, sin la necesidad de migrar al núcleo y activar a NF-κB. Este sería otro mecanismo por el cual podría contribuir al desarrollo tumoral.

655 (511) EFECTO DEL HCB SOBRE LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS TIROIDEAS DE RATA FRLT-5. Chiappini F.¹; Alvarez L.²; Randi A.³; Kleiman De Pisarev D.⁴

Lab. Efectos biológicos de contaminantes ambientales. Dpto de Bioquímica Humana. Fac. Medicina UBA^{1 2 3 4} <florenchiappini@hotmail.com>

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental deletéreo para la salud humana. En animales produce porfiria, disfunciones reproductivas, tiroideas, inmunológicas y es carcinogénico en mama, hígado y tiroides. Demostramos previamente que el HCB, en dosis que no afectaban la homeostasis tiroidea, inducía apoptosis y aumento en la expresión de TGF-β1 en tiroides de rata. El TGF-β1 es un inhibidor del crecimiento de células tiroideas e inductor de apoptosis. Objetivos: Estudiar el efecto del HCB sobre la regulación del crecimiento de células tiroideas de rata, FRLT-5. Se realizaron ensayos en función del tiempo (2, 6, 8, 24 y 48 h) con HCB 5 μM y de la dosis (0,005; 0,05; 0,5 y 5 μM) a las 8 h, evaluándose por inmunoblot: a) la proliferación celular (PCNA); b) la inducción de apoptosis por la activación de la caspasa 3; c) vías apoptóticas involucradas: la vía extrínseca por la activación de la caspasa 10, y la intrínseca por la liberación de AIF mitocondrial; d) la activación de MAPKs asociadas a vías de supervivencia y apoptosis, como ERK1/2 y JNK; e) la expresión de TGF-β1 (RT-PCR). Resultados: a) no se alteró la proliferación celular; b) la activación de caspasa 3 aumentó en función de la dosis y del tiempo a partir de las 6 h con un pico a las 8 h (460%, p<0.05); c) los niveles de procaspasa 10 disminuyeron a las 8 h (40% p<0.05). El AIF citosólico aumentó en todos los tiempos, desde las 6 h con un pico a las 8 h (170%, p<0.05); d) los niveles de JNK-P aumentaron a las 6 y 8 h, (60 y 50% respectivamente p<0.05), retornando a los valores controles a las 24 h y los niveles de ERK-P aumentaron a las 8 h, (208%, p<0.05); e) la expresión de TGF-β1 aumentó a las 6 y 8 h, (75 y 55% respectivamente p<0.05), retornando a los valores controles a las 24 h. Conclusión: El HCB induce la expresión de TGF-β1 y apoptosis involucrando tanto la vía extrínseca como la vía intrínseca. Los resultados sugieren que JNK y ERK1/2, podrían estar asociadas a este proceso.

656 (514) LA AUTOFAGIA PROTECTORA CONTRIBUYE A LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS persistentemente INFECTADAS CON HIV-1. Fernandez Larrosa P.¹; Grasso D.²; Vacotto M.³; Martinez Peralta L.⁴; Vaccaro M.⁵

Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari¹; Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires²; Centro Nacional de Referencia para el SIDA, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires^{3 4}; Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires⁵ <pabloferla@hotmail.com>

Las células que actúan como reservorios para el HIV resisten a la muerte por diferentes mecanismos. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que líneas celulares persistentemente infectadas con HIV son resistentes a la apoptosis mediante la regulación de Bax a nivel mitocondrial, independientemente de Bcl-2. Para explicar dicho fenómeno se podría invocar su mayor capacidad para realizar autofagia, con eliminación de las mitocondrias dañadas. Con este fin, células de las líneas H9 y U937, y sus clones persistentemente infectados (H9/HTLVIII B y U1, respectivamente) fueron tratados con 0,1μM Staurosporine

(STS) como inductores de apoptosis durante 24 horas. En paralelo, las mismas células fueron incubadas con medio como control negativo, o en condiciones de ayuno por 6 horas, como control positivo de autofagia. Finalmente fueron incubadas con Monodansil-Cadaverina (MDC) 0,15 mM por 10 minutos a 37°C y observadas en un microscopio de fluorescencia. Las células con autofagosomas fueron cuantificadas sobre un total de 200. Las líneas H9 y H9/HTLVIII control no mostraron autofagia, mientras que en condiciones de ayuno, ambas fueron positivas en un 50-60%. Cuando fueron tratadas con STS, sólo un 15% de las H9 fueron positivas, mientras que las H9/HTLVIII mostraron un 50% de positividad para autofagosomas ($p < 0,01$). Estos hallazgos fueron confirmados en las líneas U937 y U1, si bien se observaron niveles basales de autofagosomas. Estos resultados claramente sugieren que las células persistentemente infectadas con HIV muestran niveles elevados de autofagia cuando son tratadas con inductores de apoptosis. La autofagia protectora podría eliminar las mitocondrias dañadas antes que la apoptosis se desencadene, lo que explicaría la disminución de los niveles de Bax en mitocondria. Esta es la primera evidencia en que la autofagia podría impedir la apoptosis en una infección viral, contribuyendo a la supervivencia de los reservorios virales.

657 (538) REGULACIÓN DEL PROMOTOR 1 DE BCL-X POR EGF EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS HC11.

Romorini L.¹; Grinman D.²; Coso O.³; Pecci A.⁴

Depto. de Química Biológica, IFIBYNE-CONICET, FCEN, UBA.¹; Depto. de Química Biológica, IFIBYNE-CONICET, LEGMA, FCEN, UBA.²; Depto. de FBMC, IFIBYNE-CONICET, FCEN, UBA.³; Depto. de Química Biológica, IFIBYNE-CONICET, LEGMA, FCEN, UBA.⁴ <adalpecci@yahoo.com.ar>

EGF activa vías de señalización asociadas con la proliferación celular y la apoptosis. Hemos demostrado previamente que la regulación de los niveles proteicos y de ARNm de Bcl-X_L (antiapoptótica) es fundamental en la inhibición de la apoptosis mediada por EGF en células epiteliales mamarias HC11, siendo PI3K/AKT la principal vía involucrada. En este trabajo estudiamos cuál/es de los cinco promotores y cuál/es factores de transcripción median la expresión de *bcl-x* por EGF. Se cuantificaron los niveles de los transcritos generados a partir de los distintos promotores de *bcl-x* por RT-qPCR y se observó que sólo los niveles de los transcritos provenientes del promotor 1 (P1) aumentan luego del tratamiento con EGF ($2 \pm 0,1$ veces vs. control). Esta inducción es bloqueada por LY294002, inhibidor de PI3K ($1,1 \pm 0,01$ veces vs. control). El análisis *in silico* de la secuencia de P1 reveló la presencia de sitios de unión de los factores de transcripción AP1, ETS, NFKB, STAT5, CREB y C/EBP, todos ellos plausibles de ser activados por EGF. Se co-transfectaron células HC11 con un vector reportero pP1-Luc junto con vectores de expresión de AKT y los distintos factores mencionados. Se observó que AKT, Ets-2 y CREB activan a P1 ($1,4 \pm 0,1$; $1,8 \pm 0,1$ y $3,5 \pm 0,2$ veces vs. control, respectivamente). Conclusión: La activación de PI3K/AKT por EGF aumenta los niveles de *bcl-x* por regulación de P1, siendo CREB y/o Ets-2 posibles factores mediadores de este efecto.

658 (566) LA INDUCCIÓN DE SENESCENCIA PODRÍA INVOLUCRAR CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE COACTIVADORES QUE PARTICIPAN EN EL DESARROLLO TUMORAL. Ruiz Grecco M.¹; Rubio M.²; Fernandez Larrosa P.³; Alvarado C.⁴; Micenmacher S.⁵; Costas M.⁶

Instituto Lanari^{1 2 3 4 5 6} <marinals@gmail.com>

La senescencia celular es un proceso genéticamente controlado que involucra el arresto irreversible del ciclo celular y puede ocurrir por dos mecanismos: acortamiento de telómeros o acumulación de daños genómicos a lo largo del tiempo. En las células senescentes se produce un cambio de la expresión génica acompañado de cambios en la heterocromatinización que pueden favorecer el desarrollo tumoral. RAC3 es un coactivador de receptores nucleares y de NF-κB, que interviene en el remodelado de la cromatina y contribuye al desarrollo tumoral.

Se quiso determinar si los niveles de expresión de RAC3 son regulados diferencialmente en células senescentes. Para esto se trabajó sobre un modelo de células normales WI38 y dos estímulos inductores de senescencia: H₂O₂ (daño genómico) o Rapamicina (citostático inhibidor de la vía mTOR). Se determinó arresto celular por tinción con cristal violeta a 3 días posttratamiento frente a estos estímulos. Se observó por microscopía de fluorescencia y tinción con Hoescht aumento en el tamaño nuclear: 10% de núcleos gigantes y células binucleadas a 6 días posttratamiento con Rapamicina. Se determinó por Western blot que el factor de transcripción anti-edad FOXO3A, que se inactiva por fosforilación, disminuyó 56% su fosforilación a las 24hs luego de la inducción con H₂O₂. Sin embargo, esta fosforilación aumentó 42%, junto con la disminución del 24% de los niveles de la deacetilasa anti-edad SIRT1, 24hs posttratamiento con Rapamicina. Observamos por Western blot que RAC3 sufre una disminución en sus niveles proteicos de 23% a las 24hs posteriores a dosis subletales de H₂O₂ y de 12%, 70% y 46% a las 24hs, 3 días y 6 días respectivamente, luego del estímulo con Rapamicina. Estos hallazgos sugieren la importancia de la disminución de la expresión de RAC3 en la entrada a la senescencia y su posible participación en los cambios de heterocromatinización, contrariamente a la sobreexpresión descrita en las células tumorales.

659 (580) EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA MEDIADA POR RIBOFLAVINA EN EPIDERMIS DE RATÓN. Juárez A.¹; Sosa L.²; Quintar A.³; Boetto N.⁴; Pittau R.⁵; Haggi E.⁶; Torres A.⁷; Pons P.⁸

Centro de Microscopía Electrónica Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3 4 5}; Unidad Académica Río Gallegos. Universidad Nacional de la Patagonia Austral.⁶; Centro de Microscopía Electrónica Facultad de Ciencias Médicas Universidad Nacional de Córdoba^{7 8} <virginiaajuarez@gmail.com>

Un gran número de patologías dérmicas superficiales cursan con hiperplasia epidérmica. La terapia fotodinámica (TFD) es un tratamiento que se basa en la muerte celular inducida por la activación lumínica de un fotosensibilizador (FS) localizado en determinadas células. La Riboflavina (RF) por su potencial redox podría utilizarse como FS de bajo costo en la aplicación de TFD. Nos propusimos evaluar la eficacia de la TFD mediada por RF (TFD-RF) en un modelo murino de hiperplasia epidérmica. La hiperplasia epidérmica se logró con 3 aplicaciones tópicas de Sodiolaurilsulfato (SLS) 170μM en el lomo de ratones BALB/c. Para mejorar la penetración del FS se acetiló la molécula de RF hidrosoluble (RFH) obteniendo un compuesto liposoluble (RFL). Para identificar las especies reactivas de oxígeno generadas por TFD-RF, células epiteliales dispersas fueron tratadas con los siguientes antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) o L-Histidina (LH), luego se cuantificó la viabilidad celular por azul de tripano. Los ratones con epidermis hiperplásica se dividieron en 5 grupos: I) SLS, II) SLS+RF, III) SLS+Luz; IV) SLS+RFH+Luz y V) SLS+RFL+Luz. El tratamiento se realizó con 1% de FS por 2hs. y se iluminó a $\epsilon 475\text{nm}/100\text{mW}/\text{cm}^2$ por 9min. A las 24hs. se determinó la proliferación celular con Ki67 por inmunocitoquímica y a los 7 días se midió el grosor de la epidermis en biopsias de piel. Se demostró que la TFD con RFH y RFL generó H₂O₂ y ¹O₂ en mayor proporción que O₂⁻. SLS resultó efectivo para desarrollar hiperplasia epidérmica. La TFD-RF disminuyó el grosor de la epidermis en animales tratados ($p < 0,05$ vs. controles). Además, se observó disminución de las células positivas para Ki67 en SLS+RF+Luz con respecto a los controles ($p < 0,05$). Estos resultados sugieren que RF resultó ser un adecuado FS y podría ser empleado en TFD de patologías dérmicas superficiales que cursan con hiperplasia.

660 (617) EL HEXACLOROBCENCENO ALTERA LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO EN CÉLULAS DE HÍGADO HUMANO TRANSFORMADAS (HEP-G2). Chiappini F.¹; Randi A.²; Giribaldi L.³; Kleiman De Pisarev D.⁴; Alvarez L.⁵

Lab. Efectos biológicos de contaminantes ambientales. Dpto de Bioquímica Humana. Fac. Medicina UBA^{1 2 3 4 5} <florenciachiapini@hotmail.com>

El hexaclorobenceno (HCB) es un tóxico ambiental, ampliamente distribuido en el medioambiente con efectos perjudiciales para la salud humana. En animales de experimentación induce alteraciones neurológicas, inmunológicas y endocrinas. Es un promotor tumoral en glándula mamaria, e hígado. Hemos demostrado que el HCB, en hígado de rata, produce activación de la vía de señalización del REGF, aumenta la actividad de la Ornitina Decarboxilasa (ODC) y la expresión de protooncogenes de respuesta temprana. Aumenta la proliferación celular y la apoptosis por un camino independiente a la vía mitocondrial, así como la expresión de TGF- β 1 (SAIC 2008). Esta citoquina está involucrada en los mecanismos de proliferación y apoptosis en células HEP-G2. Objetivos: Analizar parámetros regulatorios del crecimiento celular en una línea de células de hígado humano transformadas (HEP-G2) tratadas con HCB (5, 50 y 500 iM). Se evaluaron, por inmunoblot: a) la proliferación celular (PCNA), b) los niveles de c-myc, c) los niveles de caspasa 3 activa, d) los niveles de TGF β 1 (RT-PCR), e) los niveles de ERK1/2 y JNK fosforilados. Resultados: a) los niveles de PCNA aumentaron en la dosis máxima un 42%, $p < 0.01$; b) los niveles de c-myc aumentaron con la dosis máxima un 120 %, $p < 0.01$; c) los niveles de la Caspasa 3 activa aumentaron a todas las dosis, en 26%, 60% y 28 %, ($p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.05$), respectivamente; d) los niveles de RNAm de TGF- β 1 aumentaron en todas las dosis, 40%, 61% ($p < 0.05$) y 56 % $p < 0.01$, d) el contenido de JNK-P aumentó con la dosis de 5 μ M un 31 % y con 50 μ M un 37% $p < 0.05$, e) ERK-P aumentó con la dosis de 50 μ M un 51 % y con 500 μ M un 87%, $p < 0.01$. Conclusión: El HCB aumenta la proliferación celular pudiendo estar involucrado el protooncogen c-myc y la vía de señalización de ERK1/2. Las alteraciones en los niveles de Caspasa 3, sugieren un aumento en la apoptosis, pudiendo estar involucrada la JNK. El TGF- β 1 podría estar involucrado en ambos procesos.

661 (752) EFECTO DE LA ADICIÓN DE HIDROXIAPATITA MICRONIZADA SOBRE LA INDUCCIÓN OSTEOGÉNICA DE MATRICES POLIMÉRICAS. Fernandez J.¹; Molinuevo M.²; Cortizo M.³; Cortizo A.⁴

Fac. Cs. Exactas, UNLP¹; Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP²; INIFTA, CCT-La Plata, UNLP-CONICET³; Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP⁴ <jmfernandez33@yahoo.com.ar>

En la regeneración del tejido óseo se han empleado materiales sintéticos, solos o combinados con hidroxiapatita (HAP). Previamente, hemos demostrado que los polímeros poli- ϵ -caprolactona (PCL) y polifumarato de diisopropilo y la mezcla compatibilizada de ellos, permiten la diferenciación osteoblástica. En este trabajo evaluamos la inducción osteogénica de la mezcla compatibilizada combinada con hidroxiapatita micronizada al 1%. Con fines comparativos, incluimos la combinación de PCL-HAP y los polímeros (PCL y mezcla) sin HAP. La HAP, obtenida por calcinación de hueso bovino, fue molida y tamizada hasta un tamaño promedio de partícula de 74 μ m. Encontramos una distribución homogénea de la HAP y un incremento en la rugosidad superficial de los polímeros. El crecimiento celular (método de Bradford) fue mayor para los polímeros con HAP (mezcla:5.7 \pm 0.8; PCL:6.0 \pm 0.4 [μ g/mm²]) que para los polímeros sin HAP (mezcla:4.1 \pm 0.5; PCL:3.6 \pm 0.4 [μ g/mm²]). No se encontraron efectos tóxicos de las membranas por separado, de la mezcla o de sus combinaciones con HAP (método de naranja / IP). La diferenciación osteoblástica se evaluó a través de la actividad de fosfatasa alcalina (FAL), producción de colágeno tipo I, y expresión por inmuno-citoquímica de los marcadores osteoblásticos Runx-2 y osteocalcina. Luego de 48hs de cultivo, la producción de colágeno fue mayor para los polímeros conteniendo HAP (mezcla:23.2 \pm 1.8; PCL:6.6 \pm 0.2 [μ g/mm²]) que para los polímeros solos (mezcla:8.7 \pm 0.6; PCL:3.1 \pm 0.3 [μ g/mm²]). La actividad de FAL

fue mayor para los polímeros con HAP (mezcla:134 \pm 13; PCL:137 \pm 15 [nmol p-nitrofenol/min/mg proteína]) que para los polímeros solos (mezcla:107 \pm 8; PCL:101 \pm 8 [nmol p-nitrofenol/min/mg proteína]). Estos efectos parecen estar mediados por Runx-2 y osteocalcina, quienes aumentan su expresión en los polímeros con HAP. En conclusión, la adición de HAP mejora la biocompatibilidad osteoblástica y la inducción osteogénica, tanto de PCL como de la mezcla PCL-PFIP.

662 (803) CAMBIOS FUNCIONALES EN MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE DIFERENTES GRUPOS ETARIOS. Bruno M.¹; Santos N.²; Delfosse V.³; Orona N.⁴; Ferraro S.⁵; Amaral A.⁶; Tasat D.⁷

Escuela de Ciencia y Tecnología -UNSAM¹; Departamento de Energía Nuclear - Universidad Federal de Pernambuco, Recife, Brasil²; Escuela de Ciencia y Tecnología -UNSAM^{3 4 5}; Departamento de Energía Nuclear - Universidad Federal de Pernambuco, Recife, Brasil⁶; Escuela de Ciencia y Tecnología -UNSAM; Facultad de Odontología -UBA⁷ <marcosebruno@gmail.com>

La edad es uno de los factores de riesgo que determina un mayor grado de susceptibilidad y predisposición a contraer enfermedades. El envejecimiento del sistema inmune se manifiesta por un incremento en la susceptibilidad a infecciones con un aumento en la morbilidad y mortalidad. Si bien, varios estudios muestran que las funciones de las células del sistema inmune adaptativo se encuentran deprimidas con la edad, aun existen controversias a cerca de la función del sistema inmune innato. A tal fin caracterizamos, mediante ensayos *in vitro*, los macrófagos alveolares (MA) de dos grupos etarios (jóvenes y senescentes), mediante distintos parámetros biológicos. Evaluamos 1)el metabolismo celular colorimétricamente (ABS: 570nm) mediante el ensayo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 2)los niveles de las especies activas del oxígeno (EAO) analizando el porcentaje de células capaces de reducir el nitrobleu tetrazolium (NBT), 3)la presencia de la citoquina proinflamatoria (TNF α) en el sobrenadante del cultivo mediante ensayos de ELISA y 4)apoptosis mediante "laddering" e inmunocitoquímica empleando anticuerpos comerciales anticaspasas 3 y anti PARP, proteínas marcadoras de este proceso celular. Los MA del grupo senescente (S) manifestaron, respecto de los MA jóvenes (J), incremento en la actividad metabólica (S:1.93 \pm 0.06 vs. J:0.49 \pm 0.05, $p < 0.05$), en la generación de EAO (S:37.5 \pm 5.7 vs. J:17.5 \pm 1.9, $p < 0.05$) y en la liberación de TNF α (S:154.4 \pm 21.9 vs. J:61.8 \pm 12.9, $p < 0.05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la ocurrencia de apoptosis por ninguna de las dos técnicas empleadas. El aumento de EAO en el grupo S no fue asociado a daño del DNA. En conclusión, el incremento del metabolismo oxidativo y la secreción de TNF α , implicados en la respuesta inmune, podrían ser los factores responsables de la susceptibilidad diferencial de individuos senescentes frente a noxas como patógenos y/o contaminantes nocivos para la salud.

REPRODUCCION 6

663 (122) ANOMALÍAS DEPENDIENTES DEL GÉNERO EN LA LIPOPEROXIDACIÓN, FORMACIÓN DE NO Y EXPRESIÓN DE PPAR α EN EL CORAZÓN DE FETOS DE RATAS DIABÉTICAS. Kurtz M.¹; Martínez N.²; Capobianco E.³; White V.⁴; Jaberbaum A.⁵

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO) CONICET UBA^{1 2 3 4 5} <melisa_kurtz@yahoo.com.ar>

La diabetes materna afecta al feto en desarrollo e incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular en la vida adulta del neonato. El receptor activado por proliferadores peroxisomales α (PPAR α) se activa por ligandos endógenos como el leucotrieno B₄ (LTB₄), y regula parámetros vinculados con el metabolismo

lipídico y la homeostasis nitridérgica durante el desarrollo. El objeto de este estudio fue evaluar el efecto de la diabetes experimental sobre la lipoperoxidación, la producción de NO, la expresión de PPAR α y los niveles de LTB $_4$ en el corazón fetal a término de ratas controles (C) y diabéticas (D). La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina (90 mg/kg). Hembras C y D se aparearon con machos sanos. En el día 21 de gestación, se explantaron fetos de ratas C y D para evaluar en el corazón fetal la peroxidación lipídica (dosaje de TBARS), la producción de NO (dosaje de nitratos-nitritos), los niveles de LTB $_4$ (EIA) y la expresión de PPAR α (PCR). La peroxidación lipídica no mostró diferencias en el corazón fetal de hembras de ratas C y D, pero fue mayor en el corazón fetal de machos de ratas D (26%, $p < 0.05$) en relación al control. La producción de NO fue similar en el corazón fetal de hembras de ratas C y D, mientras que fue mayor en el corazón fetal de machos de ratas D (50%, $p < 0.05$) en relación al control. No se observaron diferencias en la producción fetal de LTB $_4$ al comparar los grupos diabético y control. La expresión de PPAR α fue similar en el corazón fetal de hembras de ratas D y C, y fue menor (28%, $p < 0.01$) en el corazón fetal de machos de ratas D en relación al control. Se concluye que el incremento en la lipoperoxidación y producción de NO en el corazón fetal es género dependiente, y podría vincularse con la menor expresión de PPAR α . Estas anomalías marcan alteraciones en el corazón fetal que podrían condicionar la función cardiovascular en la descendencia masculina en la diabetes materna.

664 (409) LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE IGF Y DE RECEPTORES DE INSULINA E IGF ESTÁN IMPLICADOS EN EL CRECIMIENTO DEL FETO DE RATA INDUCIDO POR IGF2. White V.¹; Higa R.²; Sosa M.³; Jawerbaum A.⁴

CEFYBO, Facultad de Medicina CONICET^{1 2 3 4}
<vernica73@yahoo.com.ar>

El crecimiento de la unidad feto-placentaria depende de factores de crecimiento como el IGF1 y el IGF2, que actúan a través de sus receptores (RIGF1 y RIGF2) y del receptor de Insulina (RI). Previamente observamos que la administración de IGF2 fetal induce un aumento en el crecimiento feto-placentario y en los niveles de IGF1 plasmático. El efecto de los IGFs se modula a través de IGFbps (BPs), proteínas que los transportan. Con el objeto de clarificar la modulación del crecimiento en placenta y órganos fetales, se estudió el efecto de la administración fetal de IGF2 sobre la expresión génica placentaria y fetal de IGF1, IGF2, sus receptores, BP1, BP2 y BP3. Métodos: Se operaron ratas en los días 19, 20 y 21 de preñez, y se inyectaron sus fetos con IGF2 (2 ng) o vehículo. El día 21 de preñez se removieron y pesaron fetos y placentas y se analizó por RT PCR la expresión de IGF1, IGF2, sus receptores, BP1, BP2 y BP3 en el tejido placentario, y en estómago, corazón e hígado fetal. Resultados: Se observó un incremento en la expresión de RIGF1 (200%, $p < 0.001$), BP1 (110%, $p < 0.01$) y BP2 (300%, $p < 0.05$) en las placentas de los fetos tratados con IGF2 con respecto a los controles. En el hígado de los fetos inyectados con IGF2 se observó un aumento de la expresión de IGF1 (110%, $p < 0.01$), RIGF1 (160%, $p < 0.05$) y RI (300%, $p < 0.01$). En corazón fetal se encontró que la administración de IGF2 induce un aumento de la expresión de IGF1 (110%, $p < 0.05$) y BP2 (200%, $p < 0.05$) y una disminución en la expresión de RIGF2 (25% $p < 0.05$). En el estómago de los fetos inyectados con IGF2 se observó un incremento en la expresión de IGF1 (100%, $p < 0.05$) y BP3 (200%, $p < 0.01$). Conclusiones: El IGF2 estimula la expresión de IGF1 en tejidos fetales, que elevaría los niveles plasmáticos de IGF1 previamente observados. Niveles elevados de IGF1 e IGF2 estimularían el crecimiento fetal y placentario, regulado de manera tejida específica por las BPs y por los receptores RIGF2, RIGF1 y RI.

665 (775) PERFIL HORMONAL DE LA HEMBRA GESTANTE DE LAGOSTOMUS MAXIMUS, UN ROEDOR CON REABSORCIÓN EMBRIONARIA SELECTIVA Y UN EVEN-

TO OVULATORIO DURANTE LA GESTACIÓN. Fraunhoffer N.¹; Jensen F.²; Willis M.³; Leopardo N.⁴; Inserra P.⁵; Vitullo A.⁶

CEBBAD-Universidad Maimónides^{1 2 3 4 5 6}
<fraunhoffer.nicolas@maimonides.edu>

Lagostomus maximus es un roedor perteneciente al suborden Histrionata con características particulares en su fisiología y anatomía reproductivas. Presenta la mayor tasa ovulatoria en mamíferos (400-800 oocitos/ciclo), reabsorción embrionaria selectiva durante la implantación temprana y un evento ovulatorio espontáneo en la mitad de la gestación, hecho altamente inusual dado que la progesterona inhibe el ciclo ovulatorio. Considerando esto se analizó el perfil hormonal de la hembra gestante, haciendo hincapié en los procesos antes mencionados. A un total de 78 animales capturados en una población natural durante el período de gestación (marzo-agosto) en los años 2006 a 2008, se les midió la concentración en suero de FSH, LH, Progesterona, $\Delta 4$ -Androstenodiona, Prolactina, Estradiol y Testosterona, mediante ELISA o EIA. En su conjunto los animales estudiados se distribuyeron a lo largo de todo el período gestacional. FSH presentó un pico menor (2mUI/ml) al inicio de la gestación, con un incremento gradual de la misma hacia mitad de la gestación, momento en el cual alcanza su máximo nivel (7mUI/ml). El estradiol mostró un aumento paulatino, presentando su máximo nivel al final de la gestación (60pg/ml). La progesterona aumentó de forma gradual durante la gestación con un pico de 40ng/ml hacia el final. $\Delta 4$ -Androstenodiona, presentó un comportamiento bimodal. LH, Prolactina y Testosterona se comportaron de forma constante. Estos resultados indican un posible rol de la Progesterona y el Estradiol como moduladores del proceso de reabsorción embrionaria selectiva. La FSH actúa como un posible factor estimulante del evento ovulatorio durante la gestación, indicando que la ovulación estaría ligada a la tasa de reclutamiento folicular, promoviendo la generación de cuerpos lúteos accesorios, que a su vez induce un aumento gradual de la progesterona al final de la gestación.

666 (6) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN DEL ESTRADIOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA PLACENTARIA. Gambino Y.¹; Sánchez Margalet V.²; Calvo J.³; Varone C.⁴

Dpto. Química Biológica FCEN UBA¹; Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla²; Dpto Química Biológica FCEN UBA; Instituto de Biología y Medicina Experimental³; Dpto. Química Biológica FCEN UBA⁴ <yesupao@yahoo.com.ar>

Diversos estudios sugieren que la leptina, hormona proteica de 16 KDa, tendría un rol importante en la fisiología feto-placentaria; sin embargo aún no se conoce cómo se regula su expresión en placenta. Resultados anteriores muestran que el estradiol regula positivamente la expresión de leptina en placenta, aumentando la actividad transcripcional de su promotor. El objetivo de este trabajo fue estudiar posibles mecanismos involucrados en la acción del estradiol sobre la expresión de leptina placentaria. Mediante ensayos de transfección transitoria, y empleando un plásmido reportero conteniendo la región promotora del gen de leptina, se observó que la sobreexpresión del receptor ER α incrementa 3 veces la actividad promotora estimulada por estradiol en la línea celular de coriocarcinoma BeWo ($p < 0.01$). Por western blot se evidenció que la incubación de estas células con un análogo impermeable del estradiol (E-BSA) incrementó la expresión endógena de leptina ($p < 0.05$), indicando que los efectos del estradiol podrían estar mediados por receptores clásicos y de membrana. Por otra parte, la acción de este esteroide también involucraría la activación de vías de señalización intracelular. La incubación de explantos placentarios con estradiol durante 10 min produjo un aumento de la fosforilación de ERK 1/2, mientras que la inhibición farmacológica de la vía MAPK bloqueó el efecto estimulador del estradiol y del E-BSA sobre la expresión endógena de leptina en células BeWo. Además, la expresión de isoformas

dominantes negativas de MAPK y MEK mediante ensayos de transfección transitoria, bloqueó en un 42% el efecto del estradiol sobre la actividad del promotor de leptina. Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión de leptina por estradiol sería un proceso multifactorial, que dependería del tipo y la concentración de receptores de estrógeno y de los niveles de expresión de proteínas transductoras de señales presentes en las células placentarias durante el embarazo.

- 667 (162) LA ANANDAMIDA (AEA) MODULA LOS NIVELES DE PROSTAGLANDINA E2 (PGE2) UTERINA DISMINUYENDO LOS NIVELES DE LA ENZIMA PGE SINTASA MICROSOMAL 1 (PGESM-1) Y AUMENTANDO LA ACTIVIDAD DE LA 15-HIDROXI-PROSTAGLANDIN-DESHIDROGENASA (15-PGDH).** Vercelli C.¹; Aisemberg J.²; Wolfson M.³; Franchi A.⁴

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET-UBA)^{1 2 3 4} <clauverce77@yahoo.com.ar>

La anandamida (AEA), uno de los principales endocannabinoides, participa en la fisiología reproductiva de las hembras: en bajas concentraciones favorece la implantación y estimula el desarrollo embrionario pero en altas concentraciones es tóxica para ambos procesos. Las prostaglandinas (PGs), especialmente la PGF_{2α}, aumentan la contractilidad del miometrio y por ello pueden inducir aborto y parto pretérmino. Durante la sepsis, la síntesis de PGs está marcadamente aumentada. En nuestro laboratorio hemos observado que la AEA media algunos de los efectos proinflamatorios del lipopolisacárido (LPS). Observamos también que este endocannabinoides modula los niveles de PGs aumentando los niveles de la ciclooxigenasa-2 (COX-2, enzima que sintetiza PGs) y de PGF_{2α} en el útero de hembras preñadas. Sin embargo disminuye los niveles de PGE₂. El objetivo de este trabajo fue estudiar en el útero de animales preñados si la AEA modula a) la expresión de las enzimas que sintetizan específicamente PGE₂ y b) la actividad de la primera enzima que cataboliza las PGs, la 15-hidroxi-prostaglandin-deshidrogenasa (15-PGDH). Para ello, ratonas en el 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, análogo estable de la AEA, y se determinaron los niveles de ARNm de las 3 enzimas que sintetizan PGE₂ por PCR. Observamos que la AEA disminuyó los niveles de ARNm de la PGE₂ sintasa microsomal 1 (PGESm-1, p<0,05). La AEA no modificó los niveles de la 15-PGDH (PCR y Western blot), pero sí aumentó la producción del metabolito de la PGE₂ (p<0,01), indicando una mayor metabolización de esta PG. Estos resultados sugieren que la AEA modula los niveles de PGE₂ disminuyendo la PGESm-1, una de las enzimas que la sintetiza y aumentando la actividad de la 15-PGDH lo que determina una menor concentración de PGE₂ en el medio.

- 668 (744) EL OXIDO NITRICO ESTA INVOLUCRADO EN EL PARTO PREMATURO EN RATAS TRATADAS CON TOXINA SHIGA TIPO 2.** Burdet J.¹; Zotta E.²; Franchi A.³; Ibarra C.⁴

Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA^{1 2}; CEFYO-CONICET, Facultad de Medicina, UBA³; Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA⁴ <julianaburdet@yahoo.com.ar>

Infecciones asociadas con *Escherichia coli* enterohemorrágica productora de toxina Shiga (STEC) podría ser una de las causas de morbimortalidad fetal en mujeres embarazadas. El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) que produce necrosis y apoptosis en los órganos blanco. Previamente observamos que ratas en estadio tardío de preñez inyectadas i.p. con sobrenadante de cultivo de *E. coli* que expresa Stx2 y contiene LPS (sStx2) induce parto prematuro de fetos muertos.

Teniendo en cuenta que Stx2 es capaz de inducir la producción de óxido nítrico (ON) y que el LPS provoca parto prematuro en ratones vía aumento de ON, decidimos evaluar la participación del NO en el desencadenamiento del parto prematuro observado en ratas tratadas con sStx2. Para ello se usó aminoguanidina (AG), un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). La inyección de AG (100 mg/Kg de peso) 24 hs antes del tratamiento con sStx2 (2 ng Stx2 y 0,15 ng LPS /g peso rata) produjo una reducción de la necrosis placentaria provocada por Stx2 a las 48 hs post-inyección. En cambio, AG inyectada al mismo tiempo que sStx2 o 12 hs antes no produjo una reducción de los efectos de Stx2 sobre la unidad feto-placentaria. Ninguno de los tratamientos con AG impidió el parto prematuro. Ensayos de Western blot mostraron una mayor expresión de iNOS en las placentas de ratas tratadas con sStx2 que en aquellas previamente tratadas 24 h con AG. Nuestros resultados sugieren que el ON podría estar involucrado en el desarrollo del parto prematuro de fetos muertos provocado por sStx2 en ratas en estadio tardío de preñez.

- 669 (192) LA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA A XENOESTRÓGENOS INDUCE ALTERACIONES TRANSITORIAS EN EL MIOMETRIO DE LA RATA.** Milesi M.¹; Varayoud J.²; Bosquiaz V.³; Muñoz-de-toro M.⁴; Luque E.⁵

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral^{1 2 3 4 5} <mmilesi@fcb.unl.edu.ar>

La diferenciación organogenética del útero es un proceso altamente sensible a los efectos de xenoestrógenos, entre los que se encuentran el Diethylstilbestrol (DES), potente estrógeno sintético, y el Endosulfán, pesticida de uso masivo en nuestro país. Nos propusimos determinar el patrón de expresión normal de moléculas claves en la morfogénesis uterina [ie: alfa-Actina de Músculo Liso (α -AML), Receptor de Estrógeno alfa (ER α) y Hoxa-10] desde el nacimiento y hasta el día posnatal (DPN) 35. Además, estudiamos el efecto de la exposición neonatal a DES y Endosulfán sobre la expresión de las moléculas mencionadas. Ratas hembras Wistar fueron inyectadas (vía sc) desde el DPN1 hasta el DPN7 con vehículo (Control), DES 0,2 mcg/kg/día, Endosulfán 6 mcg/kg/día (Endo6) y 600 mcg/kg/día (Endo600), y sacrificadas los días 8 y 21. Otro grupo de hembras no tratadas fue sacrificado los días 1, 8, 21 y 35 postnatales. Los úteros fueron incluidos en parafina y utilizados para determinar por inmunohistoquímica la expresión de ER α , Hoxa-10 y α -AML. Con el avance del desarrollo uterino se observó una menor expresión de Hoxa-10 en el estroma subepitelial y en el miometrio, un incremento en la expresión de α -AML en el miometrio y de ER α en todos los compartimentos del útero. En los animales expuestos a xenoestrógenos, los cambios más significativos en la expresión de los marcadores se verificaron a nivel del miometrio. En este compartimento, el grupo Endo600 mostró un aumento en la expresión de Hoxa-10 (p<0,05), ER α y α -AML (p<0,01), mientras que los animales tratados con DES presentaron cambios opuestos para los dos primeros marcadores (p<0,01) en el DPN8. Estas alteraciones fueron transitorias dado que se revirtieron en el DPN21. Los resultados demuestran que la exposición a DES y Endosulfán en períodos críticos del desarrollo uterino, induce alteraciones transitorias a nivel del miometrio, que podrían afectar el normal funcionamiento del órgano durante la preñez y el parto.

- 670 (101) REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN DE LEPTINA POR HCG Y CAMP EN PLACENTAS NORMALES Y PATOLÓGICAS.** Maymó J.¹; Pérez Pérez A.²; Sánchez Margalet V.³; Calvo J.⁴; Bernardo Maskin; Varone C.⁵

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina¹; Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España²; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,

Buenos Aires, Argentina; Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina.⁴; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina⁵ <jmaymo@qb.fcen.uba.ar>

La leptina (LEP) es una hormona de 16kDa descubierta originalmente en tejido adiposo con la función de regular el balance energético del organismo. Sin embargo, la leptina también es expresada en placenta humana, donde es propuesta como una molécula clave en la interacción materno-fetal y en la actividad placentaria. Si bien sus efectos están relacionados con el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación, aún se desconoce el rol de la leptina en la regulación de la implantación y el crecimiento embrionario. Hemos demostrado que la hCG y el cAMP inducen la expresión de leptina en células trofoblásticas, así como en explantos de placentas humanas a término. En diversas patologías reproductivas, los niveles de expresión de leptina cambian dramáticamente, aunque poco se ha descrito sobre sus mecanismos de acción y su regulación. En el presente trabajo, nos hemos planteado investigar la expresión así como la regulación diferencial de leptina por hCG y AMPc en placentas normales respecto a las patológicas (diabetes, IUGR, preeclampsia). Utilizamos como modelo las líneas celulares trofoblásticas BeWo y JEG-3, y explantos de placenta humana a término. Determinamos por Western blot y PCR en tiempo real, que la leptina se encuentra incrementada en las placentas patológicas respecto a las normales. Asimismo, determinamos la expresión de leptina en explantos de placentas patológicas tratados con hCG (0-100 IU/ml) y AMPc (0-1mM). Observamos que en dichas patologías se pierde la regulación de leptina por hCG y AMPc, siendo los niveles de la hormona significativamente menores que los de placenta normales tratadas. Se observó también la estimulación de la fosforilación de ERK 1/2 por hCG en las placentas patológicas, al igual que en las normales. Los resultados obtenidos refuerzan la idea de la importancia de la leptina en el embarazo y mejoran la comprensión de los mecanismos regulatorios de su expresión en trofoblastos humanos.

- 671 (555) EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA INSULINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE AQP3 EN PLACENTA HUMANA.** Castro Parodi M.¹; Dietrich V.²; Reza A.³; Jaime M.⁴; Maskin B.⁵; Farina M.⁶; Damiano A.⁷

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular y Molecular, Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3}; Hospital Nacional "Doctor Profesor Alejandro Posadas"^{4 5}; CEFyBO - CONICET⁶; Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular y Molecular, Depto. de Ciencias Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires⁷. Hospital Profesor Alejandro Posadas, Buenos Aires, Argentina <mcastroparodi@gmail.com>

La preeclampsia (PE) es un síndrome único de la gestación humana, de etiología desconocida. El desarrollo de la placenta preecláptica sucede en un ambiente relativamente hipóxico y se ha encontrado en pacientes que desarrollan este síndrome hiperinsulinemia. Tanto la hipoxia como la insulina podrían afectar los sistemas de transporte. Previamente postulamos que la insulina y la hipoxia tienen un efecto sobre la expresión de acuaporina 9 en placentas normales. También reportamos que la acuaporina 3 (AQP3) esta disminuida en placentas preeclápticas. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la insulina y de la hipoxia sobre la expresión y localización de AQP3 en placentas humanas. Para ello explantos de placenta normal se cultivaron con diferentes concentraciones de insulina durante 24 hs y en condiciones de normoxia, hipoxia e hipoxia/normoxia (H/R). Por ensayos de Western blot no se observaron cambios significativos de la expresión de AQP3 en los explantos cultivados con diferentes dosis de insulina, ni en los cultivados en hipoxia mientras que en H/R se observó una disminución en la expresión de AQP3 de 1.3

veces con respecto al control (n=6 p<0.05). La inmunolocalización solo mostró cambios en explantos cultivados en hipoxia donde la AQP3 se ubica preferentemente en citoplasma y en H/R, al igual que lo que sucede en PE, AQP3 se relocaliza en membrana apical pero su expresión baja. Estos resultados sugieren que los periodos de hipoxia intermitente que suceden en la PE y no la hiperinsulinemia serian los responsables de la expresión diferencial de esta AQP3.

- 672 (764) DIÁLOGO MATERNO-FETAL: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS Y DE LA EXPRESIÓN DE IGFBP-1 DURANTE EL PROCESO DE IMPLANTACIÓN.** Cerchi G.¹; Vaccarezza A.²; Cameo P.³

CEBBAD, Universidad Maimónides^{1 2 3} <cerchi.georgina@maimonides.edu>

La reproducción humana a pesar de ser esencial para la supervivencia de la especie, es un proceso poco eficiente. El porcentaje de fecundidad máxima es 30% por ciclo menstrual y el 75% de las pérdidas de embarazo es debido a fallas en el proceso de implantación. El entendimiento de este proceso permitirá tener nuevas estrategias para posibles futuras terapias para patologías reproductivas. En este trabajo se propone la utilización de un modelo *in vitro* de co-cultivo de fibroblastos uterinos humanos (células HuF) con explantos de trofoblasto para estudiar la interacción materno-fetal. Los objetivos de este trabajo fueron analizar la actividad de las metaloproteasas (MMPs), por ser principales responsables en el remodelado de la matriz extracelular durante la implantación; y verificar la decidualización de las células HuF en presencia del trofoblasto, investigando la expresión de IGFBP-1, marcador de la decidualización. En este modelo se utilizaron células HuF y trofoblasto obtenidos de placentas de embarazos a término normales. La actividad de MMP-2 y MMP-9 se analizó por zymografía en las distintas condiciones de cultivo, a distintos tiempos: 4, 8, 12, 16 y 20 días. Para estudiar la expresión de IGFBP-1 a nivel proteico se realizó, además, el co-cultivo en presencia de distintos estímulos externos (E₂, P, AMPc). Observamos que la actividad de la MMP-9 es inhibida (p<0,005) en condiciones de co-cultivo. Comparando con los cultivos de células HuF o trofoblasto aislados la pro-MMP-2 y la MMP-2 se observan estimuladas (p<0,005). En la condición de co-cultivo sin estímulos externos la expresión de IGFBP-1 no fue detectada, no así en la condición de co-cultivo tratado con los 3 estímulos, donde la expresión de IGFBP-1 se detectó a partir de los 5 días. El modelo planteado en este trabajo es una buena herramienta para continuar estudiando la interacción entre el trofoblasto y el endometrio materno durante la implantación, principalmente en el proceso de invasión.

- 673 (625) CAMBIOS EN EL NIVEL DE ACIDO URICO EN MUJERES EMBARAZADAS ENTRE LAS SEMANAS 20 Y 30 DE GESTACION COMO MARCADOR DE RIESGO DE DESARROLLO DE PREECLAMPSIA.** Corominas A.¹; Balconi S.²; Castro-parodi M.³; Szpilbarg N.⁴; Maskin B.⁵; Damiano A.⁶

Hospital Nacional Prof Dr Alejandro Posadas^{1 2}; Laboratorio De Biología De La Reproducción, Cátedra De Biología Celular y Molecular, Facultad De Farmacia Y Bioquímica, UBA^{3 4}; Hospital Nacional Prof Dr Alejandro Posadas⁵; Laboratorio De Biología De La Reproducción, Cátedra De Biología Celular y Molecular, Facultad De Farmacia Y Bioquímica, UBA⁶ <alicia_damiano@hotmail.com>

La preeclampsia es un desorden hipertensivo específico del embarazo humano. Hasta el presente, la predicción de mujeres en riesgo de desarrollar preeclampsia continúa siendo problemática. Nuestro objetivo fue evaluar los niveles séricos de ácido úrico en embarazos preeclápticos antes y después del inicio de manifestaciones clínicas comparando con embarazos sin complicaciones, con el fin de hallar un marcador de riesgo de este síndrome.

me. Se realizó un análisis retrospectivo caso-control de las historias clínicas de gestantes preeclámpticas (n=30) y gestantes normales (n=29), evaluando sus perfiles demográficos y bioquímicos. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de urea [0,19 ±0,11 dg/mL vs 0,23±0,08 dg/mL] y creatinina [0,55±0,14 dg/mL vs 0,56±0,15 dg/mL] entre los dos grupos. Las proteínas en orina también fueron negativas en ambos grupos. Antes de la semana 20 de gestación, los niveles de ácido úrico entre los dos grupos fueron similares [2,94±0,71 dg/mL vs 2,98±0,36 dg/mL]. Sin embargo, a partir de la semana 20, en el grupo de preeclámpticas se observó un aumento significativo [2,97±0,63 dg/mL vs 4,58±1,34 dg/mL](p<0,05), aunque dentro del rango normal. Estos resultados sugieren que un aumento en los niveles de ácido úrico, documentados por dos dosajes secuenciales entre las semanas 20 y 30 de gestación sería útil para definir un grupo de riesgo que requiera controles más frecuentes para detectar los cambios clínicos involucrados en el desarrollo de la preeclampsia.

674 (109) LA LEPTINA AUMENTA LA PROLIFERACIÓN Y LA SUPERVIVENCIA EN CÉLULAS PLACENTARIAS. Ibarbalz F.¹; Maymó J.²; Gambino Y.³; Calvo J.⁴; Maskin B.⁵; Varone C.⁶

Departamento Química Biológica FCEN - UBA^{1 2 3}; Departamento Química Biológica FCEN - UBA; Instituto de Biología y Medicina Experimental⁴; Hospital Alejandro Posadas - Buenos Aires⁵; Departamento Química Biológica FCEN - UBA⁶ <fedebalbarz@gmail.com>

El diálogo materno-fetal durante la implantación embrionaria involucra numerosos reguladores, entre ellos la leptina. Esta hormona proteica de 16KDa, tiene efectos sobre el crecimiento y la angiogénesis placentaria. Resultados de nuestro grupo demostraron que la leptina incrementa la proliferación celular y supervivencia en células trofoblásticas JEG-3 y BeWo. También hemos determinado que la expresión de leptina es regulada por distintos efectores placentarios. El objetivo planteado para este trabajo es estudiar la participación de leptina en el mecanismo de proliferación celular y apoptosis placentaria. Se utilizaron como modelo las líneas celulares trofoblásticas BeWo, JEG-3 y Swan, y explantos de placentas humanas a término. Se determinó la proliferación celular por conteo de células e incorporación de ³H-timidina. El tratamiento con leptina de células Swan produjo un aumento en la proliferación celular con un máximo de 3 veces a una concentración de 100 ng/ml a los 2 días de incubación. Se estudió la activación de caspasa 3 por Western Blot, observándose una disminución del fragmento proteolizado dependiente de la dosis de leptina. Por otro lado, la disminución de leptina endógena por tratamiento con un oligonucleótido antisentido (2 µM y 4 µM) para leptina produjo un aumento de la apoptosis celular medida por la activación de caspasa 3. Estos resultados atribuirían a la leptina el rol de hormona placentaria estimulante del crecimiento y supervivencia celular placentaria.

675 (779) EFECTO DE FACTORES SOLUBLES ENDOMETRIALES SOBRE LA CAPACIDAD INVASIVA DEL TROFOBLASTO. Vaccarezza A.¹; Cerchi G.²; Cameo P.³

CEBBAD, Universidad Maimonides^{1 2 3} <vaccarezza.agustina@maimonides.edu>

El éxito de la preñez depende, al menos en parte, de la correcta implantación y formación de la interface materno-fetal, la cual coordina y controla el crecimiento y nutrición del embrión. El endometrio sintetiza y secreta un gran número de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas fundamentales para una implantación exitosa. El estudio de la implantación embrionaria supondría un gran avance en los tratamientos de esterilidad e infertilidad. En este trabajo se estudió la capacidad regulatoria del endometrio sobre la invasión trofoblástica mediante un modelo de co-cultivo *in vitro* humano. Utilizando una línea celular de coriocarcinoma (células BeWo) y fibroblastos uterinos humanos (células HuF) purificados a partir de placentas a término, se es-

tuó el efecto de factores solubles secretados por el endometrio (células HuF) sobre la capacidad invasiva del trofoblasto (células BeWo). En este modelo de co-cultivo se analizó a distintos tiempos, 24 y 48 horas, la actividad de la MMP-2 y MMP-9 trofoblásticas, principales responsables de la invasión embrionaria. Se observó un aumento significativo (p<0,05) en la actividad de la MMP-2 tanto a las 24 como a las 48 horas. Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la actividad de la proMMP-2 en los tiempos analizados. La baja actividad de la MMP-9 observada en estas condiciones no permitió su análisis por densitometría de geles. Podemos concluir que la actividad de la MMP-2 sintetizada por las células BeWo se ve modificada por factores solubles secretados por el endometrio. Estos resultados confirman la existencia de un diálogo materno-fetal bidireccional, de tal forma que no sólo el trofoblasto ejerce un efecto parácrino sobre el endometrio, sino que también éste último es capaz de regular diversos procesos llevados a cabo por el trofoblasto, específicamente la invasión embrionaria del útero materno. Financiamiento: Universidad Maimonides. PICT2006-1523.

676 (650) ESTUDIO IN VITRO DEL DESBALANCE REDOX PRODUCIDO POR H₂O₂ EN MITOCONDRIAS DE PLACENTA HUMANA. Papa Gobbi R.¹; Sabino G.²; Magnarelli G.³; Rovedatti M.⁴

LIBIQUIMA¹; Facultad de Ingeniería-U.N.Comahue²; LIBIQUIMA^{3 4} <puyen@live.com.ar>

La placenta presenta dos tipos de mitocondria, la liviana (ML), propia del sincitotrofoblasto, y la pesada (MP), propia del citotrofoblasto. Dicha organela, es una fuente y, a la vez, uno de los blancos principales del daño oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno (ROS), generadas por mecanismos endógenos y exógenos. Considerando la función clave de la mitocondria en la homeostasis placentaria, el objetivo del presente trabajo fue comparar la actividad basal de la defensa antioxidante enzimática y las consecuencias del desbalance redox en ML y MP. A partir de vellosidades de placenta a término (n=9) se aislaron ML y MP por centrifugación diferencial. Se incubaron 60 min. con 1, 5, y 10 mM de H₂O₂, compuesto ampliamente utilizado para simular la acumulación intracelular de ROS. Se determinó la actividad de la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (Gpx), y los niveles de oxidación lipídica y proteica. La actividad basal de Gpx fue significativamente mayor en MP (p<0,01), mientras que la actividad de CAT fue similar. En ninguno de los parámetros analizados se encontraron diferencias en el efecto del H₂O₂ entre ambos tipos de mitocondria. Se observó una disminución significativa (p<0,001) y dependiente de la dosis de H₂O₂ en la actividad de CAT, mientras que la actividad de GPX no se afectó. Asimismo, se observó un aumento dosis dependiente de los niveles de peroxidación lipídica (p<0,001) y carbonilación de proteínas (p<0,001). Estos resultados indican que, a pesar de la diferencia en los niveles basales de Gpx, ambos tipos de mitocondria presentaron sensibilidad semejante al estrés oxidativo. Sugieren además que, desbalances en el estado redox, tales como los ocasionados por exposición a tóxicos ambientales o situaciones patológicas del embarazo, podrían comprometer la funcionalidad de ML y MP, afectando la producción de ATP y la síntesis de progesterona.

677 (720) PARÁMETROS DE ESTRÉS Y ANSIEDAD EN MADRES DE PREMATUROS DE ALTO RIESGO Y RELACIÓN CON VARIABLES HORMONALES. Torrecilla M.¹; Giudice M.²; Llanos A.³; Hapon M.⁴; Gonzalez Jatuff A.⁵; Jahn G.⁶; Rodríguez Echandia E.⁷

Lab. de Reproducción y Lactancia-IMBECU CONICET^{1 2}; Servicio de Psicología y Psiconeuroinmunología, Hospital Luis Lagomaggiore, Mendoza.³; Lab. de Reproducción y Lactancia-IMBECU CONICET⁴; Lab. de Farmacología y Evolución del Comportamiento -IMBECU CONICET⁵; Lab. de Reproducción y Lactancia-IMBECU CONICET⁶; Lab. de Farmacología y Evolución del Comportamiento -IMBECU CONICET⁷ <mtorrecilla@lab.cricyt.edu.ar>

Introducción: La hospitalización del prematuro y procedimientos de las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) pueden provocar estrés en los padres y si no se maneja bien, estados de ansiedad y depresión. Las disfunciones tiroideas tienen consecuencias nocivas sobre la fertilidad, embarazo, postparto y lactancia, y también se relacionan con estados emocionales alterados. Precisar el origen de estas alteraciones, si se correlacionan o no con disfunciones tiroideas y poder establecer pautas de terapéutica precoz redundarán en beneficios para madre e hijo. **Objetivo:** Evaluar el estado psicológico y hormonal de madres de prematuros de alto riesgo. **Diseño:** Metodología mixta, diseño longitudinal. **Estudio descriptivo y correlacional.** **Muestra:** Madres de prematuros de alto riesgo, internados en el Hospital Luis Lagomaggiore de Mendoza. **Resultados:** Niveles de estrés materno elevados estuvieron positivamente asociados al ambiente de la UCIN ($p < 0.05$) y al aspecto y comportamiento del neonato ($p < 0.01$). La sintomatología de depresión y ansiedad se correlacionó positivamente ($p < 0.01$) con la internación del hijo. Los antecedentes socioculturales no modificaron los niveles de estrés psicofisiológicos. El 20% presentó hipotiroidismo subclínico ($T_4 < 4,5 \mu\text{g/dl}$), 8% hipotiroidismo franco ($T_3 < 86 \text{ ng/dl}$) y 4% hipertiroidismo ($T_3 >> 131 \text{ ng/dl}$), incidencia más alta ($p < 0.005$) que en la población. El 100% de hipotiroides (subclínicas y francas) tenían antecedentes de aborto espontáneo y sintomatología depresiva durante la internación del bebé. Las hipertiroides presentaron niveles elevados de ansiedad ($p < 0.04$). El asesoramiento a las madres, sobre cómo colaborar con el equipo de salud, mejoró el vínculo temprano y lactancia. **Conclusión:** El estado tiroideo anormal influye directamente sobre la incidencia de prematuridad y desarrollo de estados afectivos alterados durante el postparto, complicando el estado anímico de las madres y el establecimiento del vínculo.

INMUNOLOGIA 13

678 (378) EFECTO DEL ÁCIDO ÚRICO Y LA HMGB1 (HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 PROTEIN) EN LA RESPUESTA AUTOINMUNE INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV-A59). Duhalde Vega M.¹; Retegui L.²

IQUIFIB (UBA-CONICET)-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA^{1 2} <maiduve@gmail.com>

Los ratones infectados con el MHV-A59 expresan autoanticuerpos (autoAb) contra la fumarilacetoacetatohidrolasa (FAH). Los autoAb reconocen varias secuencias de la enzima, las cuales coinciden, casi en su totalidad, con la zona reconocida por los Ab presentes en ratones inmunizados con la FAH. Esto nos llevó a proponer la posible participación de los adyuvantes endógenos - moléculas liberadas por las células que mueren por necrosis-. Resultados previos sugerían la participación de dos adyuvantes, el ácido úrico (AU) y la HMGB1, en esta respuesta autoinmune. **Objetivo:** Analizar la correlación entre los niveles de estas moléculas y la presencia de autoAb. Ratones BALB/c infectados con MHV-A59 (5×10^4 TCID 50) fueron sometidos a distintos tratamientos. Para estudiar el efecto del AU se administró diariamente alopurinol (40mg/kg) durante 30 días. La participación de la HMGB1 se analizó mediante la inoculación, tres veces por semana, con etilpiruvato (EP) (4mg/kg). En ambos casos se realizaron los controles correspondientes y los animales fueron sangrados a distintos tiempos para determinar la presencia de autoAb contra la FAH por Western blot y los niveles séricos de los adyuvantes en estudio. También se analizó la variación de proteínas involucradas en la acción de estas drogas: TNF- α , P38 y NF- κ B. Observamos que la concentración sérica de AU aumentaban en los animales infectados ($29.02 \text{ mg/l} \pm 2.95$), respecto a los animales controles ($2.11 \text{ mg/l} \pm 0.59$) y que tras el tratamiento disminuía significativamente ($8.17 \text{ mg/l} \pm 3$). Además, los niveles séricos de HMGB1 también son elevados en los animales infectados y luego del tratamiento con EP disminuyen en un 80%. Ambos tratamientos anularon los autoAb anti-FAH, por lo que existiría una correlación directa entre la concentración sérica de AU y de HMGB1 y la presencia de Ab anti-FAH, indican-

do que al menos esos dos adyuvantes son necesarios para la inducción de esta respuesta autoinmune.

679 (2) ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE LOS AUTOANTICUERPOS ANTI-RO/SS-A EN PACIENTES CON ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS. Paz M.¹; Ferrari A.²; Gonzalez Maglio D.³; Leoni J.⁴

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA^{1 2 3 4} <mlpaz@ffyub.uba.ar>

Introducción: La fotosensibilidad cutánea (FC) se presenta en pacientes con Lupus y se postula un rol patogénico de los anticuerpos anti-Ro/SS-A 52 y 60 kDa, reconociendo al antígeno relocalizado en la membrana de queratinocitos apoptóticos. Sin embargo, existen pacientes con estos anticuerpos que no presentan la manifestación de FC, como ocurre en el Síndrome de Sjögren o en la Artritis Reumatoidea. **Objetivos:** Purificar autoanticuerpos anti-Ro/SS-A 52 y 60 provenientes de pacientes con distintas patologías. Estudiar y comparar el reconocimiento in vitro de queratinocitos en apoptosis (inducida por luz UVB) por parte de los sueros y los anticuerpos purificados. **Pacientes:** A partir de un estudio previo que incluyó 200 pacientes con distintas patologías, procedentes del Servicio de Reumatología del Hospital de Clínicas (a cargo del Dr. Naswetter), 10 de ellos fueron seleccionados para este trabajo. **Métodos:** Se purificaron los anticuerpos específicos utilizando las proteínas Ro/SS-A recombinantes purificadas y unidas a Sepharosa-BrCN. La inmunoreactividad de los anticuerpos purificados fue evaluada por ELISA. El reconocimiento de queratinocitos humanos se realizó por citometría de flujo sobre células irradiadas y sin irradiar, utilizando tanto los sueros de los pacientes como los anticuerpos purificados. **Controles:** suero humano normal (SHN) e IgG humana normal pura. **Resultados:** Todos los anticuerpos purificados presentan inmunoreactividad positiva por ELISA. Todos los sueros reconocen a los queratinocitos apoptóticos (valores de positividad desde 32.4% a 11.2%, SHN: 8.6%). Los anticuerpos purificados no reconocen a dichas células (valores de positividad desde 3.0% a 0.03%, IgGh: 3.9%). **Conclusiones:** El reconocimiento de los queratinocitos apoptóticos por parte de los sueros es independiente de la patología de base y no guarda relación con la FC. Los autoanticuerpos anti-Ro/SS-A 52 y 60 no se encuentran directamente relacionados con el fenómeno de FC.

680 (347) EFECTO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS MURINA (MHV-A59) Y DE UN ADYUVANTE EXÓGENO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE EN RATONES DE LA CEPA C57BL/6. Aparicio J.¹; Peña C.²; Retegui L.³

IQUIFIB (UBA-CONICET)-Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA^{1 2 3} <joluisaparicio@yahoo.com.ar>

Hemos demostrado que en ratones BALB/c el MHV-A59 provoca hepatitis, hipergamaglobulinemia y autoanticuerpos (autoAb) dirigidos exclusivamente contra la fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) hepática. El propósito de este trabajo fue estudiar la acción del virus en la cepa C57BL/6 que, según la literatura, puede desarrollar hepatitis autoinmune en ciertas condiciones experimentales. Los ratones fueron infectados con el virus (1×10^4 TCID 50) y sangrados a los 15, 30 y 45 días. La determinación de IgG totales, realizada por ELISA, indicó niveles elevados a los 15 y 30 días post-infección ($P < 0,05$). Los autoAb contra proteínas hepáticas, determinados por Western blot, reconocieron la FAH pero, además, otras proteínas de diversos pesos moleculares. Se detectó un aumento de las transaminasas a los 15 y 30 días post-infección, así como edema y/o necrosis de los hepatocitos, e infiltración linfocitaria. Por otro lado, se estudió el efecto de un adyuvante exógeno sintético denominado PADRE (por *Pan HLA DR-binding Epitope*) que estimula las células T colaboradoras. Los animales fueron inmunizados con el péptido y 24 horas después inoculados con el MHV. Se obtuvieron muestras de sangre a los 15, 30 y 45 días post-infección. Se observó que la administración de PADRE provocó la prolongación de la hipergamaglobulinemia producida por el virus y un aumento generalizado de la reactividad de los autoAb. No se detectó un incremento

del daño hepático en estas condiciones, aunque se determinó que la sola inoculación de PADRE aumentaba significativamente la concentración sérica de ácido úrico con respecto a los valores normales ($17,3 \pm 0,9$ mg/l y $10,5 \pm 0,3$ mg/l, $p < 0,005$). Los resultados obtenidos indican que la infección de los ratones C57BL/6 respondieron de manera diferente a la de los animales BALB/c, originando una patología similar a la hepatitis autoinmune, y que la inoculación de PADRE exacerbó dichos síntomas.

681 (80) ANÁLISIS DE VARIABLES POLIMÓRFICAS EN EL GEN CD24 SOBRE EL RIESGO DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE. González S.¹; Rojas J.²; Redal M.³; Patrucco L.⁴; Correale J.⁵; Cristiano E.⁶; Argibay P.⁷

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires¹; Servicio de Neurología del Hospital Italiano de Buenos Aires²; Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires³; Servicio de Neurología del Hospital Italiano de Buenos Aires⁴; Área de Neuroinmunología-FLENI⁵; Servicio de Neurología del Hospital Italiano de Buenos Aires⁶; Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires⁷ <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 sugieren que polimorfismos del gen CD24 conferirían protección contra EM. Objetivos: Investigar la asociación entre los polimorfismos P1056 (A/G), P1527 (TG/del), P1626 (A/G) del gen CD24 y EM, comparando las frecuencias alélicas y genotípicas en un grupo de pacientes versus controles. Materiales y métodos: Se estudiaron 70 pacientes con diagnóstico de EM (McDonald) y 70 individuos sanos no relacionados como grupo control, ambos grupos mayores de 18 años y de ambos sexos. Se extrajo el ADN a partir de sangre periférica, se amplificaron las regiones polimórficas por PCR anidada con cebadores específicos. La genotipificación se realizó a partir de los fragmentos obtenidos mediante la utilización de enzimas de restricción. Los datos se analizaron mediante test exacto de Fisher (significativa $p < 0,005$). Resultados: El polimorfismo P1056 (A/G) estuvo presente en el 54% de los casos vs. el 47.4% de los controles ($p = 0,62$). El polimorfismo P1527 (TG/del) estuvo presente en 9.5% de los casos vs. el 12.5% de los controles ($p = 0,35$). Respecto al polimorfismo P1626 (A/G) la frecuencia en los casos fue de 15.7% vs. 17.1% en los controles ($p = 0,81$). Conclusiones: Los resultados de este trabajo difieren de los publicados para poblaciones caucásicas de EEUU, ya que no se encontraron diferencias al comparar casos versus controles. Estos resultados podrían deberse a la diferencia en la composición genética de nuestra población.

682 (390) NIVELES SECUENCIALES DE CÉLULAS T CD4+FOXP3+ Y PREVALENCIA DE AUTOANTICUERPOS EN NIÑOS INFECTADOS POR EL VIH. Balbaryski Kessler J.¹; Argüello R.²; Barboni G.³; Candi M.⁴; Quiroz H.⁵; Laucella S.⁶; Gaddi E.⁷

Hospital Gral de Niños Dr.P de Elizalde. Bs. As. Argentina¹; Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén. Bs. As, Argentina. ; Hospital Gral de Niños Dr.P de Elizalde. Bs. As. Argentina^{3 4 5}; Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén. Bs As, Argentina.⁶; Hospital Gral de Niños Dr.P de Elizalde. Bs. As. Argentina⁷ <jeanettebal@yahoo.com.ar>

En pacientes VIH(+), a consecuencia de la activación policlonal del linfocito B, se observa una mayor prevalencia de autoanticuerpos así como alteraciones cuantitativas y funcionales de las células CD4+FOXP3+ (Tregs), centrales en el mantenimiento de la autotolerancia. 15 niños VIH (+), 9 con inmunosupresión severa (CD4<15%) (A) y 6 sin evidencia de inmunosupresión

(CD4>25%) (B), todos en tratamiento antirretroviral y sin evidencia clínica de enfermedad autoinmune, fueron estudiados en dos momentos (1) y (2), de su seguimiento clínico-inmunológico-viroológico de rutina, con un intervalo de 12 meses entre ellos. Se evaluaron los niveles porcentuales y absolutos de células CD4+FOXP3+ por citometría de flujo, y la presencia de autoanticuerpos: FAN, antiADN, FR, ASMA, AMA, ANCA y ACA, mediante IFI y ELISA. Las mismas determinaciones se ensayaron en un grupo de 15 niños sanos (Co). Los niveles porcentuales de Tregs en niños del grupo A se mantuvieron estables entre (1) y (2) (Tregs A1:9.94 \pm 5.14, Tregs A2: 9.97 \pm 2.86) y significativamente incrementados frente a los niveles del grupo B (Tregs B1:5.63 \pm 0.84, Tregs B2:6.88 \pm 2.45) y Co: 6.77 \pm 1.29. Por el contrario los valores absolutos (mm³) de A y B se mantuvieron disminuidos frente al Co en ambos momentos (Tregs A1:22.2 \pm 12.3, Tregs A2:24.4 \pm 9.06; Treg B1:45.8 \pm 9.58, Tregs B2:46.7 \pm 9.34), Co: 70.7 \pm 13.1. Los ACA estuvieron presentes en el 66% de los niños del grupo A en (1) y (2), significativamente aumentado con respecto al grupo B, 17%, en ambos momentos del seguimiento. Al relacionar: nivel al momento (2)/ nivel al momento (1), de Tregs (absolutos) y FR (IU/ml), se obtuvo una correlación negativa entre dichos cocientes ($P < 0,05$; $r = -0,85$) en los pacientes del grupo A, mientras que esta correlación no fue significativa en el grupo B. La mayor exposición antigénica y la disminución en el número de células CD4+FOXP3+ estaría relacionada a la presencia incrementada de autoanticuerpos en niños VIH (+) con inmunosupresión severa.

683 (112) REGULACIÓN DE LA OSTEOCLASTOGÉNESIS IN VITRO POR EXTRACTOS PLACENTARIOS MURINOS. Custidiano A.¹; Urteneche M.²; Sacerdoti F.³; De León R.⁴; Gentile M.⁵; Canellada A.⁶

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. Dr. Ricardo Margni-CONICET-UBA; Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires^{1 2 3 4 5 6} <acustidiano@hotmail.com>

En Artritis Reumatoidea los macrófagos se diferencian a células degradadoras de hueso (osteoclastos) y factores placentarios inhiben sus síntomas clínicos. En el presente trabajo se analizó el efecto de extractos placentarios de ratón (EPs) sobre la diferenciación osteoclástica de macrófagos murinos RAW 267.4. Métodos: En los extractos obtenidos a los 7 y 18 días de gestación (EP7 y EP18), se determinó por ELISA la concentración (pg/mg) de IL-4, IL-10, IL-6, IL-12 y TNF- α . TGF- β se determinó por western blot. Los macrófagos se incubaron durante 5 días con las citoquinas RANKL y M-CSF (RM), en presencia y ausencia de los EPs. En las células se evaluó: 1- la actividad fosfatasa TRAP, mediante detección citoquímica de células multinucleadas TRAP (+); 2- Cathepsina K (ARNm), por RT-PCR, y 3- actividad de metaloproteasas por enzimograma de los sobrenadantes de cultivo. Resultados: EP7 presentó concentraciones mayores de TNF- α ($p < 0,01$), IL-6 e IL-12 ($p < 0,05$), y menores de IL-10 y TGF- β ($p < 0,05$), que EP18. No hubo diferencia en los niveles de IL-4. Ambos extractos inhibieron significativamente la estimulación por RM del número de células TRAP+, la expresión de cathepsina K, y la actividad gelatinasa de 92 kDa (% Inhibición EP7 = 73,5 \pm 9,9; 32,3 \pm 16,1; 38,6 \pm 3,9 respectivamente; EP18 = 90,5 \pm 8,3; 41,1 \pm 4,1; 47,7 \pm 13,2 respectivamente). En ausencia de RM, se observó que EP18 inhibió un 46,6 \pm 9,1% la expresión de cathepsina K y un 34,9 \pm 9,9% la actividad gelatinasa; el efecto de EP7 no fue significativo. Conclusiones: Los EPs inhibieron la diferenciación osteoclástica inducida por RM. En ausencia de RM, el diferente efecto ejercido por EP7 y EP18 podría deberse a las diferencias en su perfil de citoquinas. Se realizarán ensayos de inhibición de citoquinas para evaluar su rol en los efectos observados.

684 (711) LA GLIADINA INDUCE EXPRESIÓN DIFERENCIAL SLAM EN MONOCITOS DE PACIENTES CELÍACOS. Guillen L.¹; Periolo N.²; Aliboni V.³; Gonzalez L.⁴; Cheriavsky A.⁵

Hospital de Clínicas^{1, 2}; Hospital de Niños «Ricardo Gutiérrez»³; Hospital de Niños de San Justo⁴; Hospital de Clínicas⁵ <guillen.laura@gmail.com>

En pacientes celíacos (Cel) y en controles (Co), la gliadina desencadena producción de IL-15 en enterocitos y células de respuesta innata de la mucosa intestinal. Los monocitos (Mo) son células efectoras de respuesta innata que producen citoquinas y expresan moléculas coestimuladoras ante diferentes estímulos. SLAM (molécula de señalización de la activación linfocitaria) es marcador diferencial de activación de Mo estimulados vía receptores Toll. Nos propusimos evaluar la probable participación de SLAM en Mo estimulados con gliadina sola o en combinación con IL-15 en la patología celíaca. Monocitos aislados por gradiente de Ficoll-Hypaque a partir de 10ml de sangre entera proveniente de 8Cel y 10Co pediátricos fueron cultivados (10^6 cel/ml) por 24h en RPMI-1640 completo con: digesto de gliadina /a-chimiotripsina (25µg/ml urea 2M), zeína (100µg/ml RPMI), IL-15 (100ng/ml), urea 2M y LPS(1µg/ul) como control (+) de estimulación de Mo. Se verificó la activación de Mo por su producción de IL-8 (ELISA), y se marcaron Mo con anti-CD14 PE y -SLAM FITC seguido por análisis por citometría de flujo. El índice de estimulación (I) se definió como: Mo estimulados (gliadina o zeína)/Mo basal para i) producción de IL-8 (I_{IL-8}), ii) expresión de SLAM ($\%_{CD14+SLAM+}$) y iii) de su intensidad media de fluorescencia (I_{IMF}) en Cel y Co respectivamente, y se compararon dichos índices mediante *test T de Student*. El (I_{IL-8} gliadina) fue mayor que el (I_{IL-8} zeína) ($P=0.0001$) en Mo Co. La gliadina indujo aumento en el ($\%_{CD14+SLAM+}$) ($P=0.002$, Cel vs. Co) pero no en (I_{IMF} SLAM). Ambos índices ($\%_{CD14+SLAM+}$ e (I_{IMF} SLAM)) fueron mayores en Cel ($P=0.002$ y $P=0.001$, vs. Co) luego del estímulo con IL-15 sola, o en combinación con gliadina ($P=0.003$ y $P=0.01$, vs. Co). Si bien IL-15 es producida en todos los individuos en respuesta a gliadina, la modulación de SLAM tanto por gliadina como por IL-15 permite inferir su participación como parte de la respuesta innata diferencial en esta patología.

685 (799) SPECIFIC T CELLS AND CYTOKINE PRODUCTION IN AN EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE PROSTATITIS MODEL (EAP). Breser M.¹; Mackern J.²; Motrich R.³; Maccioni M.⁴; Rivero V.⁵

CIBICI-CONICET. Dpto. de Bioquímica Clínica. Fac. de Ciencias Químicas. UNC^{1, 2, 3, 4, 5} <mlbreser@fcq.unc.edu.ar>

In our group we have described an experimental model of autoimmune prostatitis that could be considered a valid model for the human chronic prostatitis disease. In the present work, we have focused on the specific T cell populations involved in our model. To evaluate these cells, we immunized 6-8 weeks-old NOD mice with prostate extract or saline solution in CFA on days 0 and 15. Mice were sacrificed at day 10 or 24 to analyze T cell populations. Lymph nodes and spleen Mononuclear cell (MC) were cultured during 48 hs in presence of the purified autoantigen PSBP or 15 overlapping amino acids peptides that represent PSBP sequence. IFN γ , IL17, IL10 and IL13 levels present in the supernatants were assayed by ELISA and the frequency of IFN γ , IL17, IL10 and Foxp3 positive cells were analyzed by flow cytometry. Lymph nodes and spleen MC cells stimulated with PSBP peptides P2, P4, P9, P11, P12 and P17 induced high levels of IFN γ and IL17, while the other peptides were not recognized. We observed that PSBP stimulated MC cells from day 10, produced higher levels of IL17 and showed higher frequency of CD4+IL17+ than MC obtained at day 24. When we analyzed IFN γ producing cells we observed the MC cells obtained at 24 produced higher levels of IFN γ and showed higher frequency of CD4+IFN γ + ($P < 0.01$). These results were in agreement with a major injury present in the prostate gland. In contrast, the presence of CD4+IL10+ cells and CD4+Foxp3+ cells increased their frequency during the development of the disease, showing higher values at day 24. Cells from control CFA mice show almost not detectable levels of IFN γ , IL17, IL10 and IL13. In conclusion, we observed major frequency of IL17 producing cells at early stages of the disease, while at late stages an increment of CD4+IFN γ +, CD4+IL10+ and CD4+Foxp3+ populations could be observed. It

is possible that pathogenic populations and regulatory mechanisms can be generated together to control the autoimmune process.

686 (157) ZNT8A: IMPLEMENTACIÓN DE UN NUEVO MARCADOR INVOLUCRADO EN LA DIABETES MELLITUS AUTOIMMUNE. Trabucchi A.¹; Faccinetti N.²; Guerra L.³; Iacono R.⁴; Poskus E.⁵; Valdez S.⁶

Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Prof. R. A. Margni (IDEHU), CONICET-UBA^{1, 2, 3, 4, 5, 6} <atrabucchi@ffyba.uba.ar>

La Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 es una enfermedad autoinmune órgano-específica dependiente de células T. La presencia de autoanticuerpos específicos contra proteínas de los islotes pancreáticos circulantes (marcadores) es indicio de la autoinmunidad subyacente que precede a la enfermedad clínica. La medida combinada de anticuerpos anti-glutamato decarboxilasa (GADA), anti-proteína tirosina fosfatasa IA-2 (IA-2A) y anti-insulina/proinsulina (IAA/PAA) identifica a más del 80% de los pacientes en debut o en riesgo de desarrollar diabetes. En 2007 se identificó un nuevo autoantígeno, el transportador de Zn, ZnT8, específico de células beta pancreáticas, sumándose a la tríada clásica un nuevo marcador de autoinmunidad. Objetivos: determinar la prevalencia de anticuerpos anti-ZnT8 (ZnT8A) en individuos diabéticos debutantes y grupos de riesgo, y en la población diabética adulta tipo LADA. Metodología: se estudiaron mediante el método de referencia RBA (Radioligand Binding Assay, o técnica de unión de radioligando), muestras de pacientes debutantes con DM tipo 1 y muestras de individuos diabéticos diagnosticados en edad adulta. Los resultados se expresaron en Unidades de Desvío Estándar (sDS). Resultados: sobre el total de 71 pacientes con DM tipo1 evaluados, 55 (77%) resultaron positivos para GADA, 22 (31%) resultaron positivos para IA-2A, 35 (49%) para IAA y 48 (68%) fueron positivos para ZnT8A. En individuos con DM diagnosticada en la edad adulta (n=55), las prevalencias relativas de los distintos marcadores fueron 22% para GADA, 7% para IA2A, 9% para ZnT8A y 25% para IAA. Conclusiones: El descubrimiento de ZnT8 como el 4to autoantígeno en diabetes provee una medida adicional para la incidencia y progresión de la enfermedad. La determinación de ZnT8A junto con otros marcadores aumenta la sensibilidad de detección de autoinmunidad de un 84% a más del 94% en DM tipo1.

687 (155) AUTO-ANTICUERPOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA PROMUEVEN LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO HUMANO MCF-7 POR ACTIVACIÓN MUSCARÍNICA. Pelegrina L.¹; Fiszman G.²; Azar M.³; Cresta Morgado C.⁴; Sales M.⁵

Laboratorio de Inmunofarmacología Tumoral. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET. UBA¹; Instituto de Oncología A.H. Roffo. UBA^{2, 3, 4}; Laboratorio de Inmunofarmacología Tumoral. Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO)-CONICET. UBA⁵ <laurapelegrina@hotmail.com>

Los receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) se expresan en tumores mamaros humanos y en células MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) y no han sido detectados en mama normal o en células MCF-10A (línea mamaria normal). La activación de los RCM promueve la proliferación in vitro de las células tumorales y por su sobre-expresión podrían comportarse como auto-antígenos. La principal causa de muerte en pacientes con cáncer de mama es la metástasis, que se produce cuando las células transformadas se liberan del tumor primario y migran a órganos distantes. Por lo tanto nos proponemos estudiar el efecto de la activación muscarínica producida por el agonista carbacol (CARB) o por auto-anticuerpos dirigidos contra RCM purificados de pacientes con cáncer de mama en T1N0Mx (tamaño tumoral menor de 2 cm y sin metástasis ganglionares) sobre la migración en herida de células MCF-7. Observamos que el CARB estimuló en forma concentración-dependiente la migración de células

MCF-7 siendo el efecto máximo $115 \pm 12\%$ ($p < 0,001$ vs. basal, células sin tratamiento) a 10^{-10} M. La pre-incubación de las células con 10^{-9} M del antagonista atropina (AT), revirtió la estimulación producida por el CARB. Comprobamos que la IgG de 4 pacientes en T1N0Mx, estimuló en forma concentración-dependiente la migración; el efecto máximo que fue $122 \pm 15\%$ ($p < 0,001$ vs. basal) fue obtenido con 10^{-8} M y también fue reducido significativamente por AT. La IgG control (pacientes libres de enfermedad) no modificó la migración con respecto al basal. Concluimos que la presencia de autoAbs contra RCM en pacientes con cáncer de mama, que estimulan la migración de células tumorales, podrían promover la aparición de metástasis.

688 (814) DIFFERENTIAL REGULATION OF B CELL SUBSETS SURVIVAL BY DEATH-RECEPTORS AND BAFF. Amezcua Vesely M.¹; Acosta Rodriguez E.²; Bermejo D.³; Montes C.⁴; Gruppi A.⁵

CIBICI-CONICET^{1 2 3 4 5} <cavesely@fcq.unc.edu.ar>

Within the B cells, B2, B1 and Marginal Zone B cell subsets are distinguished by their location, phenotype and Ag specificity. These subsets produce protective Abs important during infection and also autoreactive Abs involved in autoimmunity. The fine-tuned regulation of B cell survival through apoptosis is a critical process to maintain humoral immune homeostasis. Our aim was to evaluate the susceptibility of different B cell subsets to the apoptosis induced by crosslinking of the death receptors, Fas and FcγRIIb (FcR). Phenotypic analysis of sorted B cell subsets from C57BL/6 mice showed that peritoneal B1 cells expressed higher levels of FcR and lower levels of Fas than peritoneal B2 (pB2) and spleen B (sB) cells. Evaluation of FcR and Fas expression after 48h-culture with CpG (2 μg/ml) showed that TLR9 triggering upregulated both FcR and Fas in pB2 and sB. In contrast, activated B1 cells increased FcR but not Fas expression. Accordingly, pB2 and sB were susceptible to apoptosis via FcR as well as Fas crosslinking while B1 cells were susceptible to FcR-induced apoptosis but resistant to Fas-mediated cell death. We next addressed if receptor-mediated apoptosis of B cell subsets could be regulated by BAFF (B cell activating factor), a cytokine critical for survival, activation and maturation of B cells. Interestingly, BAFF (150 ng/ml) significantly diminished the expression of FcR in all the activated B cell subsets and, consequently, reduced the susceptibility of these cells to FcR-induced death. BAFF did modify neither Fas expression nor Fas-mediated apoptosis susceptibility. Our results show that survival of B cell subsets is regulated through different death receptors, B2 cells are controlled by Fas and FcR pathways while B1 cells are controlled only via FcR. In addition, we demonstrate that BAFF protect B cells from FcR mediated apoptosis, highlighting a new mechanism through which BAFF favors B cells survival and potentially contributes to autoimmunity.

689 (209) ACCIÓN DEL HAART SOBRE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS B EN NIÑOS INFECTADOS POR VIH. Quiroz H.¹; Balbaryski J.²; Candi M.³; Raiden S.⁴; Gaddi E.⁵

Hospital Gral de Niños Dr. P. de Elizalde. Buenos Aires, Argentina^{1 2 3}; Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, Argentina⁴; Hospital Gral de Niños Dr. P. de Elizalde. Buenos Aires, Argentina⁵
<hectorquiroz@biocientifica.com.ar>

La disminución de la carga viral (CV) por acción de la terapia HAART restaura los niveles de LTCD4+, con modificaciones cualitativas en las restantes poblaciones linfocitarias. Los cambios en los niveles y subpoblaciones de linfocitos B (LB) fueron estudiados en forma longitudinal, luego de un año de aplicación del HAART, en 26 niños VIH (+), 6 vírgenes de tratamiento con enfermedad aguda (A), 10 con enfermedad crónica y buena respuesta al HAART (B) y 10 niños con falla de tratamiento (C). En el análisis por citometría de flujo se utilizaron AcsMo específicos para CD45, CD3, IgD (FITC), CD14, CD4, CD27 (PE) y CD19 (PECy5)). Los LB fueron evaluados además, en un grupo control (Co) de 20 niños sanos. Los pacientes del grupo A presentaron

un descenso significativo de CV (log) (i: 4.73 ± 0.8 , f: 3.59 ± 1.1) y un aumento significativo en los porcentajes de LB naive (N) CD19+CD27-IgD+ entre ambos momentos del seguimiento (LBN i : 61 ± 22 , LBN f : 78 ± 10). El grupo B mantuvo niveles estables de LTCD4+ y CV. En 3 niños, (30%), se observaron porcentajes de LBM por debajo del intervalo de referencia, manteniéndose los niveles, al igual que los subsets CD19+CD27+IgD+ y CD19+CD27-IgD-, luego de un año de HAART. El 70% de los niños del grupo C, presentó porcentajes de LBM por debajo del intervalo del grupo Co, y una respuesta al HAART similar al grupo B. Los LBM doble negativos (DN) CD19+CD27-IgD- presentaron porcentajes significativamente aumentados, en ambos momentos del seguimiento, en niños del grupo C con respecto al grupo B y al Co, (DNC i: 8.7 ± 4.2 vs DNB i: 3.6 ± 1.8 ; DNC f: 7.4 ± 3.2 vs DNB f: 4.1 ± 1.9). Co: 4.3 ± 1.8 . Durante el período de seguimiento los niveles de LB y los subsets de LBM CD27+ y CD27-no experimentaron cambios por acción del HAART. Son necesarios estudios que permitan evaluar el persistente aumento del subset CD19+CD27-IgD- en pacientes con falla de tratamiento.

690 (490) CAPACIDAD ADYUVANTE DE LIGANDOS DE TLR7 SOBRE LA RESPUESTA HUMORAL Y LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS EN CÉLULAS DENDRÍTICAS. Crespo M.¹; Zacca E.²; Maletto B.³; Pistoressi M.⁴; Morón G.⁵

CIBICI-CONICET, Fac.Cs.Químicas-Universidad Nacional de Córdoba^{1 2 3 4 5} <micrespo@fcq.unc.edu.ar>

Previamente mostramos que células dendríticas de bajo de ratones C57BL/6 (DCs) estimuladas con ligandos de TLR7 aumentan su capacidad de realizar presentación cruzada de antígenos (Ag) *in vitro* y tienen capacidad adyuvante en la inducción de respuesta CTL. Para evaluar el efecto de PolyU (ligando TLR7) sobre la respuesta humoral, se inmunizaron ratones en el día 0 y 21 con OVA junto a PolyU estabilizado con DOTAP (PolyU/DO). En el día 28 se determinaron los niveles séricos de IgG₁ e IgG_{2a} específicos. En ratones inmunizados con PolyU/DO+OVA el título (log₁₀) de IgG₁ fue $5,71 \pm 0,01$ y el de IgG_{2a} fue $5,3 \pm 0,2$ mientras que en los inmunizados con DOTAP+OVA fue de $5,31 \pm 0,01$ y $2,00 \pm 0,01$ respectivamente ($p < 0,0001$). Para dilucidar el mecanismo por el cual PolyU actúa, DCs estimuladas *in vitro* con PolyU/DO+OVA y preincubadas con diferentes inhibidores, se cocultivaron con linfocitos T CD8 de ratones OT-I. Luego de 3 días se evaluó activación y proliferación de linfocitos por dilución de CFSE y secreción de IFN α en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. En ausencia de inhibidores un 78% de las células T estaban proliferando (5% con DCs sin estimular). En presencia de Exotoxina A (inhibidor de Sec61, posible responsable de la salida de Ag del endosoma al citosol), un 34% estaban en proliferación. En presencia de Lactacistina, inhibidor de proteosoma, no hubo proliferación. En presencia de IRS661, antagonista del TLR7, un 30% estaban en proliferación. Estos resultados se correlacionaron con la expresión de CD25 y la secreción de IFN γ . En conclusión, el PolyU tiene capacidad adyuvante sobre la respuesta humoral y sobre la presentación cruzada de OVA en DCs. La misma estaría mediada principalmente por estimulación del TLR7. En el procesamiento de OVA en DCs estimuladas con PolyU la proteína Sec61 y el proteasoma jugarían un rol determinante sobre la presentación cruzada de Ag.

691 (567) ESTUDIO DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LOS HCABS PRESENTES EN LLAMAS. Saccodossi N.¹; De Simone E.²; Leoni J.³

IDEHU, Cátedra de Inmunología, FFYB, UBA¹; Cátedra de Fisiología Animal, FCV, UBA²; IDEHU, Cátedra de Inmunología, FFYB, UBA³ <natalia@ffyb.uba.ar>

Los HCABs (Heavy Chain Antibodies) carecen de las cadenas livianas y del CH1. Existen 3 isotipos de IgG en camélidos: IgG1, IgG2 e IgG3; de los cuales la IgG2 (IgG2a, IgG2b e IgG2c) e IgG3 son no convencionales del tipo HCABs, mientras que la IgG1 mantiene la estructura convencional. En las llamas, el 30% de las

Ig séricas son HCABs. Los objetivos del siguiente trabajo fueron: estudiar la capacidad de los HCABs de fijar complemento y de hemaglutinar, y buscar en sus secuencias primarias el motivo de unión al C1q. Se inmunizaron llamas con estroma de GR ovinos y se purificó a partir del suero la IgM, la IgG1 y la fracción IgG2-IgG3, en condiciones fisiológicas por Sephadex G150. Se realizó un ensayo de fijación de complemento directo y también se evaluó la capacidad de hemaglutinar. Por otro lado, se obtuvieron los DNAC de las regiones constantes de los HCABs y se analizó la presencia del motivo conservado responsable de la unión al C1q. Al realizar la fijación de complemento, el pool de suero de las llamas inmunizadas, la IgM y la IgG1, pudieron fijar complemento; sin embargo los HCABs (IgG2 e IgG3) no pudieron hemolisar los GR a pesar de presentar en su secuencia primaria el motivo de unión al C1q conservado. Por otro lado, la fracción de IgG2-IgG3 no hemaglutinó a diferencia de la IgM e IgG1, aunque luego de añadir suero anti-IgG a la fracción de IgG2-IgG3 unida a los GR, se observó hemaglutinación. Como conclusión, los HCABs no fueron capaces de lisar los GR a pesar de que sus secuencias presentaran el motivo de unión al C1q y tampoco fueron capaces de hemaglutinar. Estos resultados estarían indicando que los HCABs no pueden realizar entrecruzamientos efectivos con los Ag. Probablemente, la interacción del C1q con el CH2 de los HCABs se ve impedida estéricamente por la gran cercanía de los dominios variables. Por otro lado, como el motivo de unión al C1q está conservado, los HCABs podrían tener un papel en la modulación de la lisis por complemento.

692 (114) MODIFICACIÓN DE LAS CITOQUINAS TH2 POR ADMINISTRACIÓN DE UNA BACTERIA INMUNOMODULADORA EN UN MODELO DE ALERGIA. Castro M.¹; Azpiroz M.²; Molina M.³; Mourelle C.⁴; Manghi M.⁵

Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral «Dr. RA Margni», Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.^{1 2 3 4 5} <mcastro@ffy.uba.ar>

La alergia deriva de una respuesta inmune Th2 caracterizada por la producción de citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, las cuáles promueven una producción exacerbada de IgE. Una forma de prevenir o tratar este tipo de desorden es modular el balance Th1/Th2 hacia un perfil Th1 dominante. En nuestro laboratorio se estudia la actividad inmunorreguladora de *Enterococcus faecalis* CECT7121, cepa ambiental no patógena que presenta un efecto adyuvante e inmunomodulador pro-Th1. En este trabajo se estudió la actividad moduladora de *E. faecalis* CECT7121 en un modelo murino de alergia inducido por ovoalbúmina (Ova). Ratones BALB/c (n:5, 6 sem) fueron pretratados intragástricamente (ig) o no (control) con *E. faecalis* CECT7121 (3.10e8 UFC/ml, 200 µl) los días -3, -2, -1, y nuevamente los días 13, 14 y 15. Ambos grupos de animales control y pretratados con la bacteria fueron inmunizados (sc) con 10 µg de Ova y 1 mg de Al(OH)₃, los días 0, 7 y 21. En muestras de suero se analizó el nivel de IgE, IgG1 e IgG2a anti-Ova (ELISA). En los sobrenadantes de cultivo de células de bazo, luego del estímulo con Ova, se estudió la presencia de citoquinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e IL-12 (ELISA). En los animales pre-tratados con *E. faecalis* CECT7121 e inmunizados (Ef/Ova), tanto los niveles de IgE específica como los de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10 fueron menores que en los animales no tratados (SF/Ova). No se observó diferencia significativa en los niveles de IgG1 e IgG2a anti-Ova, ni en los de IL-12.

	SF/Ova	Ef/Ova
IgE anti-Ova (DO)	0.79 ± 0.11	0.44 ± 0.05
IgG1 anti-Ova (DO)	0.79 ± 0.05	0.83 ± 0.08
IgG2a anti-Ova (DO)	0.27 ± 0.03	0.25 ± 0.04
IL-4 (pg/ml)	316.5 ± 41.4	156.3 ± 33.5
IL-5 (pg/ml)	270.6 ± 99.1	96.7 ± 45.5
IL-13 (pg/ml)	19.2 ± 6.8	1.4 ± 0.8
IL-10 (pg/ml)	28.9 ± 8.3	6.5 ± 2.3
IL-12 (pg/ml)	20.1 ± 3.4	24.6 ± 2.9

Nuestros resultados ponen en evidencia que el pre-tratamiento ig con *E. faecalis* CECT7121 disminuye el establecimiento de la respuesta alérgica anti-Ova en un modelo murino.

693 (344) LA HISTAMINA PROMUEVE LA PRODUCCIÓN DE IL-12 Y ACTIVA RESPUESTAS CITOTÓXICAS AL ACTUAR SOBRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS: ROL DE LOS MICROAMBIENTES ÁCIDOS. Amaral M.¹; Alvarez C.²; Borge M.³; Nannini P.⁴; Gabelloni M.⁵; Fuxman J.⁶; Morande P.⁷; Galletti J.⁸; Geffner J.⁹; Vermeulen M.¹⁰

Academia Nacional de Medicina^{1 2 3 4 5 6 7 8 9 10} <mmarta@hematologia.anm.edu.ar>

La histamina (HIS) es una amina vasoactiva liberada por los mastocitos y basófilos durante los procesos inflamatorios e infecciosos, con capacidad de modular la funcionalidad de las células dendríticas (CD). Previamente, demostramos que la HIS promueve el aumento en la producción de IL-12 por CD murinas expuestas a pH 6,5, actuando a través del receptor H₁R. El objetivo de este trabajo consistió en estudiar mediante qué receptor la histamina modulaba esta función. Las CD se obtuvieron de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 cultivados con GM-CSF. Primero, realizamos una cuantificación relativa de los niveles de expresión de los RNAm del H₃R y H₄R mediante una PCR en tiempo real. Las CD se incubaron con medio a pH 7,3 o pH 6,5 durante 1h a 37°C, y se trataron o no con HIS (0,1µM) por 30 min. Encontramos que la HIS indujo un aumento de la expresión del RNAm del H₃R en las CD expuestas a pH 6,5, sin afectar la del H₄R. Luego estudiamos la producción de IL-12 por marcación intracitoplasmática y citometría de flujo. Las CD se pre-incubaron o no durante 10min con tioperamida: Ti (100 µM), antagonista del H₃R/H₄R, y posteriormente se trataron con HIS. Observamos una disminución del 20% en la producción de IL-12, en CD expuestas a pH 6,5 y tratadas con Ti previa incubación con HIS: media (% de células positivas ± ES) (n=7; pd>0.05) pH 6,5, 30 ± 5; pH 6,5 + HIS, 46 ± 5; pH 6,5 + HIS + Ti, 32 ± 6. Finalmente estudiamos la inducción de respuestas citotóxicas, usualmente asociadas a la producción de esta citoquina. Notablemente, en ese microambiente ácido, la HIS aumentó la capacidad citolítica de las CD: media (cpm ± ES)(n=4; pd>0.05) pH 7.3, 19,2 ± 4.3; pH 7.3 + HIS, 29 ± 3; pH 6.5, 27 ± 1,5, pH 6.5 + HIS, 44 ± 4,5. Estos resultados indicarían que bajo la influencia de microambientes de etiología ácida, como los observados en los procesos asmáticos, la HIS desencadenaría la activación de respuestas Th1 a través del incremento en la liberación de IL-12 por CD.

694 (559) BACULOVIRUSES STRONGLY POTENTIATE OVA CYTOTOXIC IMMUNE RESPONSES BY CAPSID DISPLAY. Molinari P.¹; Crespo M.²; Gravisaco M.³; Taboga O.⁴; Morón G.⁵

Instituto de Biotecnología, INTA¹; CIBICI-Fac.Cs.Qcas. UNC²; Instituto de Biotecnología, INTA^{3 4}; CIBICI-Fac.Cs.Qcas. UNC⁵ <pmolinari@cni.inta.gov.ar>

Baculoviruses are dsDNA viruses that are pathogenic for insects. They infect a broad range of mammalian cell types but do not replicate in these cells. The potential effects of these insect viruses on the immune responses of mammals are beginning to be understood. A recombinant baculovirus was designed which displays OVA on the capsid as a fusion with vp39 gene. We demonstrate in this study that baculoviruses have strong properties as adjuvants and as vectors for antigenic presentation in mice, allowing cross-presentation of the heterologous sequence transported and promoting potent CD4+, CD8+ and cytotoxic T cell adaptive responses against OVA. Baculoviruses also induce the *in vitro* and *in vivo* maturation of dendritic cells and the production of inflammatory cytokines, promoting adaptive immune responses. Interestingly, the OVA capsid display vector induces a strong cytotoxic T-cell response with minimal doses of antigen (corresponding to 30 ng of OVA protein) upon intravenous injection of BVOVA (5x10⁷PFU). We also demonstrate that baculoviruses carrying the antigen are much more efficient in inducing a cytotoxic

T-cell response than baculoviruses co-administered with the antigen.

- 695 (763) LINFOCITOS B QUE EXPRESAN EL GEN VH4-34: CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES.** Morande P.¹; Borge M.²; Zanetti S.³; Nannini P.⁴; Galetti J.⁵; Gamberale R.⁶; Giordano M.⁷

Lab Inmunología Oncológica, Academia Nacional Medicina^{1 2 3 4 5 6 7} <pabloemorande@gmail.com>

Las inmunoglobulinas que expresan el gen de la cadena pesada VH4-34 reconocen carbohidratos presentes en la membrana plasmática de distintos tipos celulares, entre otros, de eritrocitos y linfocitos. El porcentaje de linfocitos B vírgenes circulantes que expresan este receptor antigénico autorreactivo (linfocitos B VH4-34) es elevado, pero su diferenciación a plasmocito se encuentra inhibida en condiciones normales. Es llamativo que un idiotipo potencialmente patogénico se encuentre tan representado en el repertorio B normal. Nuestro objetivo fue caracterizar a la población B VH4-34, para lo cual contamos con un anticuerpo monoclonal específico (clon 9G4, IgG2a de rata). Por análisis de citometría de flujo encontramos que el 4,5±0,5% de las células CD19+ en sangre periférica de dadores sanos (n=8) y el 6,2±0,4% en amígdalas (n=3) expresan este idiotipo. La población B VH4-34 expresó niveles intermedios de CD86, CCR7 y CD27, y altos niveles de HLA-DR comparada con células CD19+ totales. Resultados preliminares mostraron que la depleción de la población B VH4-34 aumenta los niveles de moléculas co-estimuladoras en linfocitos B de amígdalas, cuando estos son activados con anti-IgM (15µg/mL) e IL-2 (100 U/mL). La expresión de CD80 y CD86 se evaluó a las 24 y 72 hs de cultivo. Los resultados se muestran como media de intensidad de fluorescencia (MIF) en la población CD19+. Para CD86: MIF en presencia de B VH4-34=165, MIF en ausencia de B VH4-34=307 (p<0,05). La misma tendencia se observó para la expresión de CD80, tanto a las 24 como a las 72 hs de cultivo. Proponemos que la sub-población B VH4-34 se encuentra sobre-representada en el repertorio B pre-inmune porque cumpliría funciones regulatorias durante la activación de los linfocitos B IgM positivos.

- 696 (276) EOSINÓFILOS COMO CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS: INDUCCIÓN DE LI T PRODUCTORES DE IFN-γ Y TNF.** Garro A.¹; Chiappello L.²; Baronetti J.³; Masih D.⁴

Dpto Bioq Clínica, CIBICI-CONICET, FCQ-UNC, Córdoba, Argentina^{1 2 3 4} <apgarro@fcq.unc.edu.ar>

Cryptococcus neoformans es una levadura encapsulada causante de infecciones pulmonares en huéspedes inmunocompetentes o micosis diseminadas en pacientes inmunosuprimidos. En la respuesta inmune a *C. neoformans* la presencia de Li T CD4 y CD8 productores de IFNγ y TNF son fundamentales para el reclutamiento y activación de células fagocíticas, el clearance pulmonar y la protección contra la diseminación de la infección. Durante la criptococosis diseminada en ratas desarrollada en nuestro laboratorio y en modelos murinos de infección con *C. neoformans* se ha observado la presencia de numerosos eosinófilos (Eo) en los granulomas que rodean a las levaduras encapsuladas. Sin embargo se desconoce la función de estas células en la respuesta inmune a este hongo. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que levaduras vivas de *C. neoformans* opsonizadas con un AcM específico son capaces de activar Eo. De modo tal, que luego de la fagocitosis del hongo los Eo presentan: (I) incremento en los niveles de expresión de moléculas MHC I y II, CD80 y CD86; (II) incremento en la síntesis de TNF e IFNγ y (III) disminución de la producción de derivados tóxicos de oxígeno y del nitrógeno. Resultados recientemente obtenidos demuestran que los Eo activados por el hongo pueden inducir una respuesta inmune antígeno específica, estimulando la proliferación de células T CD4 y CD8 purificadas de ratas infectadas (p< 0,001). Sorprendentemente, se observó que los Eo pulsados con *C. neoformans* inducen principal-

mente la diferenciación de células T CD4 y CD8 productoras de INFγ y TNF, encontrándose en los sobrenadantes de co-cultivo importantes cantidades de ambas citoquinas proinflamatorias (p< 0,02). Nuestros resultados muestran que los Eo no sólo son células efectoras de la Inmunidad Innata, sino que estarían involucradas en la interfase entre la Inmunidad Innata y la Adaptativa participando en la generación de una respuesta inmune específica a *Cryptococcus neoformans*.

TRABAJOS SELECCIONADOS PARA SIMPOSIOS

- 697 (90) EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF-1α) SE ASOCIA CON EL CONTENIDO HEPÁTICO DEL DNA MITOCONDRIAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ESTEATOSIS HEPÁTICA INDUCIDO POR DIETA RICA EN GRASA.** J Carabelli 1, M S Rosselli 1, A L Burgueño 1, T Fernández Gianotti 1, C J Pirola 1, S Sookoian 1

¹Instituto de Investigaciones Médicas "Alfredo Lanari" IDIM CONICET

Evidencias previas demostraron que a nivel molecular y estructural tanto la biogénesis como la función mitocondrial se encuentran alteradas en el síndrome metabólico (SM). La enfermedad grasa del hígado de etiología no alcohólica (NAFLD) representa el componente hepático del SM. En su patogénesis intervienen varios factores relacionados con la lipotoxicidad, con la consiguiente respuesta inflamatoria seguida de colapso venoso e hipoperfusión celular. Además, la disfunción mitocondrial juega un papel crítico en el desarrollo de la NAFLD. Hipotetizamos que la NAFLD inducida por dieta rica en grasa (DG) se asocia con alteraciones en el contenido hepático del DNA mitocondrial (mtDNA) el cual podría estar ligado a la hipoxia asociada a lipotoxicidad. Para testear esta hipótesis se usaron 15 ratas Sprague-Dawley macho sometidas a DG durante 8 semanas la cual indujo exitosamente NAFLD. Además se incluyeron 10 ratas alimentadas con dieta estándar (C). La expresión hepática del mRNA de genes de la biogénesis mitocondrial (PGC1α y TFAM), PPARdelta (oxidación de ácidos grasos), citocromo C oxidasa IV1 (cadena respiratoria mitocondrial-COX-IV), HIF-1α (factor inducible por hipoxia) así como los cambios cuantitativos del mtDNA hepático (rel mtDNA/nuclearDNA) se evaluaron mediante PCR en tiempo real. La expresión del mRNA se relativizó usando ciclofilina como control. Resultados: la rel mtDNA/nuclearDNA fue significativamente mayor en el grupo DG (2915±228) en comparación con el C (2069±279) media±SE, p<0.008, y correlacionó positivamente con la expresión hepática de HIF-1α (Spearman R: 0.37, p< 0.001) y COX-IV (Spearman R: 0.30, p< 0.01). No hubo relación entre el mtDNA y la expresión hepática de PGC-1α, TFAM y PPAR. En el grupo DG se observó un incremento significativo de la expresión hepática del HIF-1α (p<0.004). En conclusión, la DG induciría un incremento del mtDNA probablemente a través del HIF-1α como mecanismo compensatorio a la hipoxia inducida por lipotoxicidad.

- 698 (757) EL HIERRO ES LA SEÑAL QUE REGULA LA EXPRESIÓN DE HEPICIDINA, FERROPORTINA Y ERITROPOYETINA EN HIPOXIA.** M C DAnna 1, M E Roque 1

¹Laboratorio de Fisiología Humana, Bahía Blanca

A partir del indiscutible rol de HEPICIDINA en la ruta del Fe, el exceso de este nutriente induce cambios en la proteína de exportación Ferroportina (MTP1) y en la Eritropoyetina (Epo), cuya actividad eritropoyética depende de la disponibilidad de Fe. El objetivo fue estudiar la respuesta de HEPICIDINA, MTP1 y Epo frente al exceso de Fe, en estado de hipoxia. Se utilizó un Modelo Acoplado desarrollado induciendo Sobrecarga de Fe seguido de hipoxia. Ratonas hembra CF1 (n=14/grupo) agrupados en: 1) Grupo Sobrecarga de Fe seguido de Hipoxia: Fe-Dextrán(1g/

kg)(días:0,10) + Hipoxia Normobárica(días:21-33); 2)Grupo sin Sobrecarga de Fe seguido Hipoxia: SF (días:0,10) + Hipoxia Normobárica (días:21-33); 3)Grupo Sobrecarga de Fe en Normoxia: Fe-Dextrán (días:0,10) + Normoxia (días 21-33); 4)Grupo sin Sobrecarga de Fe en Normoxia: SF(días:0,10) + Normoxia (días 21-33). Se determinó: HCT, Hb, Reti y Epo por ELISA. Bazo e hígado en formol 10% se procesaron para inmunohistoquímica: anti-Prohepcidina; anti-MTP1; EnVision+System-HRP(DAB). Epo aumentó significativamente (3261±288pg/mLvs.178±60 pg/mL) en Hipoxia con y sin exceso de Fe. Asimismo, su perfil se correlacionó en forma directa con los cambios de HCT (60±2%vs.47±1%), Hb (17,4±0,5g/dLvs.14,1±0,8g/dL) y Reti (8,4±2%vs2,1±1%). La expresión de MTP1 aumentó en macrófagos esplénicos, hepáticos y en hepatocitos en Hipoxia sin exceso de Fe, respecto a normoxia. La expresión de Hepcidina hepática aumentó en Sobrecarga de Fe y se mantuvo en Hipoxia. En Sobrecarga de Fe seguida de Hipoxia, coexistió el aumento de Hepcidina y de Epo. Podemos concluir que diferentes señales indujeron los cambios de Hepcidina y Epo en el modelo de Sobrecarga de Fe más Hipoxia, entre ellas, el Fe y la PO₂, respectivamente. Por otra parte, se evidenció el rol regulador incuestionable de Hepcidina sobre MTP1 a partir de la clara inhibición de Hepcidina sobre este exportador en Hipoxia cuando existe exceso de Fe.

699 (379) EXPRESIÓN GÉNICA CONTROLADA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES SÓLIDOS MEDIANTE TERAPIA GÉNICA CON CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS. R A Dewey^{1,2}, F Noyan², I Avedillo Díez^{1,2}, M Hapke², C Klein²

¹Laboratorio de Terapia Génica y Células Madre, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH) CONICET-UNSAM. ²Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Alemania

El microambiente tumoral está formado por un pronunciado infiltrado inflamatorio compuesto de linfocitos T y macrófagos, los cuales se originan a partir de células madre hematopoyéticas (HSC). Nuestra hipótesis se basa en que el trasplante de HSC modificadas genéticamente permitiría una expresión sostenida de transgenes terapéuticos en células hematopoyéticas efectoras que infiltran los tumores sólidos. Para permitir la expresión del transgen terapéutico sólo en el área tumoral, desarrollamos vectores lentivirales en los cuales la expresión génica está controlada por el promotor inducible por stress de la HSP70b humana. Inicialmente y mediante acción de la hipertermia, estudiamos in vitro las propiedades de inducibilidad de HSP en vectores lentivirales conteniendo GFP, en células tumorales humanas y de ratón. En ambos tipos celulares el máximo de expresión génica (p<0.01) se logró 6-9 horas luego de la incubación de las células a 43°C por 1 hora. Posteriormente analizamos in vivo, mediante trasplante de medula ósea, la expresión de GFP dirigida por el promotor HSP, en células del infiltrado inflamatorio de gliomas subcutáneos. Observamos que en las distintas subpoblaciones del infiltrado tumoral estudiadas, el promotor HSP puede ser inducido por el stress generado por el microambiente tumoral. Para comprobar el efecto antitumoral de la estrategia, en los vectores lentivirales se reemplazó GFP por un mutante dominante negativo del receptor II de TGF- γ (T β RIIDN). En ratones transplantados con HSC que codifican para T β RIIDN bajo el promotor HSP, se produce una masiva respuesta antitumoral equivalente (p>0.05) a la obtenida mediante el mismo transgen bajo la acción del promotor constitutivo. En resumen, la modificación genética de células madre hematopoyéticas y la expresión controlada de transgenes terapéuticos en células inflamatorias que infiltran el tumor constituye una estrategia experimental novedosa para el desarrollo de terapias anti-tumorales.

700 (53) EXPRESIÓN DEL SISTEMA TGF-BETA1 TESTICULAR Y SU PARTICIPACIÓN EN LA HIPERTROFIA E HIPERPLASIA DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG. C R Gonzalez¹, B Gonzalez¹, S Rull¹, L R Franca², M L dos Santos², G Mattos Jardim Costa², R S Calandra¹, S I Gonzalez de Calvar^{1,3}

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), ²Departamento de Morfología, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. ³Facultad de Medicina, UBA

El Factor de Crecimiento Transformante TGF- β 1 cumple un rol importante en la modulación de la función testicular. Ratones (cepa FVB/n) transgénicos que sobre expresan las subunidades α y β de hCG (hCG+) presentan infertilidad y un aumento en la esteroidogénesis testicular, altos niveles de progesterona (P4) y testosterona (T) y una marcada hipertrofia e hiperplasia de las células de Leydig (CL) en animales inmaduros. Objetivos: Estudiar: 1) en CL purificadas de ratones hCG+ (21 días) la expresión génica y proteica del sistema TGF- β 1 respecto de animales control (WT) por inmunohistoquímica y RT-PCR; 2) la regulación de dicho sistema por hCG, P4 y T por RT-PCR en CL WT; 3) el efecto de TGF- β 1 sobre marcadores de proliferación y 4) el efecto in vivo de TGF- β 1 sobre la morfología testicular. Se inmunodetectó TGF- β 1, ALK-5 y ALK-1 en CL WT y hCG+. La expresión génica de TGF- β 1 y endoglin (EDG) fue mayor en CL hCG+ respecto de los controles (p<0.05). hCG (10 UI/ml) aumentó la expresión génica de TGF- γ 1, y P4 (10⁻⁶ M) incrementó la expresión génica de EDG, efecto revertido por RU486 (antagonista de P4) (p<0.05). T (10⁻⁶ M) no produjo cambios en los parámetros evaluados. Sólo la acción conjunta de TGF- β 1 (1ng/ml) y P4 causó: a) inducción de la fosforilación de las Smad1/5 detectada por Western blot, b) aumento en la expresión de PCNA detectado por inmunocitoquímica y c) disminución de la relación Bax/Bcl2 analizada por RT-PCR (p<0.05). Estudios morfométricos revelaron que la inyección intratesticular de TGF- β 1 y P4 (sc) aumentó el volumen (V) del intersticio y de las CL debido a un aumento en el V citoplasmático (control 341.49±43.86 vs TGF- β 1+P4 511.16±30.83, p<0.05) y una disminución del V nuclear (control 144.28±17.74 vs TGF- β 1+P4 125.02±4.89, p<0.05). Estos resultados permiten especular que la vía de señalización TGF- β 1-EDG-ALK-1-Smad1/5 participaría en la proliferación del intersticio testicular, conduciendo a la hipertrofia e hiperplasia de las CL.

701 (445) ESTUDIO DE UN INHIBIDOR DEL RECEPTOR I DE TGF BETA COMO POSIBLE AGENTE ANTITUMORAL EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO. P F Vazquez¹, M J Carlini¹, L L Colombo, E Bal de Kier Joffé¹, L Puricelli¹

¹Instituto de Oncología Angel H Roffo

Los TGF β comprenden una familia de proteínas capaces de regular procesos tales como proliferación, motilidad y apoptosis. En el modelo de adenocarcinoma pulmonar murino LP07, TGF β induce un aumento en el número de metástasis a la vez que modula propiedades in vitro relacionadas con la progresión tumoral. Objetivos: 1) Estudiar, en el modelo de células LP07, si la vía de señalización canónica gatillada por TGF β es bloqueada por un inhibidor de bajo PM capaz de impedir la activación del receptor de membrana T β RI, 2) Determinar el efecto de este inhibidor sobre la proliferación en monocapa, clonogenicidad y migración celular. Resultados: Demostramos que el tratamiento con 2 μ M del inhibidor bloqueó la señalización de la vía canónica de TGF β . Observamos que este compuesto redujo la fosforilación de Smad2 inducida por TGF β , llevándola a los valores basales a los 30 min de tratamiento (WB), y bloqueó la translocación al núcleo de la proteína Smad4 (IF). El compuesto logró revertir la inhibición de la proliferación en monocapa inducida por TGF β (p<0,05 TGF β vs Inhibidor + TGF β). Por otro lado, en relación con la capacidad de formar colonias en plástico, demostramos que el tratamiento con TGF β aumentó la capacidad clonogénica de las células LP07 con respecto a las células no tratadas (p<0,05): Este efecto fue parcialmente reducido por el inhibidor, aunque también se observó que el mismo redujo significativamente el número de colonias aún en ausencia de TGF β exógeno. Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor sólo disminuyó en forma significativa la migración basal de las células LP07 (p<0,05), mientras que TGF β fue incapaz de modular la capacidad migratoria de las

mismas. Conclusiones: Si bien el inhibidor de la vía de señalización de TGF β es capaz de bloquear la vía canónica en las células LPO7, muestra in vitro efectos biológicos per se que disminuyen la capacidad clonogénica y migratoria celular. Esto alienta su uso como antitumoral en experimentos in vivo.

702 (596) AUTOCRINE S100B SIGNALING IN ASTROCYTES IS MEDIATED BY RAGE RECEPTOR AND NFKB ACTIVATION. A Villarreal¹, A Gonzalez Torres¹, M F Angelo¹, R X Aviles Reyes¹, K Daigeneault², P Barker², A J Ramos¹

¹Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. Eduardo De Robertis; ²Montreal Neurological Institute-McGill University-Canada

S100B is secreted by astrocytes after traumatic or ischemic brain injury. Once released to the extracellular space, S100B has autocrine effects on astrocytes. In vitro, S100B induces cell division and secretion of pro-inflammatory molecules from astrocytes. RAGE expression is induced by hypoxia or cellular stress and has been shown to mediate S100B effects in different cell types. RAGE downstream signaling involves NFKB activation. The aim of this study was to analyze if the S100B effects on astroglial cells are mediated by RAGE and NFKB. Primary astrocytic cultures were exposed to different doses of S100B. S100B induced an increase in RAGE expression and activation of NFKB in a time and dose-dependent manner. NFKB activation was analyzed by p65 subunit nuclear localization and by a NFKB reporter plasmid. Using another set of reporter plasmids containing conserved sequences of RAGE promoter, we demonstrated that the proximal promoter was activated by S100B and that NFKB blockage abrogated that induction thus showing the NFKB role in the control of RAGE expression. Astroglial projections (number and complexity) were increased by S100B exposure and this effect was efficiently blocked by a NFKB inhibitor or partially inhibited by blocking anti-RAGE antibodies. Blocking RAGE signaling had a deleterious effect on cell morphology and cell survival. Our results demonstrate that S100B effects on astrocytes are mediated by RAGE and NFKB activation. Since S100B increases the expression of its own receptor RAGE, S100B has an efficient feed-forward mechanism to expand its effects from the site of release to the surrounding area.

703 (645) CHAPERONAS COMO DIRECCIONADORAS DE POLARIDAD DURANTE LA NEURITO-REGENERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE LINAJE NEURONAL. H R Quinta¹, M D Galigniana^{1,2}

¹IIBBA-CONICET; ²Departamento de Química Biológica-FCEN-UBA

El objetivo de este trabajo fue analizar el rol del heterocomplejo FKBP52-hsp90-p23 en la diferenciación y regeneración neuronal. En células indiferenciadas, ya sean líneas celulares de estirpe neuronal o cultivos primarios obtenidos de embriones murinos, hsp90 se recuperó asociada a la inmunofilina FKBP52 y a la co-chaperona p23. Este complejo co-localiza con lamina por debajo de la envoltura nuclear formando un anillo que se desensambla al gatillarse la diferenciación. Paralelamente, se observó que cúmulos intranucleares de hsp90 se transportaron al citoplasma localizándose con los centriolos en un polo de la célula, el que coincide con el del crecimiento axonal. La polimerización de tubulina fue simultánea a la redistribución citoplasmática del complejo. Se observó además que del cúmulo citoplasmático de hsp90 divergen microtúbulos y estructuras filamentosas asociadas a p23 (libres de hsp90), las que colocalizan con los microfilamentos que se extienden hacia las neuritas. Para evaluar si existen analogías entre la diferenciación y la regeneración axonal, se ensayó un protocolo in vitro en donde se seccionaron los axones de neuronas de hipocampo, a las que luego se trataron con el ligando de FKBP52, FK506. Las neuronas dañadas recapitulaban el proceso de formación de estructuras anulares de chaperonas asociadas a lamina y los procesos arriba descritos para la diferenciación, incluyendo la redistribución del heterocomplejo, la formación de cúmulos polarizados de hsp90 y el reordenamiento de los

microtúbulos. Durante este proceso de neurito-regeneración se observaron algunas características potencialmente funcionales de los axones regenerados como la aparición de "clusters" sinápticos. Estudios de transdiferenciación de astrocitos en neuronas mostraron que la activación de FKBP52 favorece que células precursoras se orienten a neuronas antes que a astrocitos. Se concluye que el complejo FKBP52-hsp90-p23 es crítico para la diferenciación y regeneración neuronal.

704 (30) DISTINTOS ANTIDEPRESIVOS USADOS EN LA CLÍNICA BLOQUEAN EL FLUJO AUTOFÁGICO Y AUMENTAN LA SENSIBILIDAD CELULAR A LA ACCIÓN TÓXICA DE AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS. M Rossi¹, E R Munarriz², S Bartsaghi³, M Milanese⁴, D Dinsdale³, M Guerra-Martin³, E T Bampton³, P Glynn³, G Bonnano⁴, R A Knight³, P Nicotera³, G Melino^{3,5}

¹New York University School of Medicine. ²Departamento de Biología, Universidad de Nueva York, USA. ³Unidad de Toxicología del MRC, Leicester, Reino Unido. ⁴Departamento de Medicina Experimental, Universidad de Genova, Italia. ⁵Departamento de Medicina Experimental, Universidad de Roma, Italia

La autofagia es un proceso altamente conservado en el cual porciones del citoplasma son secuestradas en vesículas de doble membrana llamadas "autofagosomas" y liberadas dentro del compartimento lisosomal para el reciclado de sus componentes. Este proceso juega un papel esencial en la adaptación al ayuno, a las condiciones ambientales cambiantes y a la remodelación celular durante el desarrollo. Por lo tanto no es sorprendente que alteraciones en el flujo autofágico estén asociadas con la aparición y progresión de diversas patologías. Sin embargo, a pesar del claro potencial terapéutico de moduladores farmacológicos del flujo autofágico, existen en la actualidad muy pocos ejemplos. En el presente estudio demostramos que diferentes antidepresivos interfieren con el flujo autofágico. El tratamiento de células con estos compuestos provoca un aumento significativo y específico en los niveles de marcadores autofagosómicos y una concomitante obstrucción de la degradación de la carga autofágica. Nuestras observaciones describen una nueva función para este grupo de compuestos que podría tener implicaciones terapéuticas fuera del campo de las enfermedades depresiva, en particular en el tratamiento de las células malignas que utilizan la vía autofágica para sobrevivir a condiciones de estrés. En este sentido mostramos que los antidepresivos aumentan la eficacia de la doxorubicina, un agente genotóxico usado en el tratamiento quimioterápico de una amplia variedad de cánceres. Por último, cabe señalar que los antidepresivos utilizados en este estudio son compuestos que han sido usado clínicamente durante muchos años, y existe una gran cantidad de información disponible acerca de su biodisponibilidad, toxicidad y dosis terapéuticas. Por lo tanto, su uso en el tratamiento de otras condiciones patológicas podría evitar uno de los principales escollos en el descubrimiento de nuevos fármacos, a saber obtener la aprobación para el uso clínico de nuevas entidades químicas.

705 (375) HETERODÍMEROS DE AT1R-D1R. ROL EN LA HIPERTENSIÓN RENAL. S Crambert¹, U Holtback¹, A Eklof¹, L A Di Ciano², E E Arrizurieta², F R Ibarra^{1,2}, A Aperia¹

¹Astrid Lindgren Childrens Hospital, Karolinska Institutet. ²Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, UBA

Los receptores tipo 1 de angiotensina II (AT1R) y de dopamina (D1R) forman heterodímeros. En estudios anteriores se mostró que los AT1R y D1R funcionan como una unidad de opuestos que podría intervenir en el ajuste del balance de sodio. El tratamiento de células de túbulo proximal y tejidos renales con ANG II produce una internalización rápida de D1R y bloquea sus señales intracelulares, (Khan F et al., AJP 2008; 295:F1110-6). En este trabajo estudiamos si un antagonista de AT1R, losartan (Los) afecta la función del complejo AT1R-D1R in vitro (tejidos renales de rata) e in vivo (ratas hipertensas). Para evaluar el efecto de Los

sobre la interacción AT1R-D1R se hicieron estudios de co-inmunoprecipitación. Tejidos de corteza renal superficial (250 μ m) se trataron con solución control (C) o Los 10-5 M. Posteriormente, los homogenatos se inmunoprecipitaron con sefarsosa-G y diferentes anticuerpos contra AT1R o D1R. El Los incrementó significativamente la fuerza de interacción de AT1R-D1R. Esto se visualizó en Western-blot como bandas más intensas de AT1R o D1R en inmunoprecipitados pretratados con Los vs C ($p < 0.05$). El co-tratamiento con SCH 23390 (SCH) 10-5 M (antagonista de D1R) atenuó significativamente el efecto de Los sobre la interacción AT1R-D1R. Luego se probó el efecto de Los solo o en combinación con SCH 23390 en un modelo de hipertensión renal en ratas. Las ratas se hacen hipertensas mediante la constricción de la aorta proximal a las arterias renales. La presión arterial media (PAM) en hipertensas fue 144 ± 3.8 mmHg. Losartan por vía oral (20 mg/kg/d) disminuyó la PAM a 105.4 ± 8.5 ($p < 0.05$). El efecto antihipertensor de Los fue significativamente reducido por el tratamiento simultáneo con SCH 1 mg/kg/d s.c. (126.8 ± 5.5 , $p < 0.05$ vs Los). Los resultados apoyan el concepto acerca de los AT1R y D1R trabajando como una unidad heterodimérica de opuestos y, particularmente, se podría considerar este hallazgo para el desarrollo de nuevas estrategias antihipertensoras

706 (808) TERAPIAS EMERGENTES EN ARTRITIS: TOLE- RIZACIÓN ORAL CON COLECALCIFEROL. D Goy¹, P Mortarino¹, N Acosta¹, D Abramson¹, J Toledo¹, A Palena Alfonso¹, N Fracalossi¹, L Sarrío¹, G Cointry¹, R Largo², G Herrero Beaumont², S Feldman¹

¹Facultad de Ciencias Médicas- UNR-Rosario Sta. Fe.

²Fundac Jimenez Diaz Universidad Autónoma de Madrid, España

Dado que células inmunes poseen receptores para vitamina D, investigamos si tratamiento oral con colecalciferol, 2000 UI/día (proD) sinergizaría proceso de tolerización oral con hidrolizados enzimáticos de colágeno 200 ml/día (L) en nuestro modelo de artritis inducida en conejos (A). 40 conejos New Zeland divididos en grupo control (C) y grupo A, se subdividieron según recibiesen durante 90 días, post-declaración del fenómeno inflamatorio articular: proD, (L), ambos tratamientos (proDL) o placebo (p). Se realizaron estudios: clínicos, incrementos diámetros femorotibiorotulianos (F), resonancia magnética (RM tiempo de adquisición 6 min), anticuerpos séricos IgG anti-OVA (ELISA) y anti-proteína citrulinada anti-Cit (IFI), debido a que en artritis ocurre citrulinización de proteínas, y anatomopatología membranas sinoviales. No hubo diferencias para ningún estudio entre subgrupos del grupo C. Todos los subgrupos de A incrementaron IgG anti-OVA a los 30 días post-2da sensibilización respecto a C ($p < 0.01$); 10 días posteriores a sensibilización intra-articular estudios clínicos mostraron inflamación y dolor en A, y no en C ($p < 0.001$); Al finalizar el tratamiento: dolor AproDL $<$ Al = AproD = Ap, ($p < 0.01$); para F, Ap $>$ que AproD, AproDL y AL ($p < 0.01$), RM para Ap mostró de moderado a severo derrame, y moderada tumefacción de tejidos blandos, diferenciándose levemente de los otros subgrupos ($p < 0.05$) y de C ($p < 0.01$). Sin diferencias significativas intergrupales, anti-Cit se incrementó en grupo A, respecto a C ($p < 0.01$), convalidando modelo experimental. Estudios anatomopatológicos mostraron disminución fenómenos inflamatorios en animales tratados: histopatología scorizada en cada una de las 3 membrana sinoviales de cada uno de los grupos seleccionadas al azar (score de íntima, estroma e infiltrado inflamatoria de 0 a 3 para cada estudio, Ap $>$ subgrupos A (< 0.01). Se aportan evidencias de potencial tratamiento emergente para la artritis sin efectos secundarios indeseables.

707 (23) RSUME AUMENTA LA SUMOILACIÓN Y MODULA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES. J Druker¹, J Gerez¹, T Rein², F Holsboer², E Arzt¹

¹Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA IFIByNE CONICET, 1428 Bs.As Argentina. ²Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania

La sumoilación es una modificación post-traducciona que regula la actividad del receptor de glucocorticoides (GR). El GR tiene tres sitios de sumoilación: Los dos primeros (K297/313) están localizados dentro de una secuencia conocida como synergy control motifs mientras que el tercer sitio está en el dominio de unión al ligando (LBD). La mutación K297/313R aumenta la actividad transcripcional del GR medida sobre promotores con múltiples elementos de respuesta a glucocorticoides. Nuestro grupo ha demostrado que RSUME (RWD-containing SUMOylation Enhancer) aumenta la sumoilación de proteínas. En este trabajo analizamos la acción de RSUME sobre la actividad transcripcional del GR. RSUME aumenta la actividad transcripcional del GR y de la mutante K297/313R medida por ensayos reporteros. RSUME aumenta la sumoilación del GR y este efecto no se observa con la mutante estructural de RSUME (Y61A/P62A), indicando que el dominio RWD de RSUME es esencial para esta función. Por otro lado, la mutante K297/313R es capaz de ser sumoilada en el tercer sitio, y RSUME también estimula dicha sumoilación. Ensayos de co-inmunoprecipitación demuestran que RSUME interacciona con el GR in vivo. Esta interacción fue confirmada por ensayos de pull-down: RSUME recombinante interacciona tanto con el GR y con la mutante K297/313R. Proponemos dos modelos no mutuamente excluyentes para explicar el efecto de RSUME: i) La sumoilación del GR en el tercer sitio podría tener un efecto positivo sobre la actividad transcripcional (efecto directo) y/o ii) RSUME aumenta la sumoilación de un co-regulador aumentando la actividad transcripcional del GR (efecto indirecto). Dado que RSUME regula la actividad del GR es posible considerarlo como un potencial blanco para modular respuestas fisiopatológicas o terapéuticas mediadas por el GR.

708 (687) PARTICIPACIÓN DE INTERLEUCINA 1 BETA, GELATINASAS Y SUS INHIBIDORES EN QUERATOPATÍA CLIMÁTICA ESFEROIDEA. T A Cafaro¹, P F Barcelona¹, M C Sanchez¹, J A Urrets-Zavalía², R Beuerman³, H M Serra¹

¹Facultad de Ciencias Químicas UNC CIBICI. ²Departamento de Oftalmología, Universidad Clínica Reina Fabiola UCC.

³Departamento de Oftalmología, Yong Loo Lin Escuela de Medicina, Universidad Nacional de Singapur

Queratopatía Climática (QPC) es una enfermedad de la córnea humana caracterizada por un progresivo velamiento, presente en individuos expuestos a condiciones ambientales desfavorables y de etiología desconocida. Debido a que metaloproteinasas (MMPs) son importantes en la degradación/remodelación del epitelio y estroma corneal decidimos investigar en pacientes con QPC niveles, activación, formas de MMP-2, -9 y su inhibidor TIMP-1; concentración de MMP-8; y diferentes citocinas involucradas en la regulación de MMPs. Se estudiaron lágrimas de 17 pacientes y 10 controles (C) sanos que viven en una zona rural de la Patagonia Argentina, y 5 controles sanos urbanos. Gelatinasas y TIMP-1 fueron estudiados por zimografía y Western blot; MMP-8 y citocinas mediante inmuno ensayo multiplex. Pro-MMP-9 y -2 se encontraron significativamente aumentados en QPC vs C (1337 ± 913 vs. 673 ± 425 UA, $p = 0,03$; y 82 ± 59 vs. 43 ± 16 UA, $p = 0,04$). El inhibidor TIMP-1 significativamente disminuido en QPC ($1,0 \pm 0,9$ vs. $2,0 \pm 1,8$ U/ μ l; $p = 0.03$). La MMP-8 encontrada en pacientes y C fue la forma derivada de neutrófilos y no hubo diferencias en los niveles totales de esta colagenasa (358 ± 362 vs 329 ± 363 μ g/L, $p = 0.47$). Sin embargo estos valores fueron 20 veces mayores a los hallado en lágrimas de individuos urbanos sanos ($15 \pm 3,6$ μ g/L). La concentración (pg/ml/mg) de IL-1b en QPC fue 4 veces mayor que en C ($55,84 \pm 14,71$ vs $12,18 \pm 6,46$ $p = 0.09$) y la de IL-8 2 veces superior en pacientes ($4818 \pm 2167,1$ vs 2500 ± 1262 $p = 0.08$). Así en QPC los niveles elevados de IL-1b estimulan la secreción de gelatinasas potenciando un proceso inflamatorio que dificulta la reparación corneal. Más aún el accionar de las gelatinasas se ve favorecido por los bajos niveles del inhibidor TIMP-1 en estos pacientes. Los niveles incrementados de IL-8, tanto QPC como C, explicarían la atracción de PMN y el aumento de MMP-8 en lágrimas de estos individuos rurales con el objeto de controlar el proceso inflamatorio.

FE DE ERRATAS

Este resumen corresponde a la **Mesa GENÉTICA 2 - MEDICINA REGENERATIVA 2** (pág. 156)

354b (385) - EXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS ESTIMULANTES DE LA HEMATOPOYESIS EN CÉLULAS MADRE MESENIQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO (hASC) SENSIBLES E INSENSIBLES A TGF- β . Rodríguez T.¹; Carrea A.²; Avedillo Díez I.³; López C.⁴; Perone M.⁵; Dewey R.⁶

Laboratorio de Terapia Génica y Células Madre, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), CONICET-UNSAM¹ 2; Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hannover Medical School, Alemania³; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN-UBA, IFIBYNE-CONICET⁵; <taniamr@intech.gov.ar>

Las células madre mesenquimales adultas provenientes de tejido adiposo (hASC) poseen rasgos comparables a las células madre mesenquimales de la médula ósea humana (BM-MSc), pero están menos caracterizadas. En vertebrados, el Factor de crecimiento Transformante β (TGF- β) afecta múltiples funciones biológicas, incluyendo la hematopoyesis. Las respuestas a TGF- β están mediadas fundamentalmente por receptores de superficie de tipo I (T β RI) y II (T β RII), los cuales se expresan en la mayoría de los tipos celulares. *In vitro*, las BM-MSc secretan facto-

res de crecimiento hematopoyético cuya producción se modifica en presencia de TGF- β 1. En las hASC, este mecanismo aun no ha sido estudiado en detalle. En este trabajo, estudiamos en hASC el efecto del TGF- β sobre la expresión génica de citoquinas estimulantes de la hematopoyesis en hASC mediante la inhibición de la cascada de TGF- β . Para ello, se generaron vectores lentivirales que codifican para el mutante dominante negativo (DN) A y B de T β RII y se transdujeron hASC *in vitro*. Posteriormente, se analizaron los perfiles de expresión de citoquinas estimulantes de la proliferación de células madre hematopoyéticas humanas como SCF, IL-6, TPO y Flt3-ligand (FL), en células sensibles e insensibles a TGF- β mediante RT-PCR semicuantitativa. Por primera vez hemos documentado que las hASC expresan SCF en sus dos variantes (soluble y unida a membrana), pero no expresan TPO. Además observamos que en hASC, TGF- β modula negativamente la expresión de SCF y FL ($p < 0.01$), y positivamente la de IL-6 ($p < 0.01$). Sorpresivamente detectamos que en las condiciones utilizadas, la modificación genética de hASC con vectores lentivirales conteniendo sólo GFP, altera significativamente ($p < 0.01$) los niveles de expresión de las citoquinas estudiadas. En conclusión, en hASC al igual que en BM-MSc, tanto el aporte autócrino como parácrino de TGF- β estaría modulando la producción de citoquinas estimulantes de la hematopoyesis.