

## RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

### PREMIO LEON CHERNY

#### 001. (301) ROL CRÍTICO DE BRCA1 COMO REGULADOR TRANSCRIPCIONAL EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

De Luca P.<sup>1</sup>; Zalazar F.<sup>2</sup>; Moiola C.<sup>3</sup>; Gueron G.<sup>4</sup>; Cotignola J.<sup>5</sup>; Vazquez E.<sup>6</sup>; De Siervi A.<sup>7</sup>

Laboratorio de Apoptosis y Cancer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Uba<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

<paoladeluca81@yahoo.com.ar>

La proteína co-reguladora de la transcripción, BRCA1, es fundamental en la modulación de la integridad genómica. Sin embargo, su función en la respuesta al daño al ADN está poco estudiada. El objetivo de este trabajo fue determinar el rol de BRCA1 en la respuesta al estrés genotóxico en células tumorales de próstata. Encontramos que la viabilidad de las células PC3 que sobre-expresan en forma estable la proteína BRCA1 disminuyó significativamente con respecto al control; con un concomitante incremento de la apoptosis y del porcentaje de células bloqueadas en fase S y G2/M. De este modo, el silenciamiento de la expresión de BRCA1 revirtió estos efectos. Identificamos nuevos genes blanco, involucrados en el ciclo celular y la respuesta al daño en el ADN, regulados por BRCA1: *BLM*, *FEN1*, *DDB2*, *H3F3B*, *BRCA2*, *CCNB2*, *GADD153* y *MAD2L1*. Focalizándonos en el factor de transcripción *GADD153*, comprobamos que BRCA1 se asocia al promotor de *GADD153* con mayor afinidad luego del daño en el ADN aumentando su transcripción. De este modo, determinamos que la sensibilidad a la doxorubicina inducida por BRCA1 es mediada por *GADD153*, ya que el silenciamiento de su expresión eliminó la inducción de la apoptosis y del porcentaje de células arrestadas provocada por la sobre-expresión de BRCA1. Tumores crecidos como xenógrafos derivados de las líneas estables PC3 con expresión o no de BRCA1, confirmaron nuestros hallazgos *in vivo*, revelando la función supresora tumoral de BRCA1 en cáncer de próstata.

Estos hallazgos definen un nuevo mecanismo a través del cual BRCA1 orquesta las decisiones celulares, en respuesta al estrés genotóxico, mediante el control transcripcional de *GADD153*. Clínicamente se puede predecir que los tumores de próstata con expresión de BRCA1 nula o reducida, serán más resistentes a la quimioterapia.

#### 002. (391) 15-DEOXY- $\Delta$ 12,14 PGJ2 (15D), LIGANDO NATURAL DE PPARGAMMA, MODULA LA RESPUESTA INFLAMATORIA CARDÍACA Y EL PARASITISMO EN RATONES INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI

Hovsepian E.<sup>1</sup>; Penas F.<sup>2</sup>; Mirkin G.<sup>3</sup>; Bartrons R.<sup>4</sup>; Goren N.<sup>5</sup>

CEFYO CONICET<sup>1 2 5</sup>; Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología Facultad de Medicina Uba<sup>3</sup>; Unitat de Bioquímica, Departament de Ciències Fisiològiques II, Campus de Ciències de la Salut, IDIBELL-Universitat de Barcelona<sup>4</sup>

eugehovsepian@yahoo.com.ar

La infección por *Trypanosoma cruzi* (*Tc*) produce respuesta inflamatoria en diversos tejidos incluyendo al corazón. La resolución de la inflamación cardíaca y el control del parasitismo serían críticos en la evolución de la enfermedad de Chagas. Si bien 15d,

ligando natural de PPAR $\gamma$ , fue implicado en la regulación de procesos inflamatorios, no se conoce su rol en esta enfermedad. Por ello, estudiamos los efectos de 15d sobre la respuesta inflamatoria en cultivos primarios de miocardiocitos de ratón infectados con la cepa RA de *Tc* (*rel* 1:5). Observamos mediante Western blot (Wb) y Q-RT-PCR (Q) que 15d (2uM) inhibe la expresión de óxido nítrico sintasa2 (NOS-2) y de metaloproteasas-2/9 (MMP-2/9) luego de la infección. Además 15d disminuye la liberación de NO (uM) (62 $\pm$ 3%; p<0.05) y la actividad de MMPs analizada mediante zimografía (Z). Además, el tratamiento con 15d aumenta el número de parásitos intracelulares (*Tc*:3.4 $\pm$ 0.32; *Tc*+15d:4.89 $\pm$ 0.50; p<0.05). Al silenciar PPAR $\gamma$  con ARN de interferencia, se revierte el efecto de 15d sobre expresión y actividad de NOS-2 (Wb,NO) y MMPs (Q,Z) y sobre el crecimiento intracelular de parásitos. Asimismo, demostramos mediante Wb la participación de Erk-MAPK y de NF-kB en los efectos de 15d. Estos resultados fueron confirmados en un modelo murino de infección con parásitos RA (1x10<sup>5</sup> i.p.) observando que el tratamiento con 15d (1mg/Kg, i.p.) inhibe la expresión (Wb) y actividad (Z) de MMP-2 en suero (79 $\pm$ 4%; p<0.05) y la expresión cardíaca de NOS-2 (Wb). Además, el tratamiento con 15d aumenta el número y tamaño de nidos de amastigotes en el corazón, la parasitemia (*Tc*:3.26x10<sup>6</sup> $\pm$ 0.32; *Tc*+15d:6.45x10<sup>6</sup> $\pm$ 0.50; p<0.05) y la mortalidad de ratones. También comprobamos que 15d inhibe la vía de NF-kB en el corazón de animales infectados mediante Wb y ensayos de movilidad electroforética (EMSA). Los resultados demuestran que 15d modula la inflamación cardíaca mediante vías dependientes de PPAR $\gamma$  y a través de Erk-MAPK y NF-kB, luego de la infección con *Tc*.

#### 003. (607) CARACTERIZACIÓN DE UN TRANSCRIPTO NOVEL DE CADHERINA EPITELIAL HUMANA Y EVIDENCIAS DE SU RELACIÓN CON CAMBIOS ASOCIADOS A LA PROGRESIÓN TUMORAL

Lapyckyj L.<sup>1</sup>; Matos M.<sup>2</sup>; Giustina S.<sup>3</sup>; Podhajcer O.<sup>4</sup>; Reventos J.<sup>5</sup>; Vázquez-Levin M.<sup>6</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CO-NICET-Uba)<sup>1 2 3 6</sup>; Instituto Leloir<sup>4</sup>; Unidad de Investigación de Hospital de Vall d'Hebron, Barcelona, España<sup>5</sup>

lapyckyj@dna.uba.ar

Cadherina epitelial (*cadE*) es miembro fundador de las cadherinas y media la adhesión celular. *cadE* es un **supresor tumoral**; su disminución/ausencia se asocia a cambios (**Transición-Epitelio-Mesenquimal, EMT**) que facilitan invasión/metástasis. Nuestro grupo identificó un **ARNm novel de *cadE* humana** generado por "splicing" alternativo (SA). Se lo llamó **cadEvar** para distinguirlo del salvaje (**cadEWT**). Se caracterizó *cadEvar* y evaluó su asociación con la progresión tumoral: 1) El ARNm *cadEvar* presentó una delección que da un cambio del marco de lectura y una señal de stop prematura; *cadEvar* sería un producto secretorio 2) Por qPCR se encontraron valores bajos de expresión de *cadEvar/cadEWT* en células tumorales/no tumorales, excepto ciertos casos 3) *cadEvar* estaría bajo control de NMD, con acumulación del ARNm en células incUBAdas con actinomicina-D 4) La transfección transiente de *cadEvar* dio una forma secretoria de 94KDa 5) Las transfectantes estables MCF7-*cadEvar* presentaron niveles de *cadEvar* hasta 40 veces superiores y de *cadEWT* hasta 10000 veces menores. En el medio condicionado se vio la forma de 94 KDa. Los niveles de ARNm de  $\beta$ -catenina aumentaron y la proteína localizó en el citoplasma. La actina se organizó en fibras de estrés. Las células presentaron fenotipo fibroblástico y bajo

contacto celular. Los marcadores de EMT Twist y Snail y cadN aumentaron. El ARNm de Dys aumentó >2000 veces y se detectó la proteína. La adhesividad celular (gota invertida) disminuyó; la motilidad (herida) y capacidad migratoria (transwell) aumentaron ( $p < 0,01$ ) 6). Las células MCF7-cadEvar produjeron tumores en ratones nude; el crecimiento tumoral aumentó ( $p < 0,02$ ) en el 1er pasaje y hubo mayor índice de mitosis ( $p < 0,001$ ) 7) La relación cadEvar/cadEWT aumentó en muestras de cáncer ovárico. *La caracterización de cadEvar y la evaluación de su efecto sobre cadEWT y proteínas relacionadas podrá contribuir a comprender la regulación molecular de la adhesión celular en condiciones normales/patológicas.*

**004. (691) EXPRESIÓN DE TRANSCRIPTOS ALTERNATIVOS DE LA P450AROMATASA (P450ARO) COMO MECANISMO REGULADOR DE LA PRODUCCIÓN DE ESTRÓGENOS EN TEJIDOS ESTEROIDOGÉNICOS HUMANOS.**

Pepe C.<sup>1</sup>; Saraco N.<sup>2</sup>; Sainz R.<sup>3</sup>; Baquedano M.<sup>4</sup>; Rivarola M.<sup>5</sup>; Belgorosky A.<sup>6</sup>  
*Servicio de Endocrinología Hospital de Pediatría J.P.Garrahan<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
*carolina\_marianap@yahoo.es*

P450Aro está codificada por el gen CYP19 (123 Kb en el humano). La región regulatoria (93 Kb) contiene 11 promotores, responsables de la expresión tejido específica. Se estudió una niña con características clínicas de déficit parcial de P450Aro. Se identificaron dos nuevas mutaciones puntuales,  $\Delta$ AGlu412X: delección de una adenina en el exón 9 (codón 412) que genera un corrimiento en el marco de lectura y la aparición de un codón de terminación prematuro, resultando en una proteína truncada inactiva; y c655G>A: que ocurre en el último nucleótido del exón 5, en la secuencia consenso dadora de splicing, con dos consecuencias posibles, el cambio de aminoácido GLU por LYS en el codón 210 (no afecta la actividad catalítica) o la retención del intrón 5 y la generación de una proteína truncada inactiva. Se halló que la exclusión del exón 5 ocurre normalmente en tejidos esteroideogénicos humanos (TEH) por un evento de splicing alternativo (SA) fisiológico, y que la mutación c655G>A se asocia a un aumento de esta exclusión durante el procesamiento del pre-ARNm de la P450Aro. La proteína carece de los aminoácidos 151-209, sería inactiva según estudios de modelado molecular y al expresarla en células Y1. Se propone que la mutación c655G>A alteraría un proceso de SA fisiológico disminuyendo la expresión de proteína con actividad enzimática. La ocurrencia de un pequeño porcentaje de splicing normal a partir del alelo portador de la mutación c655G>A explicaría la actividad aromatasa residual asociada al fenotipo de la paciente. La coexpresión de P450Aro y P450Aro<sup>E5</sup> en células Y1 sugiere que P450Aro<sup>E5</sup> podría regular fisiológicamente la actividad de P450Aro. Se demostró por primera vez que la expresión del transcripto P450AroINT resultante de la retención del intrón 9 se produce en TEH, sugiriendo que eventos de SA a nivel de la zona codificante del gen CYP19 podrían constituir un mecanismo general involucrado en la regulación de la actividad aromatasa en TEH.

**005. (823) EL COACTIVADOR RAC3 INHIBE LA AUTOFAGIA CONTRIBUYENDO AL DESARROLLO TUMORAL**

Fernandez Larrosa P.<sup>1</sup>; Alvarado C.<sup>2</sup>; Rubio M.<sup>3</sup>; Ruiz Grecco M.<sup>4</sup>; Micenmacher S.<sup>5</sup>; Martinez Noel G.<sup>6</sup>; Zwirner N.<sup>7</sup>; Costas M.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, IDIM-CO-NICET<sup>1 2 3 4 5 6 8</sup>, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME)<sup>7</sup>*  
*pabloferla@hotmail.com*

RAC3 se encuentra sobreexpresado naturalmente en diversos tumores, favoreciendo la tumorigénesis. A pesar de que RAC3 es un coactivador del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y tiene actividad anti-apoptótica, no se conoce si tiene la capacidad de modular la autofagia, mecanismo que actúa como supresor del desarrollo tumoral en etapas tempranas o favoreciéndolo en etapas tardías. Nuestro objetivo fue dilucidar si RAC3 puede modular la autofagia,

y estudiar el mecanismo por el cual la modula. Células HEK293 fueron transfectadas con vector vacío (VE) como control o con RAC3, RAC3 mutado en su etiqueta nuclear, o cotransfectadas IKBss (IKB super represor con capacidad de inhibir constitutivamente a NF- $\kappa$ B), e inclUBAdas en condiciones de ayuno por 6 hs. Las células con autofagosomas fueron detectadas por MDC o con RFP-LC3, y cuantificadas en un microscopio de fluorescencia. En ayuno, las células transfectadas con RAC3 mostraron autofagia en un 10%; mientras que con VE el porcentaje de células positivas fue del 70% ( $p < 0,01$ ). La transfección con RAC mutado o con RAC3/IKBss se asoció con niveles de autofagia del 35-30%. Para evaluar si la acción de RAC3 requiere de la actividad de kinasas, se inclUBAron las células transfectadas con RAC3 en condiciones de ayuno, en presencia o ausencia de inhibidores de kinasas. Sólo se observó una reversión en la inhibición con el tratamiento del inhibidor de p38<sup>MAPK</sup> (SB202190). Dado que en etapas tardías la autofagia es necesaria para el desarrollo del tumor, se evaluó si las condiciones de hipoxia modifican los niveles de RAC3, observándose que efectivamente esta condición conlleva a una disminución de su expresión. La sobreexpresión de RAC3 inhibe la autofagia independiente de su función nuclear, y requiere de la activación de p38<sup>MAPK</sup>. Por otra parte, el aumento de autofagia en el centro del tumor podría explicarse por la disminución de la expresión de RAC3 debido a la hipoxia.

**006. (616) FARMACOMODULACIÓN DE DIHIDROXICUMARINAS COMO POTENCIALES AGENTES ANTILEUCÉMICOS EN BÚSQUEDA DE MAYOR SELECTIVIDAD DE ACCIÓN CITOTÓXICA**

Vázquez R.<sup>1</sup>; Riveiro M.<sup>2</sup>; Vermeulen M.<sup>3</sup>; Gómez N.<sup>4</sup>; Farcorro G.<sup>5</sup>; Monczor F.<sup>6</sup>; Shayo C.<sup>7</sup>; Davio C.<sup>8</sup>  
*Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.<sup>1 4 6 8</sup>; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Buenos Aires.<sup>1 2 7</sup>; Laboratorio de Inmunología Oncológica, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.<sup>3</sup>; Cátedra de Física, Departamento de Físico-Matemática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.<sup>5</sup>*  
*<ramirobioq@hotmail.com*

La identificación y optimización de una molécula líder constituyen las fases iniciales en el desarrollo de un fármaco. Previamente identificamos a la 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (1) como compuesto líder dada su actividad apoptótica en células leucémicas U-937, atribuida a su capacidad generadora de radicales libres (RL) y activación de JNK, y describimos su toxicidad selectiva por células leucémicas en relación a monocitos normales. En esta etapa, aplicando distintos criterios de farmacomodulación, proponemos estudiar la contribución del núcleo cumarínico (NC) a la actividad biológica de (1). Se emplearon  $\alpha$ -pironas y derivados del ácido cinámico como representantes del anillo  $\delta$ -lactona y bencénico, respectivamente, del NC. Ensayos de viabilidad celular (incorporación de 3H-timidina y tinción con Azul Tripán) y estudios de actividad apoptótica (anexina por citometría de flujo, actividad de de caspasa 3 por ensayo colorimétrico y clivaje de PARP y pro-caspasa 3 por WB) muestran que las cumarinas son más activas respecto a los compuestos que presentan partes del NC. Dado que las cumarinas activas fueron las únicas en mostrar generación RL (resonancia paramagnética electrónica), esta capacidad sería importante en la inducción de apoptosis en células U-937. Por otra parte, los derivados del ácido cinámico resultaron más tóxicos en linfocitos y monocitos que en células leucémicas. Estos resultados señalan la importancia del NC en la potencia y selectividad de acción de estas drogas. La menor actividad de (1) en monocitos podría deberse a que éstos presentan la proteína p21 en citoplasma. Reportes indican que p21 inhibe la actividad apoptótica de drogas generadoras de RL que actúan por la vía de JNK. Células U-937 transfectadas con una forma citoplasmática de p21 tratadas con (1) no mostraron actividad apoptótica. De esta forma, proponemos un mecanismo de acción para (1) en células U-937 que asimismo explicaría la toxicidad selectiva de ésta.

## PREMIO PATRICIO COSSIO

**007. (175) ESTUDIO FARMACOGENÉTICO EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFoblástica AGUDA: TIOPURINA METILTRANSFERASA, METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y GLUTATIÓN-S-TRANSFERASAS**

Aráoz H.<sup>1</sup>; Celis Passini V.<sup>2</sup>; D'Alói K.<sup>3</sup>; Foncuberta M.<sup>4</sup>; Rocco C.<sup>5</sup>; Alonso C.<sup>6</sup>; Rubio P.<sup>7</sup>; Felice M.<sup>8</sup>; Chertkoff L.<sup>9</sup>  
Hospital de Pediatría Prof Dr. J. P. Garrahan<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
veritoaraoz@gmail.com

Las enzimas MTHFR, TPMT y GSTs participan en el metabolismo de drogas utilizadas en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) en pediatría. Diferencias en su actividad podrían modular la respuesta a agentes antineoplásicos, como 6-mercaptopurina, metotrexato (MTX) o esteroides. El objetivo del trabajo fue evaluar la influencia de variantes genéticas frecuentes en los genes de MTHFR, TPMT y GSTs en la respuesta al tratamiento de LLA: eficacia y toxicidad. Pacientes y métodos: Se estudiaron 324 niños con LLA tratados con dos protocolos basados en las estrategias del grupo BFM. Las variantes TPMT\*3A, \*3B, \*3C, \*2 para el gen TPMT, C677T y A1298C para MTHFR, y las variantes en GSTP1, M1 y T1 se identificaron por PCR-RFLP o PCR alelo específica. Se evaluó toxicidad según criterios de la OMS. La asociación entre toxicidad y genotipos se analizó por *Test* exacto 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/m<sup>2</sup>/día de MTX y tenían al menos un alelo T677 en el gen MTHFR, mostraron mayor riesgo al desarrollo de neutropenia severa en la fase de consolidación (p=0.001). En los pacientes que recibieron 5gr/m<sup>2</sup>/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/m<sup>2</sup>/día (23% vs 15%). El análisis de pSLE ajustado por grupo riesgo, reveló que los pacientes con genotipo TT677 mostraban riesgo reducido de presentar evento (p=0.025). Esta diferencia se mantuvo en el grupo GR intermedio (p=0.029). Con respecto a las variantes de TPMT y GSTs, no se observó influencia significativa en la toxicidad y eficacia del tratamiento. Conclusión: La variante genética C677T del gen MTHFR sería un factor relevante para la pSLE y toxicidad en pacientes que reciben 2g/m<sup>2</sup>/día MTX.

**008. (422) ESTUDIO LONGITUDINAL DE MARCADORES DE PROGRESIÓN EN PACIENTES CON POLIQUISTOSIS RENAL AUTOSOMICA DOMINANTE (ADPKD) CON FUNCION RENAL CONSERVADA.**

Azurmendi P.<sup>1</sup>; Fraga A.<sup>2</sup>; Erlic Z.<sup>3</sup>; Santelha Stefan J.<sup>4</sup>; Valdez M.<sup>5</sup>; Arrizurieta E.<sup>6</sup>; Neumann H.<sup>7</sup>; Martin R.<sup>8</sup>  
Instituto Lanari<sup>1</sup>; IIM Alfredo Lanari, Uba-CONICET<sup>2 3 4 5 6</sup>,  
Alfred Ludwigs University, Freiburg, Alemania<sup>7</sup>; Lim Alfredo Lanari, UBA-CONICET; Hosp. Universitario, Universidad Austral<sup>8</sup>  
pazurmendi@lanari.fmed.uba.ar

Si bien se considera que el genotipo *PKD1* o *PKD2* heredado es el mayor determinante de la progresión en ADPKD, la búsqueda de parámetros -además del volumen renal total (VRT)- para evaluarla en etapas en que el filtrado glomerular (FG) se encuentra conservado, es hoy materia de debate. Hemos descripto previamente que la proteína quimioatrayente de monocitos-1 urinaria (MCP-1) y la albuminuria (UACR) pueden ser marcadores precoces de progresión. La UACR > 6,8 mg/gCr (UACRa) se asocia a altos niveles de MCP-1 y riesgo de aterosclerosis subclínica, comparado con UACR ≤ 6.8 (UACRn). Con el objetivo de investigar longitudinalmente la interacción entre VRT, FG y MCP-1 y si UACR podría determinar un curso diferente de la enfermedad, presentamos un estudio longitudinal de 32 pacientes jóvenes (26 ± 1 años) con genotipo *PKD1* seguidos por 30 ± 1 meses. Se encontró asociación en el cambio anual de VRT (medido por ecografía), FG (calculado por MDRD) y MCP-1 (ELISA) independientemente de sus valores al inicio del estudio, UACR y otras variables (edad, sexo, tratamiento antihipertensivo). Los cambios anuales de VRT

y MCP-1 fueron más altos en UACRa (131 ± 33 ml/min y 108 ± 49% anuales, respectivamente) respecto a UACRn (48 ± 41 y -5 ± 16, respectivamente). El cambio anual de FG no fue diferente según UACR, manteniéndose estable en los pacientes tratados con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I (3 ± 5 ml/min/año) respecto de los normotensos no tratados (-5 ± 2). Siendo VRT y MCP-1 indicadores respectivos del componente quístico e inflamatorio renal, los resultados indicarían el compromiso de ambos procesos en la progresión aún cuando el FG se encuentra en valores normales. De confirmarse estos hallazgos, la UACRn podría ser predictor de una mejor evolución.

## PREMIO IRENE FARYNA DE RAVEGLIA

**009. (78) ANALISIS MOLECULAR DE HIPOTIROIDISMOS POR DEFECTO EN LA BIOSINTESIS DE TIROGLOBULINA. IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE SITIOS CRITICOS DE "SPLICING" EN EL GEN DE LA TIROGLOBULINA HUMANA**

Citterio C.<sup>1</sup>; Ciria Abad S.<sup>2</sup>; Olcese M.<sup>3</sup>; Belforte F.<sup>4</sup>; Varela V.<sup>5</sup>; Machiavelli G.<sup>6</sup>; González-Sarmiento R.<sup>7</sup>; Rivolta C.<sup>8</sup>; Targovnik H.<sup>9</sup>  
Laboratorio de Biología Molecular Cátedra de Genética y Biología Molecular Universidad de Buenos Aires<sup>1 3 4 5 6 8 9</sup>,  
Unidad de Medicina Molecular Departamento de Medicina Facultad de Medicina Universidad de Salamanca<sup>2 7</sup>  
cintia\_citterio@hotmail.com

La tiroglobulina (TG) es una glicoproteína homodimérica de 660 kDa secretada por el tirocito a la luz folicular, donde funciona como matriz para la biosíntesis de hormonas tiroideas. Es codificada por un gen de copia única, de 270 kb que mapea en el cromosoma 8q. Mutaciones en el gen de la TG producen bocio congénito con hipotiroidismo originando fenotipos variables. El objetivo de este trabajo es analizar nuevos mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de los mismos. Se secuenciaron los 48 exones del gen de la TG de cuatro pacientes con hipotiroidismo y defecto de la TG. Se identificaron 6 nuevas mutaciones (g.IVS6+1G>A, p.Q717X, p.S1203L, p.I1244fsX1246, p.R1251C, g.IVS19+3\_4delAT) y 1 mutación previamente identificada (p.R277X), constituyendo 3 nuevos compuestos heterocigotas: p.R277X/p.Q717X, p.I1244fsX1246/g.IVS19+3\_4delAT y g.IVS6+1G>A/p.S1203L/p.R1251C. Se construyeron minigenes para el estudio de los efectos de las mutaciones g.IVS6+1G>A y g.IVS19+3\_4delAT. La transcripción "in vitro" muestra que el exón 6 es excluido parcialmente o por completo cuando la mutación g.IVS6+1G>A está presente. La exclusión del exón 6 entero predice una proteína de 200 aminoácidos con un cambio del marco de lectura y un codón de terminación prematuro (CTP) en el exón 7. La retención parcial del exón 6 predice una proteína de 382 aminoácidos con un cambio de marco de lectura y un CTP en el exón 9. Por otra parte, el análisis del minigen que contiene la mutación g.IVS19+3\_4delAT incluye solo los primeros 57 nucleótidos del exón 19, originando un CTP en el exón 20. En conclusión, el presente trabajo permitió comprender los defectos estructurales y funcionales de las proteínas mutadas contribuyendo a su vez al conocimiento básico de la maquinaria de "splicing" de la TG. Adicionalmente y por primera vez se identificaron mutaciones inactivantes de la TG (p.I1244fsX1246/g.IVS19+3\_4delAT) en un hipotiroidismo con tiroides de tamaño y posición normal.

**010. (105) REGULACION DE LA FUNCION ENDOTELIAL POR ESTEROIDES SEXUALES**

Cutini P.<sup>1</sup>; Campelo A.<sup>2</sup>; Rauschemberger M.<sup>3</sup>; Sandoval M.<sup>4</sup>; Massheimer V.<sup>5</sup>  
Cátedra de Bioquímica Clínica II. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca; CONICET<sup>1 2 3 5</sup>; Cátedra de Bioquímica Clínica II. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca; Unidad Básica Química, Dto. Ciencias Básicas, UTN-Facultad Regional Bahía Blanca<sup>4</sup>  
pcutini@uns.edu.ar

El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de progesterona (Pg), testosterona (T) y estrona (E1) sobre la función endotelial en cultivos primarios de células endoteliales (CE) murinas. La adhesión de leucocitos y el aumento de la apoptosis son respuestas endoteliales típicas a la injuria vascular. Para evaluar la acción hormonal sobre la adhesión de monocitos (Amf) se los adicionó a CE tratadas con los esteroides en presencia o ausencia de LPS (inductor de adhesión). E<sub>1</sub> inhibió la Amf (21±2,5 vs 15±1,1 cel/cpo, C vs E<sub>1</sub>, p<0,01). La adhesión inducida por el LPS se bloquea en presencia de Pg ó E<sub>1</sub> (23±2,9;37±3;25±2.1;27±2.2 cel/cpo; C, LPS, E<sub>1</sub>+LPS, Pg+LPS, p<0,01). Como la Amf depende de puentes entre proteínas de superficie de CE (ICAM-1) e integrinas de los mf, se estudió el efecto de E1 sobre la expresión del ARNm de ICAM-1 en CE tratadas con E<sub>1</sub> y LPS. E<sub>1</sub> disminuyó su expresión respecto al control y revirtió el aumento inducido por LPS. En mf, la expresión de las integrinas CD11b, CD11c y CD18 (citometría de flujo), disminuyó en 53, 38 y 39% respecto al control (p<0,01) y se revirtió el estímulo de LPS en los tratamientos con E<sub>1</sub>. Se usó el ensayo de fragmentación de ADN para estudiar la apoptosis de CE. Si bien E<sub>1</sub> o Pg evidenciaron un efecto proapoptótico (7,42;38% ADN fragm/total; C,Pg,E1; p<0,05), el progestágeno fue capaz de atenuar el efecto apoptótico del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (88; 46% ADN fragm/total; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;Pg+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; p<0,02) mientras que el tratamiento con E1 no lo alteró. Al evaluar la producción de vasoactivos observamos que, si bien Pg, T y E1 estimulan la síntesis de óxido nítrico (NO) en CE (83%, 94%, 85%, Pg 10 nM, E<sub>1</sub> 10 nM, T 1 nM s/c p<0,001), la acción individual de cada esteroide se modifica en tratamientos hormonales conjuntos (Pg+T; E1+Pg). El NO generado del tratamiento hormonal inhibió la activación y agregación plaquetaria. Los resultados presentados evidencian que la función endotelial es blanco de la acción de los esteroides ováricos.

**011. (448) LA APOPTOSIS DE LACTOTROPOS INDUCIDA POR DOPAMINA, ES MEDIADA POR LA ACTIVACIÓN DE LA ISOFORMA CORTA DEL RECEPTOR D2.**

Radl D.<sup>1</sup>; Ferraris J.<sup>2</sup>; Botti V.<sup>3</sup>; Sellicovich A.<sup>4</sup>; Sarkar D.<sup>5</sup>; Piserá D.<sup>6</sup>  
*Instituto de Investigaciones en reproducción, Facultad de Medicina UBA*<sup>1 2 3 4 6</sup>; *Rutgers Endocrine Program, Department of Animal Sciences, Rutgers University*<sup>5</sup>  
 dradl@fmed.uba.ar

La dopamina (DA) es el principal regulador de la función de los lactotrofos. Hemos descripto que la DA induce apoptosis de lactotrofos de manera dependiente de estradiol. También observamos que la sulpirida, un antagonista del receptor D2 (D2R), inhibe la apoptosis inducida por DA, indicando que la activación del D2R está involucrada en la acción proapoptótica de esta catecolamina. Existen dos isoformas del D2R, una isoforma larga (D2L) y una corta (D2S). Si bien ambas se expresan en la adenohipófisis, D2S ha sido involucrada en la disminución de la proliferación de lactotrofos. Por otro lado, estas isoformas se acoplan a proteína Gi diferentes y las vías que llevan a la activación de MAPK son distintas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de las isoformas de D2R en la apoptosis de lactotrofos y la participación de p38 MAPK en esta acción. Células PR1, una línea de lactotrofos que no expresa D2R, fueron transfectadas establemente con un vector de expresión conteniendo ADNc que codifica para D2L, D2S o el vector vacío (V), e incubadas con o sin 17 $\alpha$ -estradiol (E2, 1 nM) por 48 h y con DA (1  $\mu$ M) por 4 h. La apoptosis fue determinada a través de TUNEL. La DA indujo apoptosis sólo en las células que expresan D2S cuando éstas fueron incubadas con E2, (CONTROL: 3.13% vs DA: 1.8% ns Chi<sup>2</sup>; E2: 4%; E2DA: 7.57% p<0.01 Chi<sup>2</sup>). Para estudiar el rol de p38 MAPK en la apoptosis inducida por DA, células PR1 D2S fueron incubadas con un inhibidor de p38, SB203850. El SB203850 inhibió la apoptosis inducida por DA (E2: 0.48% vs E2DA: 1.9% p<0.01  $\chi^2$ ; E2SB 0.12% vs E2DASB 0.41%, ns Chi<sup>2</sup>). El análisis de la fosforilación de p38 por western blot indicó la activación de esta quinasa por DA. Estos resultados sugieren que, en presencia de E2, la DA induce apoptosis de lactotrofos a través de su interacción con el receptor D2S. Además, la activación de p38 MAPK estaría involucrada en el efecto proapoptótico de la DA.

**012. (469) 17 $\beta$ -ESTRADIOL ACTÚA COMO MODULADOR DE LA SECRECIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS LACTOTROPAS INDUCIDA POR TRH Y FGF 2: PARTICIPACIÓN DE REÁ INTRACELULARES Y DE MEMBRANA.**

Sosa L.<sup>1</sup>; Gutiérrez S.<sup>2</sup>; Pettiti J.<sup>3</sup>; Palmeri C.<sup>4</sup>; Mascanfroni I.<sup>5</sup>; Soaje M.<sup>6</sup>; Pellizas C.<sup>7</sup>; De Paul A.<sup>8</sup>; Torres A.<sup>9</sup>  
*Centro de Microscopía Electrónica-Facultad de Ciencias Médicas-UNC*<sup>1 2 3 4 8 9</sup>; *Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas-UNC*<sup>5 7</sup>; *Laboratorio de reproducción y lactancia, IMBECU-CONICET, Mendoza*<sup>6</sup>  
 ldvsosa@gmail.com

Las acciones genómicas y no genómicas del 17 $\beta$ -estradiol (E2) son mediadas por receptores estrogénicos (RE)  $\alpha$  y  $\beta$  citoplasmáticos/nucleares y de membrana. El objetivo fue estudiar la modulación del E2 en interacción con TRH o FGF2 sobre la actividad secretoria y proliferativa de células lactotropas, mediada por efectos rápidos y genómicos del E2, analizando la participación de los RE $\alpha$  y las vías de señalización involucradas. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra fueron tratados con: E2 (10nM); E2-BSA (forma impermeable a membrana, 10nM); PPT (agonista del RE $\alpha$ , 10nM) solos o combinados con TRH (10nM) por 30 min para evaluar efectos rápidos sobre la secreción de PRL cuantificada por RIA; o combinados con FGF2 (0,6nM) por 4h para analizar efectos genómicos sobre la proliferación de lactotropas por detección inmunocitoquímica de BrdU y PRL. El RE $\alpha$ m fue detectado por citometría de flujo (CF) en células no permeabilizadas y PRL en células permeabilizadas. Se emplearon inhibidores de: PI3K (LY294002 10  $\mu$ M); MEK (PD98059 100  $\mu$ M) y RE (ICI 182780 100nM). La activación de p85 $\alpha$  fue visualizada por microscopía confocal. La expresión de Akt y ERK1/2 total y fosforilada y de PKC $\epsilon$  fue determinada por WB. Estadística: ANOVA-Fisher. La estimulación de E2/TRH produjo una mayor intensidad de RE $\alpha$ m en lactotropas por CF. A tiempos cortos todos los factores incrementaron la secreción de PRL alcanzando los niveles más altos con E2-BSA/TRH, en correlación con la activación de p85 $\alpha$  y Akt. La liberación de PRL fue inhibida por ICI y LY. En la evaluación de efectos genómicos, E2/FGF2 y PPT/FGF2 aumentaron la actividad mitogénica de lactotropas (p<0,01), induciendo la expresión de PKC $\epsilon$  y ERK1/2. La proliferación de lactotropas fue bloqueada por ICI y PD. Los resultados revelan una acción cooperativa del E2 con TRH o FGF2 sobre la secreción de PRL y la proliferación de lactotropas activando vías en común a ambos factores, con la participación de los RE $\alpha$  de membrana e intracelulares.

**PREMIO CAMILION DE HURTADO**

**013. (253) SILENCIAMIENTO DEL INTERCAMBIADOR SODIO/HIDRÓGENO (NHE1) EN CORAZÓN DE RATÓN CON SI RNA DESNUDO.**

Correa M.<sup>1</sup>; Pérez N.<sup>2</sup>; Cingolani H.<sup>3</sup>; Morgan P.<sup>4</sup>  
*Centro de Investigaciones Cardiovasculares; Facultad de Ciencias Médicas; UNLP*<sup>1 2 3 4</sup>  
 mavecorrea@hotmail.com

Diversas patologías cardíacas se han asociado con hiperactividad del NHE1, por lo que el bloqueo de su función podría ser de gran utilidad terapéutica. En este trabajo se generó *in vitro* un siRNA para reducir específicamente la expresión del NHE1 (siRNA<sub>NHE1</sub>). Como control se usó un siRNA con la misma secuencia pero organizada de manera aleatoria (siRNA<sub>SCR</sub>). La efectividad del método se estudió en células HEK293 co-transfectadas con una cantidad constante de NHE1 cDNA (1.6  $\mu$ g) y cantidades crecientes de siRNA<sub>NHE1</sub>: 0, 1, 4, 10, 40 o siRNA<sub>SCR</sub> 4  $\mu$ g. Luego de 48 h las células fueron lisadas y la expresión del NHE1 (immunoblots) fue, respectivamente: 100; 52.5±3.8; 31.7±3.6; 19.7±3; 9.6±4.9 y 87.9±20.3 % (n=3-5, p<0.05 siRNA<sub>NHE1</sub> 1, 4, 10 y 40 vs siRNA<sub>SCR</sub>; ANOVA). Luego, inyectamos siRNA<sub>NHE1</sub> (20  $\mu$ g) en un único lugar de la pared antero-lateral del ventrículo izquierdo de

ratones, los que se sacrificaron luego de 48-72 hs, se les extrajo el corazón y se midió expresión proteica (immunoblots). De los mismos corazones se disecaron músculos papilares de ventrículo izquierdo en los que se evaluó la actividad del NHE1 mediante la recuperación del pH<sub>i</sub> luego de una carga ácida en un medio libre de bicarbonato para garantizar que la recuperación del pH<sub>i</sub> fuera debida sólo al NHE1. La expresión del NHE1 en lisado de ventrículos con siRNA<sub>NHE1</sub> se redujo a un 33.± 3% (n=5) vs siRNA<sub>SCR</sub> (100 ± 11%, n=5) (p<0.05). En contraste, la expresión de NHE1 en hígado de los mismos animales no se alteró significativamente entre siRNA<sub>SCR</sub> (100±14%, n=3) y siRNA<sub>NHE1</sub> (94±20%, n=3). Los músculos papilares de corazones inyectados con siRNA<sub>NHE1</sub> mostraron una reducción de la actividad del intercambiador durante la recuperación de la acidosis en comparación con siRNA<sub>SCR</sub> ( $-\text{dpHi}/\text{dt}$ : 0.021±0.01 vs 0.132±0.01 pH/min, n=4, P<0.05). Concluimos que la inyección de siRNA<sub>NHE1</sub> en un único lugar del miocardio es suficiente para reducir la expresión del NHE1 y silenciar su función.

#### 014. (333) INFLUENCIA DE LA DISFUNCIÓN TIROIDEA SOBRE LOS EFECTOS CARDIOVASCULARES DEL ÓXIDO NÍTRICO ASOCIADOS A LA EDAD.

Sarati L.<sup>1</sup>; Martínez C.<sup>2</sup>; Artes N.<sup>3</sup>; Balaszczuk A.<sup>4</sup>; Fellet A.<sup>5</sup>

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
<ivonnesarati@hotmail.com

**Objetivo:** determinar si el sistema del óxido nítrico (NO) está diferencialmente regulado por las hormonas tiroideas en el sistema cardiovascular en animales jóvenes y adultos. **Materiales:** se utilizaron ratas macho eutiroides (E), hipertiroideas (H) e hipotiroideas (h) de 2 y 12 meses de edad. Se monitoreó la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC). Se evaluó la actividad de la NO sintasa (NOS, pmol/g.h) (técnica conversión arginina marcada) y los niveles proteicos de las isoformas i-NOS, e-NOS, n-NOS (técnica Western-blot) en aurícula derecha (Au), ventrículo izquierdo (V) y arteria aorta (Ao). Los resultados se expresan como X ± ESM, n=9 cada grupo. Se realizó análisis de la varianza de una variable (ANOVA) seguido de un test de Tukey-b para múltiples variables y la prueba T2-Tamhane. \*P<0,05 vs E, #p<0.05 vs 2 meses.

Edad (meses)	E 2	H 2	h 2	E 12	H 12	h 12
TSH (ng/ml)	14,75±0,83	5,52±0,07*	35,57±4,35*	2,47±0,25#	0,79±0,23*#	7,75±0,13*#
Peso (g)	337±12	298±15	301±11	562±8#	525±28#	543±10#
PAM (mmHg.)	91±2	78±1*	74±1*	63±1#	65±1#	56±1*#
FC (lpm)	346±1	422±1*	211±1*	303±1#	324±1*#	200±1*#
Au (pmol/g.h)	20216±611	1468±300*	289±150*	5081±300#	1581±150*	1469±205*#
V (pmol/g.h)	148±70	2151±68*	2466±134*	1627±100#	2561±46*#	4402±177*#
Ao (pmol/g.h)	1782±70	3365±195*	2011±60*	162±60#	396±55*#	541±40*#
e-NOS Au (UA)	2,04±0,08	1,98±0,03	1,76±0,04*	0,39±0,03#	0,43±0,02#	0,88±0,02*#
i-NOS Au (UA)	2,20±0,01	2,06±0,04	1,91±0,02*	0,33±0,04#	0,56±0,08#	0,57±0,02*#
n-NOS Au (UA)	1,35±0,02	1,09±0,02*	0,94±0,02*	0,68±0,02#	0,61±0,02*#	0,63±0,03#
n-NOS V (UA)	0,83±0,03	0,74±0,03	0,81±0,03	0,32±0,03#	0,35±0,05#	0,23±0,02#
e-NOS Ao (UA)	0,80±0,05	0,96±0,06	0,84±0,07	0,48±0,06#	1,01±0,08*	0,87±0,04*
i-NOS Ao (UA)	0,56±0,07	0,71±0,05	0,78±0,04	1,03±0,03#	1,45±0,02*#	1,00±0,01

Las hormonas tiroideas modularían la función cardiovascular a través de una vía alternativa diferente al aumento de la sensibilidad β-adrenérgica que involucraría al sistema del NO de manera diferente según el tejido examinado. La acción que ejercen las hormonas sobre los β receptores tendría mayor relevancia en la Au. Contrariamente, en el V a Ao predominarían los efectos de las hormonas tiroideas sobre el NO. La edad atenuaría la respuesta de la función cardiovascular ante la afección tiroidea.

#### 015. (355) ROL DE LA PROTEÍNA FIJADORA DE AMPc (EPAC) EN LA CONTRACTILIDAD DE MIOCITOS CARDÍACOS

Lucotti L.<sup>1</sup>; Noelia L.<sup>2</sup>; Mundiña-Weilenmann C.<sup>3</sup>

Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1</sup>; Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-CONICET La Plata, Facultad de Ciencias Médicas (UNLP)<sup>2 3</sup>  
ignaciolucotti@hotmail.com

En el corazón, el AMPc es un regulador clave en la contracción, relajación y automatismo. Si bien sus efectos se relacionan principalmente con la activación de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA), nuevos efectores de este segundo mensajero han sido descubiertos. Las Epac son proteínas que se activan por unión al AMPc e intercambian nucleótidos de guanina en las proteínas Rap. El impacto funcional de su activación en miocitos aislados es controversial. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de un activador selectivo de Epac, 8-(4-clorofenil)-2'-O-metiladenosina-3'-5'-monofosfato cíclico (8-CPT), sobre la contractilidad y el manejo del calcio intracelular en miocitos aislados de rata adulta. Para ello registramos simultáneamente los cambios en la longitud del sarcómero y el calcio intracelular en miocitos cargados con Fura2-AM estimulados a 0.5Hz antes y después del tratamiento con 10 μM 8-CPT. 8-CPT no produjo cambios en la longitud de reposo del sarcómero pero sí en el acortamiento (de 7,84±1,09 a 2,63±1,42 expresado como % de la longitud de reposo del sarcómero, n=4 p<0,05). Esto se correlacionó con una disminución de la amplitud del transitorio de calcio, estimado como la diferencia entre el pico y la línea de base de la relación de fluorescencia 340/380 (100±4.81 a 71.75±10.26% del basal luego del tratamiento con 8-CPT, n=4 p<0,05). La constante de tiempo (Tau) de la relajación del sarcómero y de la caída del transitorio de calcio, fue significativamente mayor en presencia de 8-CPT, indicando un enlentecimiento de la remoción del calcio intracelular durante la relajación. Los resultados indican que la activación de Epac tiene un efecto inotrópico negativo que podría explicarse por un manejo alterado del calcio intracelular y sugieren un rol inhibitorio de Epac sobre las proteínas que manejan el calcio intracelular. Este efecto del AMPc sobre Epac podría co-existir con la estimulación de PKA durante la estimulación beta-adrenérgica en el miocardio.

#### 016. (417) PARTICIPACION DE LA VIA PI3K/AKT/GSK-3B EN LA DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO DEL INFARTO MEDIADA POR EL PRE Y POSTACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN RATAS HIPERTENSAS ESPONTÁNEAS (SHR)

Pérez Núñez L.<sup>1</sup>; González Arbeláez L.<sup>2</sup>; Fantinelli J.<sup>3</sup>; Mosca S.<sup>4</sup>

Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1 2 3 4</sup>  
i.a.p.n@hotmail.com

Estudios recientes en animales normotensos muestran que la enzima glucógeno sintetasa cinasa 3β (GSK-3β) fosforilada en Ser 9 a través de la PI3K/Akt impide la apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (PTM). Nuestro objetivo fue determinar la participación de la vía PI3K/Akt/GSK-3β en el pre (PI) y postacondicionamiento isquémico (PCI) en SHR. Los corazones aislados y perfundidos por el sistema de Langendorff fueron asignados a los siguientes grupos: 1) Control no isquémico(C): perfusión durante 105 min; 2) Control isquémico (CI): 45 min de isquemia global (IG) y 1 hora de reperusión (R); 3) PI: se aplicó un ciclo de 5 min de IG y 10 min de R previo a la IG de 45 min; 4) PCI: se aplicaron 3 ciclos de 30 seg de IG y 30 seg R al inicio de la R. Al final de R se determinó el tamaño del infarto (TI) mediante la tinción con trifeniltetrazolio y el contenido de Akt y GSK-3b fosforiladas, por western blot. El TI fue de 51 ± 4% en el grupo CI y disminuyó significativamente con ambas intervenciones (PI: 34 ± 1%; PCI: 37 ± 4%). La expresión de ambas cinasas fosforiladas disminuyó significativamente en CI con respecto a C (pAkt: 47 ± 2% y pGSK-3b: 52 ± 2%) y aumentó en los grupos PI y PCI con respecto a CI (pAkt: 23 ± 4% y 34 ± 8%; pGSK-3b: 33 ± 7% y 41 ± 9%, respectivamente). En otro grupo de corazones y al final de R se aislaron las mitocondrias en las que se midió la apertura del PTM inducida por 200 mmol/L de calcio a través de la dispersión de la luz (DL) a 520nm. La DL fue 0.68 ± 0.12 u.a. en C, disminuyó a 0.07 ± 0.02 u.a. (p<0.05) en el CI y se recuperó parcialmente en los grupos PI y PCI, adquiriendo el valor de 0.19 ± 0.03 u.a.(p<0.05). Estos resultados muestran que ambas intervenciones (PI y PCI) disminuyen el infarto producido por la isquemia-reperusión en los corazones hipertroficados de las SHR y que este efecto cardioprotector estaría relacionado a la protección mitocondrial mediada por la fosforilación de GSK-3b vía PI3K/Akt.

**017. (498) ROL DE LA INTERACCIÓN FÍSICA/FUNCIONAL DEL INTERCAMBIADOR CL-/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> AE3 Y LA ANHIDRASA CARBÓNICA 14 EN EL MIOCARDIO.**

Vargas L.<sup>1</sup>; Álvarez B.<sup>2</sup>

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Cs, Médicas, UNLP.<sup>1 2</sup>  
lore\_0204@yahoo.com.ar

El intercambiador AE3 cataliza el intercambio electroneuro de Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a través de la membrana plasmática de células cardíacas, regulando el pH intracelular (pHi). Por otro lado, la anhidrasa carbónica (AC) cataliza la conversión reversible de CO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> en tejidos cardíacos, participando en la homeostasis iónica. La asociación física y funcional del AE3 y la AC2 citoplasmática ha sido demostrada anteriormente. Esta asociación, maximiza los flujos de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mediados por AE3. Recientemente se identificó otra isoforma de la AC, la AC14, en el miocardio de mamíferos. La AC14 posee un único dominio transmembrana y su sitio catalítico expuesto al medio extracelular. La asociación física entre AE3 y AC14 fue estudiada mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (co-IP), utilizando lisados ventriculares de corazones de ratas Wistar. La CA14 fue IP con anticuerpos contra las dos isoformas del AE3 expresadas en el miocardio de ratas, el AE3fl y el AE3c. Además, AE3fl y AE3c fueron IP con anticuerpos contra CA14, en lisados de corazón, demostrando la interacción de AE3 y CA14 en el miocardio (n=3). Experimentos de inmunocitoquímica demostraron la co-localización del intercambiador AE3 y la AC14 en miocitos cardíacos aislados mediante análisis por microscopía confocal. Finalmente, la interacción funcional de AE3 y CA14 fue estudiada en miocitos aislados de rata cargados con el indicador fluorescente BCECF, determinando la tasa de alcalinización intracelular mediada por AE3 en un medio desprovisto de Cl<sup>-</sup>, por epifluorescencia. El inhibidor de la anhidrasa carbónica, benzolamida (10 μM), redujo la alcalinización mediada por AE3 en un 80%, comparado con control, confirmando la asociación funcional de AE3 y CA14. Concluimos, entonces, que la actividad del intercambiador AE3 cardíaco es dependiente de su interacción física/funcional con la AC14, constituyendo un medio efectivo para regular el pHi y eliminar productos de desecho celular como el CO<sub>2</sub>, en tejidos cardíacos.

**018. (641) LA EXPRESIÓN Y LA FUNCIÓN DEL COTRASPORTADOR NA<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ELECTROGÉNICO ESTÁN DISMINUIDAS EN CORAZONES DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS.**

De Giusti V.<sup>1</sup>; Orłowski A.<sup>2</sup>; Aiello E.<sup>3</sup>

Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1 2 3</sup>  
rojitadg@hotmail.com

El cotransportador Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NBC) regula el pH intracelular (pHi) de los miocitos cardíacos. Existe una isoforma electroneutra (NBCn) denominada NBC3, de estequiometría 1 Na<sup>+</sup>/1 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y dos isoformas electrogénicas (NBCe) denominadas NBC1 y NBC4, de estequiometría 1 Na<sup>+</sup>/2 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. El NBCe genera una corriente repolarizante que contribuye con la repolarización del potencial de acción (PA). El objetivo del presente trabajo fue investigar la relevancia del NBCe en los miocitos ventriculares de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) en comparación con sus controles Wistar. Se detectó hipertrofia cardíaca (HC) en las ratas SHR (peso corazón/peso corporal en mg/g=4.80±0.11, n=10 vs 3.30±0.09, n=7; p<0.05). Se aislaron miocitos ventriculares y se cargaron con el indicador de pHi BCECF. La actividad total del NBC se estudió realizando "Pulsos de amonio" [se calculó el flujo de H<sup>+</sup> (J<sub>H</sub>, mM/min) a pHi 6.8 tras inducir una acidosis] y la específica del NBCe mediante una despolarización celular ("Pulsos de K<sup>+</sup>", ΔpH<sub>e</sub> a los 14 minutos). Se diseñaron anticuerpos inhibitorios específicos contra el NBC1 (anti NBC1) con los cuales se estudió su expresión y función. El alto K<sup>+</sup> generó un ΔpH<sub>e</sub> de 0.17±0.02 (n=11) en ratas Wistar y de 0.10±0.01 (n=8; P<0.05) en ratas SHR. El anti NBC1 abolió la alcalinización inducida por el alto K<sup>+</sup> en ambas cepas, indicando que el NBC1 es la única isoforma electrogénica funcional en los miocitos ventriculares de rata, siendo su actividad menor en las ratas SHR. Adicionalmente, la expresión del NBC1 fue menor en ventrículos de ratas SHR. En

las ratas Wistar el anti NBC1 disminuyó el J<sub>H</sub> un 50% (1.71±0.3, n=4 vs 3.29±0.4, n=8, p<0.05). Por el contrario, no modificó significativamente el J<sub>H</sub> de ratas SHR (2.8±0.2, n=4 vs 3.14±0.6, n=6), siendo el J<sub>H</sub> control similar al de las ratas Wistar, señalando que la menor expresión y actividad del NBC1 podría estar contrarrestada con una mayor actividad del NBC3. Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir que en las ratas Wistar el NBC3 y el NBC1 tienen un rol equivalente en el control del pHi, mientras que la actividad y expresión de este último está disminuida en las ratas SHR a expensas de un aumento en la actividad del NBC3. Estos resultados podrían ser relevantes para explicar la prolongación del PA y la sobrecarga de Na<sup>+</sup> intracelular características de la HC, como presentan los corazones de las ratas SHR.

**019. (642) EL LOSARTÁN PREVIENE LA RESPUESTA PRO-FIBRÓGENICA RENAL EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA HIPERSÓDICA**

Della Penna S.<sup>1</sup>; Cao G.<sup>2</sup>; Cerrudo C.<sup>3</sup>; Zotta E.<sup>4</sup>; Gorzalczy S.<sup>5</sup>; Pandolfo M.<sup>6</sup>; Trida V.<sup>7</sup>; Toblli J.<sup>8</sup>; Fernández B.<sup>9</sup>; Rosón M.<sup>10</sup>

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 3 9 10</sup>; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán<sup>2 8</sup>; Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, Uba<sup>4</sup>; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>5</sup>; Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Uba<sup>6 7</sup>  
silvanadellapenna@gmail.com

Está descripto que una dieta hipersódica incrementa la presión arterial y el estrés oxidativo y tiene también un efecto profibrogénico en el riñón, tanto en ratas normales como en ratas sensibles a la sal. Este efecto es detectado por la sobreexpresión de marcadores como el TGF-β1 y la α-actina de músculo liso (α-SMA). El objetivo de este trabajo fue estudiar la participación de la Angiotensina II (Ang II) intrarrenal, a través de su receptor AT1, en el aumento de la presión arterial y la fibrogénesis renal en ratas normales alimentadas con dieta hipersódica. Se estudiaron ratas Sprague-Dawley (n=5-7) alimentadas con dieta normosódica (NS, 0.4% NaCl) o hipersódica (HS, 8% NaCl) durante tres semanas, con o sin la administración del antagonista del receptor AT1 losartán (NS-L, HS-L) suministrado en agua de bebida (40mg/kg/día). Se registró la presión arterial sistólica (PAS), y se evaluó en tejido renal la expresión y localización de Ang II, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), TGF-β1 y α-SMA por inmunohistoquímica. La dieta hipersódica incrementó la PAS, mientras que el losartán la redujo en los grupos NS-L y HS-L, manteniéndose la diferencia entre ambos (mmHg, NS: 128±2; HS: 148±2\*; NS-L: 107±2; HS-L: 122±4\*#; \*p< 0,001 vs los respectivos normosódicos, # p< 0,001 vs HS). La dieta hipersódica indujo sobreexpresión de TGF-β1, α-SMA y Ang II, y disminución de eNOS en corteza y médula renal. La administración de losartán normalizó la expresión de Ang II, eNOS y previno la respuesta profibrogénica. Como el bloqueo AT1 redujo la expresión renal de Ang II, TGF-β1 y α-SMA y restableció la expresión de eNOS, la angiotensina II renal está involucrada en la respuesta profibrogénica producida por una dieta alta en sodio. Por otra parte, como el losartán disminuyó los valores de PA en ratas con y sin sobrecarga de sodio, se sugiere que su efecto hipotensor es independiente de la carga dietaria de sodio y de la expresión intrarrenal de Ang II.

**PREMIO SAFIS**

**020. (97) EL TRANSPORTADOR RENAL TUBULAR HIDRO-CORTISONA SENSIBLE MEDIA LOS EFECTOS NATRIURÉTICOS Y DIURÉTICOS DEL ANP DEPENDIENTES DE LA CAPTACION RENAL DE DOPAMINA.**

Choi M.<sup>1</sup>; Lee B.<sup>2</sup>; Gorzalczy S.<sup>3</sup>; Medici C.<sup>4</sup>; Pandolfo M.<sup>5</sup>; Trida V.<sup>6</sup>; Lucano F.<sup>7</sup>; Fernández B.<sup>8</sup>

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; INFIBIOC, CONICET<sup>1 2 4 7 8</sup>; Cátedra De Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>3</sup>; Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas, UBA<sup>5 6</sup>  
marcelinkchoi@yahoo.com.ar

El ANP aumenta la captación renal de dopamina (DA) (Fernández y col., Regul Pept 124;137,2005), siendo DA dependiente parte de sus efectos diuréticos y natriuréticos. El objetivo fue demostrar si estos efectos disminuyen bloqueando los transportadores tubulares de DA con hidrocortisona (HC). Ratas macho Sprague Dawley se infundieron por vena femoral, se extrajo sangre y registró presión arterial media (PAM) y frecuencia cardíaca (FC) en carótida y se recolectó orina por vejiga. Se infundió (45 min) solución salina isotónica (SSI) estabilizando diuresis y luego (2 hs) SSI (controles) o drogas (experimentales). Se efectuaron curvas dosis respuesta al ANP (0.1-10 µg/kg/hr) y DA (0.5-10 µg/kg/hr). Se recolectó orina y sangre (basal y post-infusión) determinándose Volumen de Filtrado Glomerular (VFG), Excreción de Sodio Fraccional (FENa %) y Urinaria (uNa.V). Resultados: Se usaron 10 µg/kg/hr ANP y DA (dosis umbral que aumentó la diuresis, FENa y uNa.V, sin alterar PAM, FC y VFG). La HC 10 mg/kg/hr inhibió los efectos de DA y ANP sobre FENa y uNa.V; FENa (90 y 120 min, X±SEM): control: 0,26±0,08 y 0,19±0,05; DA10: 1,31±0,11\* y 1,42±0,18\*; DA/HC10: 0,35±0,08\* y 0,36±0,09\*; ANP10: 4,11±0,44\* y 4,08±0,52\*; ANP/HC 10: 2,7±0,63\* y 2,01±0,42\*\*/\*\*. uNa.V: control: 0,54±0,12 y 0,55±0,12; DA10: 4,48±0,65\* y 4,36±0,51\*; DA/HC10: 1,34±0,15\* y 1,19±0,25\*; ANP10: 9,45±0,88\* y 9,0±0,3\*; ANP/HC10: 6,19±0,57\*\*/\*\*\* y 5,50±0,75\*\*/\*\*. La infusión simultánea de ANP y DA no potenció los efectos de ANP sobre el uNa.V: 10,17±0,46\* y 10,27±0,8\*. \*p<0,01 vs control; \*\*p<0,05 vs ANP10; #p<0,05 vs DA10. n= 7-12, Test de Tukey y ANOVA. Conclusiones: ANP y DA aumentaron la natriuresis y diuresis sin alterar la PAM y FC. Los efectos del ANP fueron mayores que los de la DA. La HC, inhibió los efectos de DA sobre FENa y uNa.V y también disminuyó los efectos natriuréticos del ANP, demostrando *in vivo* que el ANP posee efectos directos e indirectos, siendo los últimos dependientes de la captación renal de DA.

#### 021. (106) PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES COLINÉRGICOS GANGLIONARES EN LA LIBERACIÓN DE GnRH Y PROGESTERONA DESDE EL OVARIO DE RATA

Daneri Becerra C.<sup>1</sup>; Vega O. A.<sup>2</sup>; Mohn C.<sup>3</sup>; Sosa Z.<sup>4</sup>; Rastrilla A.<sup>5</sup>  
LABIR-Universidad Nacional de San Luis<sup>1 2 4 5</sup>; Laboratorio de Neuroendocrinología del Centro de Estudios Farmacológico y Botánicos (CEFyBO-CONICET) Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires<sup>3</sup>  
titidaneri@hotmail.com

El objetivo de presente trabajo fue determinar si acetilcolina (ACh) en ganglio en un sistema *ex vivo* ganglio mesentérico superior- plexo nervioso ovárico-ovario (GMS-PNO-O) modifica la liberación ovárica de: a) hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y demostrar su actividad biológica b) Noradrenalina (NA) y adrenalina (A); 2° Evaluar si la liberación de progesterona (P<sub>4</sub>) y la actividad y expresión génica de las enzimas 3β-HSD y 20α-HSD se modifican por estímulo neural. El sistema fue extraído de ratas en E y DII e incubado en buffer KRBG a 37° C. ACh (10<sup>-6</sup> M) fue adicionada en el GMS y se extrajo líquidos de incubación ovárica a los 60 y 120 min. La actividad biológica se determinó midiendo LH de las incubaciones de hipófisis obtenidas de ratas machos adultos con los líquidos ováricos de los sistemas. P<sub>4</sub>, GnRH y LH se midieron por RIA, las actividades enzimáticas por espectrofotometría y la expresión de las enzimas por RT-PCR. Un p<0.05 fue de significado estadístico. Acetilcolina en E incrementó GnRH, actividad y expresión génica de 20 α-HSD mientras que disminuyó P<sub>4</sub>, actividad y expresión génica de 3-β HSD (p<0.001) y LH. En DII, incrementó GnRH, P<sub>4</sub> LH, actividad y expresión génica de 3-β HSD, mientras que disminuyó la actividad y expresión 20 α-HSD (p<0.001). La NA incrementó en E (p<0.001) y disminuyó en DII y A no sufrió cambios. Acetilcolina en ganglio muestra que: 1) GnRH por primera vez aumenta en el compartimento ovárico por estímulo neural, sin la presencia de factores humorales y tiene actividad biológica similar al péptido hipotalámico. 2) Se detecta la presencia de NA y A en el compartimento ovárico vía PNO. 3) Los neurotransmisores modifican la fisiología ovárica, destacando la necesidad de la vía neural para la liberación de GnRH. Estos resultados abren camino a futuras investigaciones que permitan

contestar con certeza científica, los innumerables interrogantes sobre los posibles mecanismos de acción de GnRH y NA.

#### 022. (114) ACETILCOLINA EN OVARIO MODULA LA PRESENCIA DE GnRH, P<sub>4</sub> Y LA EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS 3β-HSD Y 20α-HSD

Daneri Becerra C.<sup>1</sup>; Bronzi D.<sup>2</sup>; Vega O. A.<sup>3</sup>; Sosa Z.<sup>4</sup>; Rastrilla A.<sup>5</sup>  
LABIR-Universidad Nacional de San Luis<sup>1 2 3 4 5</sup>  
titidaneri@hotmail.com

Acetilcolina es un neurotransmisor cuyos efectos a nivel ovárico están en estudio ya que se une a receptores presente en el órgano. Se la relaciona con la proliferación celular y morfogénesis pero hasta el momento no se ha dilucidado si influye sobre la presencia de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El Objetivo del presente trabajo fue evaluar: a) si ACh en incubaciones de ovario (O) en ratas en Diestro II influyen en el contenido de GnRH en el compartimento ovárico. b) si modula la liberación de P<sub>4</sub> y la actividad y expresión de sus enzimas 3β-HSD y 20α-HSD y c) si influye sobre la expresión de dos marcadores de apoptosis Bax y Bcl<sub>2</sub>. Para ello se utilizan incubaciones de ovario con y sin la presencia del neurotransmisor en concentración final de 10<sup>-6</sup> M. Se utiliza una cubeta, en baño metabólico a 37° con solución Krebs Ringer pH 7,4. Se extraen muestras a los 60 y 120 min. Las determinaciones se realizaron por RIA para P<sub>4</sub> y GnRH y la actividad por espectrofotometría y la expresión de las enzimas y marcadores de apoptosis por RT-PCR. Un p<0,05 es de significado estadístico. Cuando se adicionó ACh disminuyó GnRH (p<0.001) y la actividad y expresión 3β-HSD, P<sub>4</sub> no mostró cambios con respecto al control y la actividad y expresión de 20α-HSD aumentó (p<0.001) en los tiempos de incubación. Los marcadores de apoptosis Bax y Bcl<sub>2</sub> muestran un aumento y disminución respectivamente en la expresión génica. Con lo que se concluye que ACh modula la presencia de GnRH y participa como un factor paracrino en la fisiología ovárica y el neurotransmisor podría estar involucrado en el remodelamiento ovárico.

#### 023. (354) PAPEL DE LOS TRANSPORTADORES DE BICARBONATO EN LA RECUPERACIÓN DE SOBRECARGAS ACIDAS EN NEUTRÓFILOS HUMANOS

Giambelluca M.<sup>1</sup>; Orłowski A.<sup>2</sup>; Ciancio C.<sup>3</sup>; Gende O.<sup>4</sup>; Aiello E.<sup>5</sup>  
Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1 2 3 4 5</sup>  
ogende2@yahoo.com.ar

La estimulación de neutrófilos con el tripéptido bacteriano fMLP es capaz de inducir la activación de la NADPH oxidasa, generando H<sup>+</sup> intracelulares. El exceso de ácido debe ser eliminado para continuar la producción de superóxido. El propósito de este trabajo fue estudiar la participación de los transportadores de bicarbonato en este proceso y en la regulación del pH intracelular (pH<sub>i</sub>) de los neutrófilos. Las células cargadas con el indicador fluorescente BCECF, acidificadas por un prepulso de amonio y mantenidas en un medio con HEPES libre de sodio, mostraron, después del bloque del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> con EIPA, una recuperación del pH<sub>i</sub> más lenta en una solución salina con HEPES (0.9 ± 0.6 UR=pH/seg.10<sup>-4</sup>) que en una solución con bicarbonato (2.1 ± 0.1 UR, p<0.05). La recuperación en el medio con bicarbonato/EIPA fue sensible al bloqueador de transportadores aniónicos SITS (0.5 ± 0.3 UR). La recuperación del pH<sub>i</sub> resistente a EIPA fue más rápida cuando los neutrófilos se estimularon con fMLP /citocalasina B en un medio con bicarbonato (4,9 ± 0.5 UR). Este aumento fue inhibido por SITS pero fue insensible al bloqueo con Zn<sup>2+</sup> de los canales de H<sup>+</sup> activados por voltaje (Hv1) (4,9 ± 0.2 UR) y a la inhibición de NADPH oxidasa con DPI (4,2 ± 0.2 UR). Se concluye que los neutrófilos poseen un transportador de bicarbonato que contribuye a la recuperación de cargas ácidas en neutrófilos estimulados por fMLP sin que participen canales Hv1 y que en la vía de señalización la activación del transportador es independiente de la estimulación de la NADPH oxidasa. El ingreso de bicarbonato a través de transportadores aniónicos podría contribuir a la compensación de la sobrecarga ácida generada por la explosión oxidativa.

**024. (371) IDENTIFICACIÓN DE DOMINIOS SRCR DE PROTEÍNAS DE OVIDUCTO PORCINO. ¿SIMILITUDES ENTRE SPERM BINDING GLYCOPROTEIN (SBG) Y DELETED IN MALIGNANT BRAIN TUMORS (DMBT1)?**

Roldan M.<sup>1</sup>; Teijeiro J.<sup>2</sup>; Marini P.<sup>3</sup>

Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario - CONICET - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario<sup>1 2 3</sup>  
roldan@ibr.gov.ar

El oviducto es el sitio donde las gametas expresan su capacidad fecundante e interaccionan al momento de la fecundación. Estudios realizados en nuestro laboratorio describen a Sperm Binding Glycoprotein (SBG) como una glicoproteína oviductal porcina relacionada a la selección negativa de espermatozoides. El objetivo de este trabajo fue obtener y analizar la secuencia de SBG. Se identificaron péptidos de SBG a través de electroforesis bidimensional y espectroscopía de masa en tándem (LC-MS/MS). Estos se correspondían con dominios receptores scavenger ricos en cisteína (SRCR), reportados en la proteína deleted in malignant brain tumors (DMBT1). A partir de cebadores diseñados en base a la secuencia de aminoácidos obtenida mediante LC-MS/MS para SBG y ARNm de células epiteliales de oviducto, se obtuvieron por RT-PCR secuencias de ADNc que fueron clonadas y secuenciadas. La comparación de las secuencias obtenidas con las de bancos de datos, mostró un 99% homología con un clon de DMBT1 reportado en ovario porcino. Las secuencias clonadas contienen 2 dominios CUB que flanquean a un dominio SRCR, un dominio ZP y la región transmembrana de DMBT1. Mediante ensayos de western blot, utilizando anticuerpos policlonales anti-SBG de cerdo y anti-DMBT1 humano, se detectaron bandas reactivas de la misma masa molecular obteniéndose a su vez una idéntica localización de ambas proteínas en cortes histológicos de oviducto porcino. Dado que utilizando cebadores diseñados en base a secuencias contenidas en dominios SRCR de SBG sólo pudieron clonarse secuencias de DMBT1, que anticuerpos anti-SBG y anti-DMBT1 reconocen una proteína de masa molecular semejante e idéntica localización, y considerando resultados previos de nuestro laboratorio que indican que la acción de SBG requiere interacción con espermatozoides homólogos, es probable que DMBT1/SBG sea la única proteína oviductal con dominios SRCR, y su función se vincule a la selección de espermatozoides.

**025. (392) ANÁLISIS PROTEÓMICO DE SUEROS VACUNOS. COMPARACIÓN ENTRE VACAS PREÑADAS Y NO PREÑADAS**

Ruiz Álvarez J.<sup>1</sup>; Charmandarian A.<sup>2</sup>; Haumüller J.<sup>3</sup>; Marini P.<sup>4</sup>

IBR-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas, UNR, Rosario, Argentina<sup>1 4</sup>; Cátedra de Obstetricia y Fisiopatología de la Reproducción, Facultad de Cs. Veterinarias, UNR, Casilda, Argentina<sup>2 3</sup>  
ruiz@ibr.gov.ar

A diferencia de lo que ocurre en el hombre y algunos primates, en los bovinos y otros mamíferos los mecanismos de mantenimiento de la preñez son aún blancos de estudio. Por otro lado, la detección temprana de la preñez en bovinos es fundamental para optimizar su producción. En este trabajo planteamos identificar proteínas específicas de preñez temprana en bovinos, a fin de establecer posteriormente su posible colaboración en el mantenimiento de este estado y avanzar hacia el desarrollo de métodos inmunológicos para detección del establecimiento de la preñez y de su conservación en el tiempo. Se utilizaron sueros de vacas preñadas y no preñadas a 20 días post-inseminación, previamente depletados de proteínas mayoritarias mediante cromatografía de intercambio iónico para disminuir la complejidad de los mismos. Se realizaron electroforesis bidimensionales. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie coloidal. Se observaron diferencias de cantidad entre ambas condiciones para 36 proteínas. Aquellas que mostraban las mayores variaciones fueron identificadas por espectrometría LC-MS/MS. Luego de estudiar las características reportadas se seleccionaron varias de estas

proteínas para posteriores estudios tendientes a comprender su rol biológico durante la preñez.

**026. (577) EL ESTADO TIROIDEO REGULA EL SISTEMA INMUNE Y MODULA EL DESARROLLO TUMORAL DEL LINFOMA T EL-4 CRECIENDO IN VIVO EN MODELOS MURINOS DE HIPER- E HIPOTIROIDISMO.**

Sterle H.<sup>1</sup>; Klecha A.<sup>2</sup>; Paulazo M.<sup>3</sup>; Cremaschi G.<sup>4</sup>; Barreiro Arcos M.<sup>5</sup>

CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1 3 5</sup>; CEFYBO-CONICET-UBA; Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA<sup>2 4</sup>  
lenki74@yahoo.com.ar

Las hormonas tiroideas (HTs) regulan la inmunidad pero su participación en el desarrollo tumoral es controversial. Nos propusimos evaluar el comportamiento biológico del linfoma T EL-4, creciendo *in vivo* en ratones eu-(C), hipo-(hip) e hipertiroideos (H). Ratones C57Bl fueron tratados con T4 (0.4mg/g peso) o el agente antitiroideo PTU (60mg/g). Analizamos la actividad de células NK mediante la lisis de células YAC-1 marcadas con [<sup>3</sup>H]-timidina. Los animales H mostraron una menor actividad citotóxica (% lisis: 45.6±3.7) respecto de los C (67.1±4.2) o hip (74.1±5.1). *In vitro* las HTs aumentaron la proliferación de las células EL-4. Adicionalmente, inoculamos s.c. 5x10<sup>5</sup> células EL-4 en los distintos modelos murinos. Los animales H mostraron una menor latencia (7.5±0.8 días) y una mayor velocidad de crecimiento tumoral, evidenciada a partir de los 10 días p.i., (vol. tumoral: 0.9±0.1 cm<sup>3</sup>) respecto de los C (latencia: 10.8±1.1 días, vol. tumoral: 0.4±0.09 cm<sup>3</sup>). Los animales hip no mostraron diferencias respecto de los C. Las células EL-4 marcadas con CFSE, creciendo en animales H mostraron una mayor velocidad de división celular. Linfocitos T y B de ratones C, hip, e H portadores de tumor fueron estimulados *in vitro* con concanavalina A (2mg/ml) o lipopolisacárido (50mg/ml) y cuantificada su actividad proliferativa por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Los animales H mostraron una mayor respuesta proliferativa respecto de los C o hip (índice de estimulación (I.E) H, cél T: 380.2±35.8, cél B: 80.4±9.8; I.E C, cel. T: 208.3±19.8, cel. B: 47±4.2; I.E hip, cél T: 61.3±5.7, cél B: 19.5±1.8). No hemos hallado diferencias en la distribución de subpoblaciones linfocitarias. Nuestros resultados indican que el estado tiroideo regula el desarrollo tumoral a través de la modulación del sistema inmune. Estudiar los mecanismos involucrados podría contribuir al desarrollo de estrategias que empleen la modulación del eje tiroideo como adyuvante en el tratamiento de linfomas.

**027. (668) MODIFICACIONES INDUCIDAS POR LA RESTRICCIÓN ALIMENTARIA O LA ADMINISTRACIÓN DE GHRELINA (AGUDAS O CRÓNICAS) SOBRE LA CONDUCTA SEXUAL DE RATONES HEMBRAS.**

Bertoldi M.<sup>1</sup>; Luque E.<sup>2</sup>; Vincenti L.<sup>3</sup>; Desimone M.<sup>4</sup>; Ruiz R.<sup>5</sup>; Fiol De Cuneo M.<sup>6</sup>; Martini A.<sup>7</sup>

Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
acmartini2000@yahoo.com

La restricción alimentaria (RA) afecta la receptividad sexual de las hembras; este parámetro parece estar influenciado por neuropéptidos u hormonas que actúan a corto plazo. Si bien la RA crónica aumenta significativamente los niveles de ghrelina (Ghr) plasmáticos, aún no se ha estudiado los efectos de este péptido sobre la conducta sexual. El objetivo del presente estudio fue evaluar las modificaciones inducidas en la receptividad sexual de hembras de ratón, castradas e inyectadas con benzoato de estradiol (10 µg/animal, 52 y 28 hs antes del test) y progesterona (500 µg/animal, 4 hs antes del test) y tratadas según diferentes protocolos: A) 50% de restricción alimentaria durante 5 días; B) 24 hs de ayuno; C) 3nmol/animal/día (sc) de Ghr durante 5 días; D) 3 nmol/animal/día (sc) de Ghr 30 min antes del test de conducta y E) sin tratamiento alguno (control). Se entrenaron y seleccionaron hembras con un promedio de receptividad basal entre 50-75%. Como machos de estimulación se utilizaron ratones entrenados. Cada hembra fue sometida, en orden aleatorio, a todos los tratamientos. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de



medidas repetidas. La receptividad disminuyó significativamente en hembras sometidas a los protocolos A, B y D vs E y en A vs C (% receptividad= A: 18.8±7.7; B: 33.1±8.1; C: 48.1±10.8; D: 45.6±10.6 y E: 61.9±6.4; n=8 hembras; p< 0.05). Se detectó además una correlación significativa entre la disminución del peso corporal y la reducción en la receptividad sexual (r= 0.6, p< 0.01). Resultados preliminares indican que la administración de un antagonista de Ghr ([D-Lys3] GHRP-6), en forma conjunta a la restricción alimentaria crónica, revierte el efecto deletéreo de esta última sobre la receptividad (% receptividad= A: 10.0±5.8 y A+antagonista: 70.0±20.8; n=3; p< 0.05). Los hallazgos detectados en el presente estudio indican que Ghr estaría involucrada, al menos en parte, en la disminución de la receptividad sexual ocasionada por la hiponutrición.

#### 028. (697) LA AUTOFAGIA MEDIADA POR VMP1 EN CÁNCER PANCREÁTICO HUMANO Y SU RELACIÓN CON LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS.

Ropolo A.<sup>1</sup>; Boggio V.<sup>2</sup>; Pardo R.<sup>3</sup>; Vaccaro M.<sup>4</sup>

Laboratorio de Fisiopatología Molecular, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 4</sup>

aropolo@ffy.uba.ar

VMP1 es una proteína inducida durante la pancreatitis cuya expresión gatilla autofagia. Previamente, demostramos que la vía de autofagia que involucra a VMP1 promueve apoptosis en células de cáncer pancreático. Con el objetivo de evaluar la expresión de VMP1 y su relación con p21 y p53 en muestras humanas de cáncer de páncreas, se confeccionaron *microarrays* de tejido con 50 muestras de adenocarcinoma ductal pancreático en estadio avanzado y 7 controles. Como marcador de autofagia investigamos la expresión de LC3. Mediante inmunohistoquímica, se evidenció la expresión de VMP1 en células glandulares en 10 (20%) de las muestras tumorales y en ningún control. El mismo patrón de expresión se observó para LC3, sugiriendo la ocurrencia de autofagia mediada por VMP1. Simultáneamente, la expresión de p21 fue negativa en el 92% de las muestras analizadas, mostrando correlación significativa con la expresión de VMP1 (p<0,001) y p53 (p<0,03). Para analizar el rol patológico de la relación entre VMP1 y p21 en células tumorales, utilizamos células HCT116 y HCT116 p21 -/-. Las células p21 -/- mostraron una mayor expresión de VMP1 ante la inducción de autofagia, evidenciada por el reagrupamiento de LC3. Por citometría de flujo de Anexina V, demostramos una reducción significativa de los niveles de apoptosis en células HCT116 p21 -/- con autofagia inducida por ayuno. Por el contrario, la sobreexpresión de VMP1 en las células HCT116 mostró un incremento significativo de apoptosis después de la inducción de autofagia. Los resultados demuestran que las células tumorales desarrollan autofagia mediada por VMP1 y que la expresión de p21 permite la ocurrencia de apoptosis en estas células cuando se las somete al ayuno. Concluimos que VMP1 y p21 están involucradas en la relación entre autofagia y apoptosis en células tumorales. Proponemos que la pérdida de p21 observada en los tumores pancreáticos justifica en parte la alta resistencia a la apoptosis característica de este tipo de cáncer.

#### 029. (772) EL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO REGULA IN VIVO EL TRÁFICO DE ACUAPORINA-1 (AQP-1) EN TÚBULO PROXIMAL DE RATA.

Della Penna S.<sup>1</sup>; Rosón M.<sup>2</sup>; Cao G.<sup>3</sup>; Zotta E.<sup>4</sup>; Fellet A.<sup>5</sup>; Balaszczuk A.<sup>6</sup>; Correa A.<sup>7</sup>; Gorzalczy S.<sup>8</sup>; Pandolfo M.<sup>9</sup>; Vatrella M.<sup>10</sup>; Trida V.<sup>11</sup>; Toblli J.<sup>12</sup>; Fernández B.<sup>13</sup>

Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 2 5 6 7 10 13</sup>; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán<sup>3 12</sup>; Cátedra de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>4</sup>; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>8</sup>; Cátedra de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>9 11</sup>  
silvanadellapenna@gmail.com

La AQP-1 es osmoinducible en cultivo de fibroblastos y en células de túbulo proximal (TP) de riñón humano y es activada

por la señal óxido nítrico-GMPc. El objetivo fue estudiar *in vivo* la regulación aguda de la expresión y localización de AQP1 en ratas infundidas con solución salina hipertónica y verificar si el óxido nítrico (NO) incide en dicha regulación. Se infundieron ratas Sprague-Dawley por vena femoral durante 2 horas, divididas en grupo control: NaCl 0,15M y grupos experimentales con sobrecarga aguda de sodio: Na (NaCl 1,0M); Na-Los (NaCl 1,0M + losartán 10 mg.kg-1 en bolo) y Na-Tempol: (NaCl 1,0M + tempol 0,5 mg.min-1.kg-1). Los mismos grupos se repitieron en presencia de L-NAME (10 ug.min-1.kg-1). Finalizada la infusión se estudiaron: expresión renal de AQP1 por Western-blot, expresión de eNOS y localización de AQP-1 y caveolina-1 por inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia. Resultados (P>0.001): La expresión de la proteína AQP1 no se modificó por la sobrecarga de sodio ni por efecto de Los o Tempol, pero mostró un patrón de marcación diferente pues se localizó en la membrana apical y basolateral del TP en controles y en el citoplasma en el grupo Na. El Los y el tempol relocalizaron la AQP1 hacia la membrana plasmática. En cambio, la co-administración de L-NAME previno este tráfico, tanto en controles como en grupos con sobrecarga salina. Se observó una co-localización de AQP1-caveolina-1 en membrana en controles, Na-Tempol y Na-Los y en citoplasma en grupos infundidos con L-NAME. La expresión de eNOS disminuyó en el grupo Na y se incrementó en los grupos Na-Los y Na-Temp. El estrés hiperosmótico *in vivo*, que disminuye la disponibilidad de NO, regula en forma aguda el tráfico de AQP1 en células del TP desde la membrana hacia el citoplasma sin cambiar la expresión de la proteína, mientras que la inhibición de la angiotensina II y del estrés oxidativo, que previenen la disminución del NO, favorecen el tráfico de AQP1 hacia la membrana apical y basolateral.

#### TRABAJOS SELECCIONADOS PARA SIMPOSIOS

#### 030. (508) ASOCIACIÓN DE VARIANTES DE SECUENCIA DEL GEN JAK2 CON SÍNDROME METABÓLICO

Tellechea M.<sup>1</sup>; Penas Steinhart A.<sup>2</sup>; Taverna M.<sup>3</sup>; Meroño T.<sup>4</sup>; Poskus E.<sup>5</sup>; Frechtel G.<sup>6</sup>

Departamento de Microbiología Inmunología y Biotecnología FFyB UBA<sup>1</sup>; Instituto de Inmunología de la Inmunidad Humoral (IDEHU) CONICET/UBA<sup>2 3 5</sup>; Departamento de Bioquímica Clínica FFyB UBA<sup>4</sup>; Departamento de Microbiología Inmunología y Biotecnología FFyB UBA; División Genética Hospital de Clínicas "José de San Martín" UBA<sup>6</sup>  
marianatellechea78@hotmail.com

La leptina y la insulina influyen en la masa y distribución grasa y en la composición corporal. La leptina, producida por el tejido adiposo, juega un rol importante en la regulación de la ingesta y gasto de energía actuando sobre receptores hipotalámicos. El receptor de leptina Ob-Rb utiliza la vía de transducción de señales JAK2-STAT3. *Janus kinase 2* (JAK2) es una tirosina-quinasa también involucrada en la activación de IRS-1 y 2, proteínas que median la señalización de leptina y de insulina. *Objetivo*: Estudiar la asociación entre síndrome metabólico (SM) y variantes de secuencia del gen JAK2, en una población de 790 hombres (18 a 65 años), no relacionados, concurrentes al Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas. *Materiales y Métodos*: Se realizaron determinaciones clínicas y bioquímicas para establecer la presencia de SM según el criterio NCEP/ATPIII. Se llevó a cabo, por medio de KBioscience, la genotipificación de tres TagSNPs (rs7849191CT, rs3780378CT y rs2031904CT) [3 tests capturan 24% de los SNPs (polimorfismos de nucleótido único) con frecuencia del alelo menor  $\geq 0,1$  y  $r^2=0,8$  en una región de 142,8kb] del gen JAK2. *Resultados*: Las frecuencias alélicas coincidieron con HapMap-CEU y se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. rs7849191 y rs3780378 (pero no rs2031904) fueron asociados a SM asumiendo modelos tanto dominantes como recesivos. La asociación se mantiene luego de ajuste por edad y por índice de masa corporal: rs7849191CX p=0,002, OR=0,41(IC95%=0,23-0,71); rs7849191CC p=0,018, OR=0,60(IC95%=0,39-0,92); rs3780378TX (p=0,003 OR=0,50(IC95%=0,31-0,79) y rs3780378TT p=0,015 OR=0,53(IC95%=0,31-0,88).

**Conclusiones:** Por primera vez, hasta nuestro conocimiento, se hallaron asociaciones significativas entre variantes de secuencia del gen JAK2 y SM en la población en estudio. Esta asociación podría ser consecuencia del rol de JAK2 en la señalización de la leptina y la insulina; y es de interés dada la creciente prevalencia de SM en la población mundial.

**031. (313) INTERRELACIÓN DEL COTRANSPORTADOR EPITELIAL DE SODIO (ENAC), SISTEMA KALIKREÍNA-KININA E HIPERTENSIÓN ARTERIAL.**

Toro A.<sup>1</sup>; Azurmendi P.<sup>2</sup>; Corbera N.<sup>3</sup>; Martin R.<sup>4</sup>; Ibarra F.<sup>5</sup>; Oddo E.<sup>6</sup>; Arrizurieta E.<sup>7</sup>

*Nefrología Experimental, IIM Alfredo Lanari, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*

ilanari@pinos.com

En el presente trabajo se estudió el rol que pudiera tener el cotransportador epitelial de sodio (ENaC), ubicado en el segmento del nefrón distal sensible a la Aldosterona, en el mecanismo de síntesis, almacenamiento y secreción de kalikreína que, como sabe, está involucrada en la regulación de la presión arterial. Se estudiaron ratas SHR de distinto sexo a las 12 semanas de vida, controles y tratadas con un bloqueante del ENaC (Benzamil, B) que fue administrado mediante minibombas osmóticas implantadas en tejido celular subcutáneo de la zona interescapular, a razón de 0.175mg/día x 3 días. Se recolectó orina de 24hs y se tomaron muestras de sangre y tejido renal, midiéndose excreción de agua y solutos, kalikreína urinaria (KU), Aldosterona plasmática, contenido renal (KR) y mRNA (KLK) de kalikreína. Se midió, además, presión arterial sistólica (PAS). Tras el tratamiento con B, se observó un aumento de la relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> de 0.59±0.02 a 0.78±0.04, p<0.005 y también de la Aldosterona plasmática de 165±36 a 1017±108 µg/ml, p<0.0001. La excreción urinaria de KU (nkat/g R/d) aumentó por B un 33%, p<0.03. KU y K<sup>+</sup> urinario basal se correlacionaron significativamente (r=0.71, p<0.001) y esta correlación se mantuvo luego de la administración de B (r=0.87, p<0.001). La correlación basal de KU con Na + urinario, en cambio, no se conservó (r=0.72, p<0.001 vs r=0.38, p<0.2). KLK no se modificó significativamente por B, 0.82±0.05 vs 0.77±0.05, mientras que KR se incrementó de 15.0±0.98 a 21.7±1.24 nkat/ml, p<0.0002. La PAS disminuyó significativamente por B un 16%. La persistencia de la correlación de KU con el K<sup>+</sup> urinario después del bloqueo del ENaC indicaría la dependencia de la secreción de KU con dicho ión. El aumento del contenido y excreción de kalikreína renal podría obedecer a una activación del sistema.

**032. (360) GALECTINA-8 INDUCE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA A TRAVÉS DE LA GLICOPROTEÍNA IB**

Romaniuk M.<sup>1</sup>; Tribulatti M.<sup>2</sup>; Cattaneo V.<sup>3</sup>; Lapponi M.<sup>4</sup>; Molinas F.<sup>5</sup>; Campetella O.<sup>6</sup>; Schattner M.<sup>7</sup>

*Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina<sup>1 4 7</sup>; Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín<sup>2 3 6</sup>; Hematología Investigación, CONICET, IDIM A. Lanari, UBA<sup>5</sup>*  
albertinar@gmail.com

Galectina-8 (Gal-8) es una lectina que contiene dos sitios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) diferentes, se expresa en células endoteliales y tumorales y tiene un rol pro-inflamatorio. Previamente, observamos que Gal-8 tanto soluble como inmovilizada induce distintas repuestas de activación plaquetaria a través de su CRD-N terminal y que, las plaquetas contienen Gal-8. El objetivo del presente trabajo es determinar los mecanismos moleculares implicados en la activación plaquetaria inducida por Gal-8 así como identificar su receptor en plaquetas. Simultáneamente con la agregación plaquetaria, Gal-8 indujo liberación de ATP (Gal-8 0,5 µM: 6±0.7 µM ATP) y la generación de TXB<sub>2</sub> (ELISA) (C:1200±100 pg/ml; Gal-8 0,5 µM: 12000±200 pg/ml, n=3). Ensayos en presencia de apirasa y/o aspirina mostraron que mientras la agregación gatillada por bajas concentraciones de Gal es dependiente del ADP y del TXA<sub>2</sub> (Gal-8 0,25 µM: 55% de agregación vs. Gal-8 0,25 µM + aspirina + apirasa: 6% agregación, p<0,01, n=3) concentraciones mayores son independientes de estos me-

diadores. Por espectrometría de masa identificamos a la integrina α<sub>IIb</sub> y a la glicoproteína (GP)Ib-V como probables contrarreceptores de Gal-8 en plaquetas. Estudios con plaquetas de pacientes con Trombastenia de Glanzmann y con síndrome de Bernard Soulier (deficientes en GPIIb/IIIa y GPIb respectivamente), confirmaron que la presencia de GPIb es esencial para la activación plaquetaria mediada por Gal-8 (100% de inhibición en agregación y exposición de P-selectina). En forma similar a las moléculas implicadas en la señalización río abajo del factor von Willebrand con la GPIb, estudios de Western blot y con inhibidores farmacológicos específicos, mostraron que la activación de las quinasas Src, PLCγ2, ERK y Akt también está implicada en la transducción de la señal de activación mediada por Gal-8. Nuestros resultados revelan a Gal-8 como un nuevo agonista plaquetario que utiliza a la GPIb como receptor funcional.

**033. (678) EL ANTICUERPO IGG-NMO PRESENTE EN EL SUERO DE PACIENTES CON NEUROMIELITIS ÓPTICA AFECTA LA EXPRESIÓN DE AQP4 Y LA PERMEABILIDAD AL AGUA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE ASTROCITOS**

Fernández J.<sup>1</sup>; Melamud L.<sup>2</sup>; Rivarola V.<sup>3</sup>; Ford P.<sup>4</sup>; Villa A.<sup>5</sup>; Capurro C.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Biomembranas - Facultad de Medicina - UBA<sup>1 3 4 6</sup>; Laboratorio de Biomembranas, Facultad de Medicina, UBA; Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía<sup>2</sup>; Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía<sup>5</sup>*  
jmfbur@gmail.com

La Neuromielitis Óptica (NMO), desorden inflamatorio del sistema nervioso central (SNC), afecta principalmente a los nervios ópticos y la médula espinal. Recientemente se descubrió que los pacientes con NMO producen un anticuerpo específico (IgG-NMO) cuyo blanco es la acuaporina 4 (AQP4), canal de agua más abundante del SNC localizado principalmente en los astrocitos. Sin embargo, el rol que jugaría la AQP4 en el desarrollo de la NMO es totalmente desconocido. Por lo tanto, en este trabajo, evaluamos los efectos del anticuerpo IgG-NMO, presente en tres pacientes con diagnóstico de NMO, sobre el patrón de expresión de la AQP4 así como sobre la permeabilidad osmótica de la membrana plasmática. Los experimentos fueron realizados en cultivos primarios de astrocitos diferenciados. Se evaluó la distribución de IgG-NMO y de la AQP4 mediante inmunocitoquímica. Los cambios en el volumen celular inducidos por hipoosmolaridad fueron evaluados por videomicroscopía de fluorescencia y se obtuvo una constante de tiempo (t) que fue usada como estimación de la permeabilidad osmótica. Los resultados mostraron que la exposición durante una hora a suero IgG-NMO positivo depleta el contenido de AQP4 en la membrana plasmática ni su funcionalidad. Contrariamente, la exposición prolongada (12 h) provocó una marcada reducción de la señal IgG-NMO en membrana en paralelo con una disminución significativa de la permeabilidad osmótica (t<sup>-1</sup>, s<sup>-1</sup>: control: 0,055 ± 0,003; P1: 0,028 ± 0,003; P2: 0,033 ± 0,007; P3: 0,038 ± 0,005; p<0.001, p<0.01, p<0.05 control vs. IgG-NMO, n=5-9) indicando que el antígeno del IgG-NMO es removido de la membrana. Nuestros resultados muestran, además, que el IgG-NMO afecta una población específica de AQP4 y no a toda la proteína expresada en la membrana. Estos datos sugieren que la internalización de AQP4 inducida por IgG-NMO es un proceso específico que podría ser responsable, al menos en parte, del mecanismo patogénico que da lugar a la enfermedad.

**034. (73) MARCADORES DE DEGENERACION NEURONAL EN MODELO DE ASFIXIA PERINATAL. NEUROPROTECCION POR ESTRADIOL.**

Saraceno E.<sup>1</sup>; Badorrey M.<sup>2</sup>; Holubiec M.<sup>3</sup>; Aón-bertolino M.<sup>4</sup>; Romero J.<sup>5</sup>; Galeano P.<sup>6</sup>; Capani F.<sup>7</sup>

*ININCA UBA CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
ezequielsaraceno@hotmail.com

La Asfixia Perinatal (AP) se asocia a una alta morbimortalidad a corto plazo y a distintos tipos de enfermedades neurológicas a largo plazo, tales como el Trastorno por Déficit de Atención con

Hiperactividad, epilepsia, retraso mental, parálisis cerebral, y alteraciones auditivas y visuales. En el presente trabajo se estudiaron marcadores de neurodegeneración en el citoesqueleto sináptico en neuronas y astrocitos del *Stratum radiatum* hipocámpal a los 30 días (contactos sinápticos maduros) y a los 120 días (adultez) en un modelo murino de AP. Además, se observaron los efectos neuroprotectores de un tratamiento tardío con estradiol (dosis diaria de 250 ug/kg durante 3 días). A los 30 días no se encontraron diferencias significativas entre los animales AP y CTL para la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), el estado de fosforilación de los neurofilamentos medianos y pesados (NFH/Mp) y la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP). Sin embargo, se observó un aumento de las espinas dendríticas tipo hongo y una alteración en el citoesqueleto de actina, acompañados de un incremento en la expresión de M6a, proteína involucrada en la espinogénesis. A los 120 días, se observó en los animales AP una marcada gliosis reactiva (GFAP+), acompañada de cambios morfológicos a nivel de las dendritas MAP2+, como así también de NFH/Mp. El tratamiento tardío con estradiol revirtió las alteraciones observadas a largo plazo, asociada a un aumento en la colocalización del receptor ERα con astrocitos GFAP+. Estos datos sugieren que los daños producidos por la AP son progresivos, comenzando con cambios tempranos a nivel del citoesqueleto de actina en las espinas dendríticas, extendiéndose luego a cambios de tipo neurodegenerativo con alteraciones en los neurofilamentos, el citoesqueleto dendrítico y los astrocitos. El tratamiento tardío con estradiol revirtió los daños observados, posiblemente actuando a nivel genómico vía la activación del receptor ERα. IBRO;MAE-AECID;PIP 5784.

**035. (782) INCORPORACIÓN Y CITOTOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE SILICIO EN CÉLULAS C6 DE GLIOMA DE RATA. EFECTO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE Y GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO**

Garabano N.<sup>1</sup>; David Gara P.<sup>2</sup>; Casas O.<sup>3</sup>; Gonzales M.<sup>4</sup>; Kotler M.<sup>5</sup>

*Departamento de Química Biológica, FCEYN, UBA; CITO-MA, Fundación Avanzar, Instituto de Terapia Radiante S.A., CIO La Plata<sup>1</sup>; CITOMA, Fundación Avanzar, Instituto de Terapia Radiante S.A., CIO La Plata<sup>2,3,5</sup>; INIFTA, Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP<sup>4</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEYN, UBA natigara@yahoo.com.ar*

Los gliomas son tumores altamente resistentes a las terapias radiantes actuales, lo cual señala la necesidad de realizar nuevas contribuciones tendientes al mejoramiento de las mismas. **Objetivo:** Estudiar la posible aplicación de las nanopartículas de silicio (NP-Si) como agentes terapéuticos en combinación con la radiación ionizante (RI), en base a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS). **Resultados:** El análisis, mediante espectrofluorimetría, de la incorporación de NP-Si (10µg/ml) a células de glioma C6 permitió establecer que el tiempo mínimo de incorporación es de 4hs (p<0,05). Estos resultados se corroboraron por microscopía de fluorescencia confocal bifotónica y TEM. El estudio de citotoxicidad se realizó empleando concentraciones variables de NP-Si (0-50 µg/ml) durante 2-12hs de incubación. Se observó una pérdida de viabilidad en función de la concentración, que alcanzó el 50% para 50 µg/ml (p<0,001/ ensayo de viabilidad de Rojo Neutro, RN). Luego, las células cargadas con NP-Si (25, 50 µg/ml y 6hs de incubación) se irradiaron con rayos X a dosis variables (0-2Gy). Mediante el ensayo de RN se determinó que para una dosis de 1Gy, la presencia de NP-Si induce un 15-20% más de muerte en comparación con el efecto de la RI en ausencia de NP-Si (p<0,01). Además, se cuantificó la producción de ROS empleando el reactivo CN-H2DCF-DA. Las células se incubaron durante 6hs con NP-Si (50 µg/ml) y se irradiaron con dosis de 0-3Gy. Se observó que la RI sola no produce un aumento significativo de ROS lo cual concuerda con el hecho de que los gliomas son altamente resistentes a la RI. Contrariamente, la adición de NP-Si incrementa la generación de ROS de manera dosis-dependiente alcanzando un aumento del 700% para 3Gy (p<0,001). **Conclusiones:** Estos resultados sugieren que las NP-

Si contribuyen a la muerte celular inducida por la RI a través de la generación de ROS, lo cual permitiría aumentar su eficacia a dosis subterapéuticas.

**036. (266) POLIMORFISMOS EN ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA METABOLIZACIÓN DE XENOBIÓTICOS PODRÍAN PREDECIR LA APARICIÓN DE RECAÍDAS EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA**

Acuña A.<sup>1</sup>; Scorticati C.<sup>2</sup>; De Siervi A.<sup>3</sup>; Mazza O.<sup>4</sup>; Vazquez E.<sup>5</sup>; Cotignola J.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Apoptosis y Cancer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA<sup>1,3,5,6</sup>; Servicio de Urología, Hospital de Clínicas 'José de San Martín'<sup>2,4</sup> alejandrodacu@gmail.com*

Uno de los desafíos más importantes en oncología es predecir la progresión de la enfermedad y la respuesta del paciente a la terapia. El cáncer de próstata (PCa) presenta una alta incidencia a nivel mundial. Las diferencias interindividuales en el fenotipo del tumor, su progresión y respuesta a xenobióticos se deben, al menos en parte, a variaciones en el ADN (polimorfismos genéticos). Por lo tanto, nuestro objetivo es identificar marcadores genéticos que permitan predecir las características del PCa. Hasta agosto de 2010 reclutamos 160 pacientes bajo protocolos aprobados por los Comités de Ética del Hospital de Clínicas y del Hospital Municipal de Vicente López. Se extrajo ADN de linfocitos y se analizaron polimorfismos en 5 genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos. Dos (GSTT1 y GSTM1) se estudiaron por PCR multiplex, y los otros tres (GSTP1, MDR1 y MTHFR) por PCR-RFLP. El análisis estadístico preliminar de 104 muestras mostró que el 76% de los pacientes con tumores de grado de Gleason <7 tenían el genotipo MDR1 c.3435 CC, mientras que solo el 49% tenían los genotipos MDR1 c.3435 CT+TT combinados (p=0,08). También encontramos que los pacientes GSTP p.105 VV presentan una sobrevida libre de recaídas menor que los pacientes con al menos un alelo salvaje (p.105 IV + p.105 II; p=0,03). Al comparar estos mismos genotipos mediante un análisis de regresión logística se encontró que los pacientes con el genotipo GSTP p.105 VV tienen un riesgo significativamente aumentado de recaer (OR=4,6; IC 95%=1,1-19,0; p=0,03). Este riesgo fue aún mayor al incluir el grado de Gleason en un análisis multivariado (OR=6,2; IC 95%=1,1-36,7; p=0,04). Estos hallazgos sugieren que las enzimas MDR1 y GSTP estarían involucradas en la evolución del PCa y garantizan el estudio de más muestras. Estos resultados podrían ayudar a elegir el mejor esquema de seguimiento y tratamiento para cada paciente diagnosticado con PCa; impactando en la calidad y sobrevida de los mismos.

**037. (435) EL MEDIO CONDICIONADO POR UNA LÍNEA DE GRANULOSA BOVINA PERMITE LA PROPAGACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS MURINAS Y CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS Y AUMENTA LA TASA DE PROLIFERACIÓN.**

Losino N.<sup>1</sup>; Solari C.<sup>2</sup>; Luzzani C.<sup>3</sup>; Lino B.<sup>4</sup>; Guberman A.<sup>5</sup>

*Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en el Crecimiento, Supervivencia y Diferenciación Celular, FCEYN, UBA<sup>1,2,3,4,5</sup> losinon@hotmail.com*

La utilización de células madre para tratamiento de diversas patologías se encuentra en creciente estudio. Un factor limitante es su mantenimiento en cultivo preservando su estado pluripotente. Resulta de gran interés encontrar un medio que permita amplificar las células madre embrionarias (CME) y pluripotentes inducidas (CMPI) manteniendo sus propiedades fundamentales. Anteriormente, encontramos que el medio condicionado (MC) por una línea celular de granulosa bovina permite la proliferación de CME murinas (CME<sub>m</sub>) y humanas. Nuestros objetivos son estudiar si el MC permite propagar diferentes líneas de CM manteniendo sus propiedades esenciales y evaluar el efecto del mismo sobre su proliferación. El MC permitió el cultivo en estado indiferenciado

de diferentes líneas de CME m y de CMPI establecidas recientemente en nuestro laboratorio. Las CME m y CMPI propagadas en MC presentaron morfología típica de colonia indiferenciada y expresaron los marcadores de estado indiferenciado Oct4, SOX2, Nanog, Ssea-1, Ecat1, Rex1 y Klf4 determinados por RT-PCR y/o inmunofluorescencia. Para evaluar su capacidad de diferenciación, obtuvimos cuerpos embrioides (CE) a partir de la línea de CME m Ainv15 propagada en MC. Estos presentaron morfología típica de CE y expresaron marcadores de las tres capas embrionarias: blll tubulina (ectodermo), Brachyury y actina de músculo liso (mesodermo), á-fetoproteína (endodermo) y Nkx2.5 y miocardina, (mesodermo cardíaco), determinados por RT-PCR y/o inmunofluorescencia. Por otra parte, las CME m propagadas en MC presentaron colonias de mayor tamaño. Mediante el ensayo de XTT observamos un aumento en la tasa de proliferación. Actualmente, continuamos la caracterización de las diferentes líneas de CM propagadas en MC y estudiamos las vías de transducción de señales y los factores involucrados en los efectos del mismo. Nuestros resultados muestran que el MC puede ser utilizado para propagar CM preservando sus propiedades y aumentando su proliferación.

## HEMATOLOGIA 1

### 038. (142) CÉLULAS DAMI, UN NUEVO MODELO DE BIOGENÉISIS PLAQUETARIA.

Lev P.<sup>1</sup>; Goette N.<sup>2</sup>; Glembotsky A.<sup>3</sup>; Heller P.<sup>4</sup>; Laguens R.<sup>5</sup>; Pozner R.<sup>6</sup>; Marta R.<sup>7</sup>; Molinas F.<sup>8</sup>  
 Sección Hematología Investigación, UE IDIM-CONICET, Inst. de Investigaciones Médicas A. Lanari, UBA<sup>1 2 3 4 7 8</sup>; Departamento de Patología, Universidad Favaloro<sup>5</sup>; División Trombosis 1, Inst. de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina<sup>6</sup>; Sección Hematología Investigación  
 paolal2002@yahoo.com.ar

En un trabajo previo se estudió la capacidad para producir plaquetas (plaq) de la línea celular megacarioblástica DAMI. Las células estimuladas con PMA (25 y 50 nM) producen partículas con características similares a las plaq de sangre periférica humana (SP) (expresión de GPIIb/IIIa y polimerización de actina), pero con baja o nula expresión de GPIb, ausencia de gránulos intraplaquetarios y expresión basal de P-selectina. Para obtener partículas con mayor similitud a las plaq de SP realizamos una estimulación con dosis diarias de PMA (1mM) y TPO (10ng/ml), 7 días y evaluamos las partículas en el día 10 del cultivo. La expresión de GPIIb-IIIa y GPIb en estas condiciones, así como la activación basal fueron similares a lo observado anteriormente. Se detectó la presencia de gránulos a por inmunomarcación y cuantificación de trombospondina (ELISA) en el sobrenadante (SN) de cultivo (52 ng/ml) y gránulos densos por marcación con mepacrine (RFI: 2.4; plaq SP: 4.4). La presencia de ambos tipos de gránulos fue confirmada por microscopía electrónica. Para investigar la causa de la baja expresión de GPIb en la membrana se determinó (citometría de flujo) la cinética de expresión de GPIb y la presencia de su fragmento soluble (glicocalicina) en el SN del cultivo (ELISA). La GPIb de membrana disminuyó (de 24 a 11.1%) al mismo tiempo que aumentó progresivamente la glicocalicina (de 10 a 16 pg/ml). Por otro lado, la presencia de un inhibidor de metaloproteasas (TAPI) aumentó la expresión de GPIb (de 20 a 28%) indicando que la disminución de la expresión de GP se debe a clivaje proteolítico. La expresión de P-sel, marcador de activación plaquetaria, aumentó por estimulación con trombina (de 16 a 22%). La presencia de gránulos y expresión de GPIIb-IIIa y GPIb demuestran la capacidad de la línea celular DAMI de producir plaquetas, que si bien se encuentran activadas basalmente, son capaces de responder a un estímulo, demostrando su funcionalidad.

### 039. (347) EL AUMENTO DE TEMPERATURA INHIBE LAS RESPUESTAS HEMOSTÁTICAS PLAQUETARIAS Y REGULA DIFERENCIALMENTE LA SECRECIÓN DE LOS GRÁNULOS ALFA

Negrotto S.<sup>1</sup>; Etulain J.<sup>2</sup>; Patrucchi S.<sup>3</sup>; Romaniuk M.<sup>4</sup>; Benzadon R.<sup>5</sup>; Schattner M.<sup>6</sup>  
 Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 6</sup>; CEMIC<sup>5</sup>  
 solenegrotto@hematologia.anm.edu.ar

Una de las características del microambiente inflamatorio es el aumento de la T°. Dado que la inflamación se genera, entre otras, como respuesta al daño vascular, la isquemia y al desarrollo tumoral y que las plaquetas son elementos críticos en la patogenia de estas patologías, en este trabajo analizamos el efecto de la T° en la fisiología plaquetaria. Las funciones hemostáticas de la plaqueta incluyendo adhesión, *spreading* (microscopía confocal), unión de fibrinógeno (citometría), agregación, liberación de ATP (lumi-agregometría) y generación de TXB<sub>2</sub> (ELISA) inducidas por trombina (TR 0.05 U/ml) fueron inhibidas en un 70-80% por la incubación previa durante 10 minutos a 40°C\* y completamente bloqueadas a 42°C\*. Por otro lado, la liberación de sustancias de los gránulos alfa fue regulada selectivamente por la T° ya que la expresión de P-selectina a 37°C (citometría) y la liberación de VEGF1 (ELISA) fueron suprimidas a 40°C y 42°C mientras que el FVW (ELISA) y endostatina (ELISA) fueron apenas disminuidos a 40°C y 42°C (Tabla 1). La activación de pERK y pAKT no fue alterada por la T°, la de p38 y de NFκB fue inhibida proporcionalmente al aumento de la misma (Western Blot). Interesantemente, los inhibidores de p38 (SB203580, 50 uM) y de NFκB (BAY117082, 12.5 uM), a diferencia de los de pERK y pAKT, mostraron una acción similar a la de la T° ya que suprimieron la expresión de P-selectina y la liberación de VEGF (98%\* y 87%\* de inhibición) mientras que la liberación de FVW y endostatina fueron levemente inhibidos (21% y 32% de inhibición). En conclusión, un aumento de la T° inhibe las respuestas hemostáticas plaquetarias y regula diferencialmente la secreción de los gránulos alfa por inhibición de la activación de p38 y NFκB. (Tabla 1: Resultados expresados en veces del control. n=3-6, \*p<0.05 vs TR a 37°C, ANOVA).

Tabla 1

	P-Selectina	VEGF	FVW	Endostatina
37°C	6.8±1.5	2.4±1.4	2.3±0.5	8.1±2.1
40°C	2.4±0.6*	1.6±1.0*	2.5±1.4	7.6±1.9
42°C	1.2±1.0*	1.0±0.3*	2.0±1.2	5.3±1.8

### 040. (352) MUERTE PREMATURA DE ERITROCITOS POR EXPOSICIÓN CRÓNICA A ALUMINIO

Vota D.<sup>1</sup>; Nesse A.<sup>2</sup>; Vittori D.<sup>3</sup>  
 Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. CONICET, Argentina.<sup>1 2 3</sup>  
 daiana\_vota@qb.fcen.uba.ar

En trabajos previos hemos encontrado severos signos de anemia sumados a importantes cambios morfológicos de eritrocitos circulantes en ratas sobrecargadas con aluminio (Al) por períodos prolongados. El objetivo del presente trabajo es investigar la acción *in vitro* del Al como inductor de eritropoiesis determinando los mecanismos involucrados en el proceso. Eritrocitos de dadores sanos expuestos a Al durante 21 días sufrieron cambios morfológicos severos detectados por microscopía electrónica y presentaron un significativo incremento de traslocación de fosfatidilserina (PS) detectada por citometría de flujo (CF) mediante la unión de Anexina V-FITC (C 11±3,1%; NaCl 10±2,7%; AlCl<sub>3</sub> 22±4,0%; AlCl<sub>3</sub> vs. C P<0,05, n=4), así como un aumento en los niveles de hemólisis. La exposición crónica a Al generó, en la célula, un ambiente prooxidante. Mediante la técnica de CF se observó aumento de ROS (Intensidad de fluorescencia media geométrica: C 256±27; NaCl 288±3; AlCl<sub>3</sub> 620±45; AlCl<sub>3</sub> vs. C P<0,05, n=4) y una disminución de 60% (n=3) en los niveles de tioles reducidos. La traslocación de PS y el desbalance del equilibrio de óxido-reducción celular observados por efecto tóxico del Al sobre los eritrocitos fue prevenido en presencia del antioxidante N-acetilcisteína (Anexina: AlCl<sub>3</sub> 20±4,1%; NAC+AlCl<sub>3</sub> 7±1,1%; ROS: AlCl<sub>3</sub> 735±90; NAC+AlCl<sub>3</sub> 288±54; NAC+AlCl<sub>3</sub> vs. AlCl<sub>3</sub> P<0,05, n=3) e intensificado en presencia de un ambiente inflamatorio generado por la presencia

de nitritos en los cultivos. Los resultados, que muestran muerte prematura de eritrocitos debido a una exposición prolongada a compuestos de Al, pueden adquirir relevancia clínica ya que recientemente se han reportado niveles de Al que sobrepasan los permitidos en medicamentos y fórmulas para nutrición parenteral. Ello implica problemas potenciales no sólo para la población de pacientes renales sino que involucra también a pacientes pediátricos y, en particular, a neonatos prematuros.

**041. (382) EL ANAGRELIDE (ANA) INHIBE LA MEGACARIOCITO Y TROMBOPOYESIS, REPRODUCIENDO LOS EFECTOS DEL AMP CICLICO EN EL MEGACARIOCITO**  
Glembotsky A.<sup>1</sup>; Marta R.<sup>2</sup>; Espasandín Y.<sup>3</sup>; Lev P.<sup>4</sup>; Goette N.<sup>5</sup>; Molinas F.<sup>6</sup>; Heller P.<sup>7</sup>

UE IDIM CONICET. Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
anaglem@gmail.com

El ANA se utiliza en el tratamiento de la trombocitosis en neoplasias mieloproliferativas. Inhibe la maduración del megacariocito (MK), disminuyendo la producción plaquetaria. Considerando que el inicio de acción es rápido, investigamos si tiene un efecto en la fase final de producción plaquetaria o trombopoyesis. El ANA es un inhibidor de fosfodiesterasas, lo cual induce el aumento de AMPc, pero se desconoce si esta acción es responsable de su efecto en el MK. Para ello, comparamos el efecto del ANA vs un análogo de AMPc (DIB). Se cultivaron CD34+ de cordón umbilical con trombopoyetina y se utilizaron dos protocolos de estimulación con ANA 500µM o DIB 100µM: (A) las drogas se agregaron desde el día 1; (B) luego de completada la maduración del MK (día 12). La inclusión con ANA en protocolo A (n=9) (vs control 100%) indujo una disminución en el % de células CD61+/42b+ (doble positivas), 63.1±33% (p=0.02) y de la fluorescencia (Gm) 42b, 50.8±22% (p=0.0008), sin modificar el %CD61+ ni el tamaño de los MK (FSC, citometría de flujo). Se observó una disminución en la formación de proplaquetas (proplaquetas/10.000 células, microscopio invertido) con ANA vs control (n=3), tanto en A, 154±46 vs 3±3, p= 0.08, como en B, 178.5±57 vs 2.5±1. El análogo de AMPc (n=3) disminuyó (vs control 100%) el % doble positivas, 43±11%, la Gm 42b, 35.8±27% (p=0.0001), el %CD61, 68.7±23%, y las proplaquetas, 219 vs 49. La inhibición de la trombopoyesis contribuiría, junto con el bloqueo ya descrito en la maduración megacariocítica, al efecto inhibitorio del ANA sobre la producción plaquetaria. Este efecto se observó tanto al agregar la droga durante todo el período del cultivo como al final, lo que sugiere un efecto independiente en la megacariocito y trombopoyesis. El ANA semeja el efecto del AMPc en la megacariocito y trombopoyesis, por lo que será de interés determinar si la inhibición de la vía del AMPc interfiere con el efecto del ANA sobre el MK.

**042. (568) LA ACIDOSIS APAGA LA FUNCIÓN HEMOSTÁTICA Y PROMUEVE RESPUESTAS PROINFLAMATORIAS DE LAS PLAQUETAS.**

Etulain J.<sup>1</sup>; Negrotto S.<sup>2</sup>; Malaver E.<sup>3</sup>; Pozner R.<sup>4</sup>; Benzádon R.<sup>5</sup>; Schattner M.<sup>6</sup>  
Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires<sup>1 2 3 4 6</sup> ;  
CEMIC, Buenos Aires, Argentina<sup>5</sup>  
juliaetulain@hotmail.com

La acidosis extracelular es una característica del microambiente inflamatorio presente en situaciones de injuria vascular, isquemia y tumor. Las plaquetas participan en la patogenia de estos procesos y en este trabajo evaluamos el efecto de la acidosis en diferentes respuestas de activación plaquetaria. Los ensayos fueron realizados en plaquetas humanas en buffer a pH 7.4, 7.0 y 6.5 estimuladas con trombina (0.05U/ml). La adhesión a fibrinógeno, *spreading*, (microscopía confocal), activación de la GPIIb/IIIa (unión de PAC-1 y de fibrinógeno, citometría), movilización de calcio (citometría), generación de TXB<sub>2</sub> (ELISA) y la agregación fueron significativamente inhibidas por el descenso del pH (p <0.05, n=4-8). Por otro lado, la secreción del contenido de los gránulos alfa fue diferencial, mientras que la liberación de Factor

von Willebrand (FvW), factor de crecimiento vascular (VEGF) y endostatina (ELISA) fue menor en acidosis, la expresión de P-Selectina y CD40L (citometría) (favorecen la interacción de las plaquetas con leucocitos polimorfonucleares (PMN) y el endotelio) aumentó o no fue afectada respecto a pH 7.4 (Tabla 1).

Tabla 1 (veces del control sin estimular). \*P<0.05 vs pH 7,4; #P<0.05 vs pH 7,0 (n=5)

	FvW	VEGF	Endostatina	P-Selectina	CD40L	Plq-PMN
pH 7.4	2.9±0.1	5.4±0.1	3.1±0.1	4.3±0.1	4.5±0.1	4.2±0.2
pH 7.0	2.4±0.1*	4.0±0.1*	2.0±0.1*	6.7±0.1*	4.3±0.1	8.5±0.2*
pH 6.5	2.0±0.1*#	2.9±0.1*#	1.2±0.1*#	5.5±0.1*	4.0±0.1	4.2±0.2#

En concordancia, la formación de agregados entre plaquetas-PMN y el aumento de la sobrevida de PMN mediada por plaquetas fue mayor a pH 7.0 respecto a pH 7.4. La acción del medio ácido no fue específica de la trombina ya que resultados similares se obtuvieron en plaquetas estimuladas con colágeno. Estos hallazgos indican que el descenso del pH regularía negativamente la capacidad hemostática de las plaquetas favoreciendo la expresión en su superficie de moléculas que promueven la respuesta inflamatoria.

## METABOLISMO Y NUTRICION 1

**043. (65) RESISTENCIA A LA INSULINA, METABOLISMO LIPOPROTEICO ALTERADO Y AUMENTO DEL RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON SOBRECARGA DE HIERRO**

Meroño T.<sup>1</sup>; Gómez Rosso L.<sup>2</sup>; Sorroche P.<sup>3</sup>; Boero L.<sup>4</sup>; Arbelbide J.<sup>5</sup>; Brites F.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas Dpto de Bioquímica Clínica Facultad de Farmacia y Bioquímica INFIBIOC UBA<sup>1 2 4 6</sup> ; Laboratorio Central Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>3</sup> ; Servicio de Hematología Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>5</sup>  
tomasmero@yahoo.com.ar

La sobrecarga de hierro (SH) se define como un aumento del hierro corporal. Hasta el momento, es controvertido si esta condición se haya vinculada con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. El objetivo del estudio fue evaluar marcadores de insulino-resistencia, el perfil lipoproteico, la actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con SH. Veinte pacientes masculinos con SH fueron estudiados en comparación con 20 hombres controles pareados por edad. Se determinaron parámetros bioquímicos generales, los niveles de LDL oxidadas y las actividades de paraoxonasa 1 (empleando paraoxón (PON) y fenilacetato como sustratos), CETP y fosfolipasa A<sub>2</sub> asociada a lipoproteínas (Lp-PLA<sub>2</sub>). Los pacientes con SH presentaron aumento de insulina, HOMA y triglicéridos (mediana[rango intercuartil]) (128[93-193] vs. 79[51-91]mg/dl, p<0.0005) y disminución del colesterol-HDL (media±desvío estándar) (41±9 vs. 52±10mg/dl, p<0.0005) respecto al grupo control. Más aún, el índice triglicéridos/colesterol-HDL (3.2[2.0-5.1] vs. 1.5[1.0-1.9], p<0.0005) y los niveles de LDL oxidadas fueron mayores en los pacientes con SH (94[64-103] vs. 68[59-70]µmol/ml, p<0.05). La actividad PON (246[127-410] vs. 428[263-516]nmol/ml.min, p<0.05) se encontró disminuida, mientras que las actividades de CETP (189±31 vs. 155±36%/ml.h, p<0.005) y de Lp-PLA<sub>2</sub> (10.1±2.9 vs. 8.2±2.4µmol/ml.h, p<0.05) aumentadas. La concentración de ferritina correlacionó con ciertas alteraciones descriptas al ajustar por factores confundentes. Análisis de regresión múltiple identificaron al HOMA como predictor independiente de la actividad de CETP (B=65.9, p<0.0001, r<sup>2</sup>=0.35), mientras que la ferritina lo fue para la actividad de Lp-PLA<sub>2</sub> (B=3.7, p<0.0001, r<sup>2</sup>=0.40). En conclusión los pacientes con SH no solo presentaron resistencia a la insulina, sino también alteraciones relacionadas al aumento de hierro, asociadas a elevado riesgo cardiovascular.

**044. (268) ECUACIONES DE PREDICCIÓN VALIDADAS DE MASA GRASA EN NIÑOS DE EDAD ESCOLAR EN ARGENTINA MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE AGUA MARCADA CON DEUTERIO.**

Tarducci G.<sup>1</sup>; Vidueiros S.<sup>2</sup>; Tachdjian C.<sup>3</sup>; Morea G.<sup>4</sup>; Bardach A.<sup>5</sup>; Amalia P.<sup>6</sup>; Pallaro A.<sup>7</sup>;  
Programa de Prevención del Infarto en Argentina Universidad de La Plata<sup>1 4 5 6</sup>; Cátedra de Nutrición Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires<sup>2 3 7</sup>  
apallaro@ffyb.uba.ar

**Introducción.** Medir la composición corporal mediante métodos validados de bajo costo y fácil aplicación resulta indispensable para diagnóstico clínico y para evaluar el impacto de programas de intervención. No existen antecedentes en Argentina de ecuaciones de predicción de masa grasa (MG), obtenidas por mediciones sencillas antropométricas (A) o de bioimpedancia eléctrica (BIA), utilizando como validación el método de dilución isotópica con deuterio (DI). **Objetivos.** 1. Estudiar la MG de un grupo de niños escolares argentinos por BIA y A. 2. Desarrollar y validar ecuaciones de predicción de MG por BIA y A usando DI como patrón. **Métodos.** Se evaluaron 152 niños de ambos sexos de 5 a 9 años. Mediciones realizadas: peso, talla, pliegues e impedancia a 200 omhs. El porcentaje de masa grasa (%MG) por pliegues cutáneos se obtuvo por la ecuación de Deurenberg (PC). Se calculó el Índice de Resistencia (IR: Impedancia/ Talla<sup>2</sup>), Masa Corporal Libre de Grasa (MCLG) y MG por diferentes ecuaciones disponibles en la literatura. Se realizaron estudios estadísticos de asociación de variables y análisis de regresión múltiple para obtener 2 modelos de predicción de la MG por BIA y por A. Para establecer concordancia entre la MG obtenida por DI y la MG predicha por el modelo A se aplicó el Test de Bland & Altman y calculó el Coeficiente de correlación de la regresión r. **Resultados.** %MG por PC: 23,30±4,60; %MG por BIA: 17,83-28,39 para las diferentes ecuaciones. Se obtuvieron 2 modelos validados de predicción de masa corporal: 1) por A (MG(kg) = -5,36+0,31\*peso+0,35\*pliegue del tríceps, r 0.91) y 2) por BIA (MCLG(kg) = 3,61+0,29\*IR+0,31\*peso, r 0.82). **Conclusiones.** Se obtuvo una ecuación validada para antropometría utilizando sólo un pliegue, lo que facilita la aplicabilidad en terreno y reduce el error introducido por el evaluador. Para la ecuación de predicción que usa BIA, se utilizó el Índice de Resistencia como variable asociada.

**045. (343) FACTORES PRO-INFLAMATORIOS CIRCULANTES EN HÍGADO GRASO NO-ALCOHÓLICO ASOCIADO A SÍNDROME METABÓLICO.**

Lucero D.<sup>1</sup>; Zago V.<sup>2</sup>; López G.<sup>3</sup>; Miksztoiwicz V.<sup>4</sup>; Graffigna M.<sup>5</sup>; Meroño T.<sup>6</sup>; Berg G.<sup>7</sup>; Brites F.<sup>8</sup>; Fainboim H.<sup>9</sup>; Wikinski R.<sup>10</sup>; Schreier L.<sup>11</sup>  
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-Dpto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica-INFIBIOC-Uba<sup>1 2 4 6 7 8 10 11</sup>; Cátedra de Bioanalítica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur<sup>3</sup>; División Endocrinología, Hospital Durand<sup>5</sup>; Unidad de Hepatología, Hospital Muñiz<sup>9</sup>  
diego\_lucero81@hotmail.com

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) es otro componente del síndrome metabólico (SM) el cual se relaciona con un estado inflamatorio crónico y mayor riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica. **Objetivo:** Evaluar el cuadro pro-inflamatorio circulante en EHGNA asociada a SM. Estudiamos 70 pacientes con SM (ATPIII). Se les realizó ecografía abdominal por único operador y los pacientes fueron divididos en dos grupos de acuerdo a la presencia (grupo A, n=46) o ausencia (grupo B, n=24) de esteatosis hepática simple. En suero extraído en ayunas se midió perfil lipídico, VLDL y subfracciones remanentes, ácidos grasos libres (AGL), adiponectina, TNF- $\alpha$ , PCRhs, VCAM-1 e ICAM-1. Tanto los triglicéridos como AGL fueron mayores en el grupo A (p<0,05), sin diferencias en la proporción de remanentes de VLDL con potencialidad pro-inflamatoria. Adiponectina fue menor en el grupo A (media±DE: 6.7±2.4 vs. 9.0±6.2  $\mu$ g/ml;

p=0.04) aún después de ajustar por HOMA-IR, mientras que PCR-hs fue más alta en presencia de EHGNA (mediana, rango: 2.2, 0.3-9.3 vs. 1.2, 0.1-3.7 mg/l, p<0.02). No hubo diferencias significativas en TNF- $\alpha$ , VCAM-1 ni en ICAM-1. Sin embargo, PCR-hs correlacionó con todos los marcadores pro-inflamatorios: TNF- $\alpha$  (r=0.34, p<0.02), VCAM-1 (r=0.29; p<0.03), ICAM-1 (r=0.56; p<0.01), adiponectina (r=-0.34; p=0.04) y AGL (r=0.35; p<0.05). Se observaron correlaciones opuesta entre AGL y TNF- $\alpha$  (r=0.36; p<0.04) y entre AGL y adiponectina (r=-0.40; p<0.03), aún después de ajustar por factores de IR. La presencia de EHGNA constituiría una condición inflamatoria crónica, independiente de la IR, representada por elevada PCRhs y baja adiponectina, promovida, en parte, por el incremento en el flujo de AGL desde el tejido adiposo hacia el hígado.

**046. (344) CUADRO METABÓLICO-INFLAMATORIO EN ESTADIO 5 DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN HEMODIÁLISIS: SITUACIÓN PARADÓJICA**

Cacciagiú L.<sup>1</sup>; Gonzalez A.<sup>2</sup>; De marziani G.<sup>3</sup>; Lucero D.<sup>4</sup>; López G.<sup>5</sup>; Ceccone D.<sup>6</sup>; Elbert A.<sup>7</sup>; Schreier L.<sup>8</sup>  
Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica - INFIBIOC, Uba<sup>1 2 4 5 8</sup>; Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial<sup>6 7</sup>  
leodamian2000@hotmail.com

La enfermedad renal crónica (ERC) se vincula con la insulino-resistencia (IR), inflamación crónica y aterosclerosis. Previamente evaluamos pacientes con ERC estadio 5 en hemodiálisis (HD) con diabetes tipo 2 (DBT) que presentaban mayores alteraciones en las lipoproteínas y enzimas involucradas con respecto a los no diabéticos (noDB). El objetivo actual es evaluar, en el mismo diseño, parámetros proinflamatorios y presencia de enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHNA) como otra manifestación de IR. Se incluyeron 28 pacientes HD-DBT que fueron pareados en sexo (F/M 14/14) y edad (45 a 82 años) con 28 HDnoDB de etiología variada; los tiempos de hemodiálisis fueron similares entre grupos. Se determinaron parámetros metabólico-lipídicos y proinflamatorios: PCRhs y adiponectina (Adp). Se realizó ecografía abdominal por único observador para detectar EHNA. Los resultados no evidenciaron diferencias relevantes en el perfil lipídico. La insulinoemia fue elevada en ambos grupos: (HD-DBT -tratados sin insulina-: 14,4±6,4 y HDnoDB 14,5±9,9 mU/L) y HOMA (4,0±2,7 y 2,7±2,2 p=0,06). Según la clasificación de Ridker PCRhs mostró valores aumentados en ambos grupos sin diferencias entre ellos (6,8±3,9 y 7,9±6,9 mg/L p=0,20). La Adp no descendió en ningún grupo (17314±7009 y 18127±7347 ng/mL p=0,35) siendo la correlación con ácidos grasos libres directa sin alcanzar significancia estadística (r= 0,22; p=0,1) lo cual no fue compatible con la esperada asociación inversa y significativa entre Adp y ácidos grasos libres. En HD-DBT no se encontró incremento en la frecuencia de EHNA en comparación con HDnoDB (21% y 15% p=0,82) ambos con cifras similares a la prevalencia en la población general, probablemente por la acción hepatoprotectora de Adp en relación a la acumulación grasa. La Adp elevada y la baja frecuencia de EHNA, ante el aumento de PCRhs e IR, determinarían una situación paradójica en la ERC estadio 5 en hemodiálisis.

**047. (460) LIPASA ENDOTELIAL Y LIPASA HEPÁTICA EN INSULINO RESISTENCIA. ACTIVIDAD Y REGULACIÓN.**

Miksztoiwicz V.<sup>1</sup>; Lucero D.<sup>2</sup>; Cacciagiú L.<sup>3</sup>; Zago V.<sup>4</sup>; Schreier L.<sup>5</sup>; Berg G.<sup>6</sup>  
LAB Lípidos y Lipoproteínas. Dpto Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
veronicamik@ffyb.Uba.ar

La Insulino Resistencia (IR) se caracteriza por presencia de lipoproteínas modificadas como VLDL, sus remanentes, LDL pequeña y densa (pyd), y disminución de HDL. La lipasa hepática (LH) y lipasa endotelial (LE) intervienen en el catabolismo de lipoproteínas hidrolizando triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL). Existen controversias en el comportamiento y regulación de LH y LE en IR. Modificaciones en su actividad condicionaría el tipo

de lipoproteínas circulantes y su aterogenicidad. Objetivos: Evaluar actividad de LH y LE como FL- y TG-hidrolasa en plasma postheparínico (PPH) de pacientes con y sin IR (evaluada por presencia o no de síndrome metabólico (SM) según ATP-III). Se estudiaron 34 pacientes, 23 con SM y 11 controles sanos. En suero se evaluó perfil lipídico-lipoproteico, glucosa, insulina (Immulate), adiponectina (ELISA), por ultracentrifugación se aisló y caracterizó lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y LDLpyd. Se obtuvo PPH 10 minutos post-inyección endovenosa de 60UI heparina/Kg y se midió actividad de LH como TG- y FL-lipasa y actividad de LE como FL-lipasa. Los pacientes con IR, presentaron mayor HOMA (5,46 vs 1,76 p<0.01), % de LDL pyd (31.6 vs 17.4 p<0.01), y actividad de LH como TG-hidrolasa (17,1 vs 12,4 mmol ácidos grasos/ml PPH.h p<0.05) y menor col-HDL (40 vs 55 mg/dl p<0.01) y adiponectina (6471 vs 13317 ng/ml). No se observaron diferencias en LH y LE como FL-lipasas entre grupos. LH como TG-hidrolasa correlacionó significativamente con LDLpyd (r=0.42, p<0.05); TG-IDL (r=-0.58 p<0.01); col-IDL (r=-0.57, p<0.01) y con HOMA (r=0.48, p<0.04) y mostró tendencia con adiponectina (r=-0.37, p=0.06). LE correlacionó inversamente con col-HDL (r=-0.32, p<0.05) y con adiponectina (r=-0.45, p<0.05). LH como TG-hidrolasa es responsable, no sólo del catabolismo de IDL sino también de LDL, aumentando su aterogenicidad en IR. LE sería responsable del catabolismo de HDL, promoviendo su disminución, y la adiponectina modularía su acción.

**048. (738) ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO +3725G/C EN EL GEN TLR4 CON FENOTIPO PROTECTOR PARA SÍNDROME METABÓLICO.**

Penas Steinhardt A.<sup>1</sup>; Tellechea M.<sup>2</sup>; Gómez Rosso L.<sup>3</sup>; Aranguren M.<sup>4</sup>; Brites F.<sup>5</sup>; Frechtel G.<sup>6</sup>; Poskus E.<sup>7</sup>  
*Instituto de Inmunología de la Inmunidad Humoral IDEHU CONICET/UBA Argentina<sup>1,7</sup>; Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), Argentina.<sup>2</sup>; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, dpto de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), Argentina<sup>3,5</sup>; División Diabetología, Hospital de Clínicas "José de San Martín" (UBA), Argentina<sup>4</sup>; División Genética, Hospital de Clínicas "José de San Martín" (UBA), Argentina<sup>6</sup>*  
 pufo\_@hotmail.com

El gen TLR4 (Toll-Like Receptor 4) juega un rol clave en la activación de la respuesta inmune innata. La pérdida de su función previene la obesidad y la insulino resistencia inducida por dieta. Recientemente se describió el polimorfismo(SNP) +3725GC en su 3'UTR con posibles implicancias en la regulación de la expresión del gen. Se exploró la posible asociación entre dicho SNP y variables metabólicas relacionadas a Síndrome Metabólico (SM), insulino-resistencia e inflamación en individuos sin antecedentes patológicos conocidos. Se reclutaron 782 hombres adultos no emparentados, donantes de sangre en el Hospital de Clínicas (UBA), los que fueron sometidos a exámenes antropométricos, clínicos y genotipificación del SNP. La frecuencia de genotipos fue GG 79,4%(n=621), GC 18,7%(n=146) y CC 1,9%(n=15), respetando Hardy-Weinberg (P=0,07). La prevalencia de normopesos fue mayor en portadores del genotipo CC (53%), que en los GG+GC (23%) (P=0,007), OR=0,26 [IC 95% 0,09-0,74]. Se encontró significativamente disminuida la circunferencia de cintura en homocigotas para el alelo C (p=0,03). Estos presentaron significativamente aumentados los niveles de adiponectina (p=0,02) y disminuidos los niveles de PCR (p=0,03). Finalmente, encontramos diferencias significativas en la prevalencia del genotipo CC entre el grupo SM y aquellos sin ningún componente de SM (p=0,01), OR=0,1 [IC 95% 0,02-0,64]. El genotipo CC del SNP +3725GC del TLR4 ha sido asociado por primera vez a variables metabólicas cuyos valores demostraron ser protectores para desarrollo de SM. La posible inestabilidad del ARNm debido a su presencia determinaría una menor expresión del receptor, definiendo un factor de protección para el estado inflamatorio subclínico sistémico presente en la fisiopatogenia de obesidad y alteraciones metabólicas asociadas. Dichos resultados son congruentes con estudios en modelos animales que muestran que su invalidación previene sobrepeso y alteraciones metabólicas asociadas.

## ONCOLOGIA 1

**049. (108) ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTITUMORAL DE COMPUESTOS ACTIVOS DE UN EXTRACTO DE ROSMARINUS OFFICINALIS L. SOBRE LÍNEAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON HUMANO**

Barni M.<sup>1</sup>; Carlini M.<sup>2</sup>; Caferatta E.<sup>3</sup>; Puricelli L.<sup>4</sup>; Moreno S.<sup>5</sup>

*Fundación Instituto Leloir<sup>3,5</sup>; Instituto de Oncología Ángel H. Roffo<sup>2,4</sup>*  
 mbarni@leloir.org.ar

Hoy en día existe una exhaustiva búsqueda de nuevos activos antitumorales más eficaces y menos tóxicos. Se conoce que los bioactivos mayoritarios, presentes en extractos orgánicos de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), presentan acciones farmacológicas como antioxidantes y antiproliferativos. Este trabajo tiene como objetivo estudiar la acción antitumoral de ciertos polifenoles no-volátiles, como el ácido carnósico (CA), componente del extracto de romero (RE), evaluando su efecto inhibitorio sobre procesos tumorales como migración celular y proteólisis de la matriz extracelular en tres líneas de adenocarcinoma de colon humano con distintos background genético [Caco2 (p53<sup>wt</sup>), LoVo (p53<sup>wt</sup>) y HT29 (p53<sup>mut</sup>)]. Se propuso estudiar la actividad antiproliferativa de los compuestos vegetales sobre las líneas celulares tumorales mediante curvas dosis respuesta evaluando la citotoxicidad celular con el reactivo de MTS. Se evaluó la capacidad migratoria de la línea Caco2 tratada con CA empleando un ensayo de cicatrización de heridas y la capacidad proteolítica de moléculas que degradan la matriz extracelular, como metaloproteasas (MMP), por el ensayo de zimografía cuantitativa. Se determinó que el CA es el compuesto más activo del RE y que las dosis efectivas que inhiben el 50% de la proliferación celular (ED<sub>50</sub>) para las tres líneas son: Caco2: CA = 30,38 ± 2,13 µg/ml, HT29: CA = 16,00 ± 4,6µg/ml y LoVo: CA = 8,74 ± 0,91µg/ml. La dosis de CA 16 µg/ml inhibió un 50% la migración celular y la actividad proteolítica de la MMP-9 de la línea celular Caco2 (p<0,01). Estos resultados sugieren que ciertos polifenoles activos del romero son capaces de modular procesos tumorales en líneas de adenocarcinoma de colon independientemente del estado mutacional de p53, evidenciando un potencial terapéutico como agentes antitumorales.

**050. (327) NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA PARA EL CÁNCER DE PRÓSTATA: ENSAYOS PRE-CLÍNICOS DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE FLAVOPIRIDOL Y CPS49 (ANÁLOGO DE LA THALIDOMIDA).**

Zalazar F.<sup>1</sup>; De Luca P.<sup>2</sup>; Elguero M.<sup>3</sup>; Moiola C.<sup>4</sup>; Cotignola J.<sup>5</sup>; Vazquez E.<sup>6</sup>; De Siervi A.<sup>7</sup>

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

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Las terapias actualmente en uso para la etapa de resistencia a la castración hormonal no son efectivas. El Flavopiridol (Fp) es un potente inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) con probada eficacia antiproliferativa, que está siendo utilizado como terapia en PCa metastásico en ensayos clínicos. El CPS49 inhibe el crecimiento tumoral en xenógrafos de PCa independiente de andrógenos y posee actividad antiangiogénica. Previamente reportamos que la combinación de estas drogas induce la citotoxicidad selectiva en células leucémicas asociada a una disfunción mitocondrial. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la combinación del Fp y el CPS49 para el tratamiento del PCa. Ensayos de MTS en varias líneas tumorales de próstata mostraron que la viabilidad celular se redujo más del 50% cuando las células PC3 y C4-2 se sensibilizaron con un tratamiento con Fp (0,2µM) previo a la administración combinada de ambas drogas (2,5µM). Asimismo, este tratamiento no fue efectivo en las líneas tumorales de próstata LNCaP y 22Rv1, sugiriendo que este tipo de terapia podría ser selectiva para algunos subtipos

de tumores de próstata. En base a esto, inoculamos células PC3 ( $5 \times 10^6$  células) en el flanco derecho de ratones *nu/nu*, y luego de la aparición de los tumores, los animales recibieron i.p. el tratamiento con Fp (2 mg/kg/día) seguido de la combinación de drogas (6m g/Kg/día de cada una). Así, determinamos que el volumen tumoral se redujo en forma significativa con respecto a los animales tratados con el vehículo ( $1090 \text{ mm}^3$  control vs.  $570 \text{ mm}^3$  tratado,  $p=0,06$ ). Estudios a nivel molecular por RT-qPCR identificaron la represión de la expresión de varios genes involucrados en el ciclo celular (SFN, BRCA1, BRCA2, Ciclina B2, MAD2L1, E2F1, Ciclina D1). Estos resultados proponen una nueva alternativa terapéutica para el estadio incurable del PCa.

**051. (449) LA METALOTIONEÍNA 1G (MT1G) COMO POSIBLE GEN SUPRESOR TUMORAL EN CÁNCER COLORRECTAL HUMANO**

Arriaga J.<sup>1</sup>; Levy E.<sup>2</sup>; Alonso A.<sup>3</sup>; Bravo A.<sup>4</sup>; Rocca Y.<sup>5</sup>; Roberti M.<sup>6</sup>; Aris M.<sup>7</sup>; Greco á.<sup>8</sup>; Zucchini C.<sup>9</sup>; Mordoh J.<sup>10</sup>; Bianchini M.<sup>11</sup>

Centro de Investigaciones Oncológicas de La Fundación Cáncer CIO-FUCA<sup>1 2 3 5 6 11</sup>; HIGA, Eva Perón, San Martín, Provincia De Buenos Aires<sup>4</sup>; Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CONICET, Ciudad de Buenos Aires<sup>7 10</sup>; Operative Unit 'Molecular Mechanisms of Cancer Growth and Progression', Department of Experimental Oncology, Fondazione IRCCS 'Istituto Nazionale dei Tumori', Italy<sup>8</sup>; Dipartimento di Istologia, Embriologia e Biologia Applicata - Università di Bologna - Bologna - ITALIA<sup>9</sup>  
jm\_arriaga@yahoo.com.ar

Las metalotioneínas (MTs) son una familia de pequeñas proteínas ricas en cisteína, capaces de regular una gran variedad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos asociados al estrés. Previamente demostramos la sub-expresión de las 9 isoformas funcionales de esta familia en el epitelio de tumores colorrectales con respecto a la mucosa colónica normal, así como también hemos caracterizado su perfil de expresión en 5 líneas celulares de cáncer colorrectal. Siendo la metalotioneína 1G (MT1G) la isoforma más sub-expresada a nivel tumoral, hemos decidido estudiar de su posible rol pronóstico y funcional sobre los tumores colorrectales. A nivel pronóstico, realizamos un análisis de "clustering" (agrupamiento) no supervisado sobre la expresión (medida por qRT-PCR) de las metalotioneínas en 16 epitelios microdisecados de piezas quirúrgicas tumorales, encontrando que la MT1G es la única isoforma cuyo nivel de expresión tiene una tendencia a poder diferenciar los tumores de estadios tempranos (I y II) de los avanzados (III y IV). A nivel funcional, sobre-expresamos dicha proteína utilizando el vector de expresión pcDNA 3.1 en la línea celular T84, (carente de todas las isoformas de MTs) con el fin de determinar su efecto sobre la inducción de apoptosis (medida por la técnica de anexina V-FITC-FACS), sobre el ciclo celular (ioduro de propidio-FACS), proliferación celular (ensayo de MTT), el tamaño de colonias formadas y su capacidad de crecimiento libre de anclaje. Notamos que la inducción de dicha proteína produjo un aumento significativo ( $p=0,01$ ) del 50% del número de células en apoptosis con respecto al control, un enlentecimiento de la curva de crecimiento celular, y un menor número y tamaño de colonias ( $p=0,0002$ ). Así, dado que la pérdida de la expresión de MT1G les conferiría a las células tumorales una mayor capacidad de crecimiento, postulamos por primera vez su papel como gen supresor tumoral en cáncer colorrectal.

**052. (454) CARACTERIZACIÓN IN VIVO E IN VITRO DE UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA HUMANO TRIPLE NEGATIVO Y DE SU VARIANTE METASTÁSICA**

Roberti M.<sup>1</sup>; Quintá H.<sup>2</sup>; Arriaga J.<sup>3</sup>; Bravo A.<sup>4</sup>; Mordoh J.<sup>5</sup>; Barrio M.<sup>6</sup>

Centro de Investigaciones Oncológicas, Fundación Cáncer FUCA<sup>1 3 5 6</sup>; IBYME/CONICET<sup>2</sup>; Hospital Interzonal General de Agudos Eva Perón<sup>4</sup>; Fundación Instituto Leloir-IIBBA CONICET  
paularoberti@CONICET.gov.ar

Las variantes de cáncer de mama humano que no expresan RE, RPg ni HER-2 (triple negativas -TN), son las más agresivas y aún no se cuenta con tratamientos adecuados. La línea celular IIB-BR-G fue aislada a partir de un tumor primario humano TN y su variante metastásica (MT), generada espontáneamente luego de trasplantes sucesivos en ratones nude, desarrolla metástasis (mts) en ganglios linfáticos. Nuestro objetivo fue analizar diferencias entre ambas líneas celulares evaluando *in vitro* e *in vivo* el crecimiento, capacidad invasiva, capacidad linfangiógena y diferencias estructurales del citoesqueleto. Los tiempos de duplicación *in vitro* fueron de 30.5 hr para IIB-BR-G y 55.3 hr para MT. El índice clonogénico en agar blando fue mayor para MT ( $p<0,0001$ ), que también presentó mayor velocidad de crecimiento *in vivo* que IIB-BR-G ( $p<0,0001$ ). El 100% de los ratones inoculados con MT desarrollaron mts en ganglios linfáticos a las 5-6 semanas, pero no se observaron mts en el caso de IIB-BR-G, aún después de 19 semanas. Aunque IIB-BR-G presentó mayor migración *in vitro*, MT presentó mayor capacidad invasiva en matrigel ( $p<0,05$ ), con medio de cultivo con SFB como quimioattractante. Ambas líneas celulares fueron capaces de transmigrar a través de endotelios linfáticos *in vitro* y mostraron expresión de VEGF-C *in vivo* e *in vitro* por RTqPCR. Se evaluaron los vasos linfáticos en los tumores (IHQ para Podoplanina), observándose para MT mayor invasión linfática local en el tumor s.c. Ambas líneas presentaron expresión del filamento intermedio Vimentina por western blot y microscopía confocal, aunque su expresión fue mayor para MT relativizada al área celular ( $p<0,05$ ). Vimentina se localizó principalmente a nivel de extremidades celulares en MT por análisis de superficie 3D. La mayor capacidad invasiva de MT sugiere la secreción de metaloproteasas, factores linfangiógenos y cambios en la estructura del citoesqueleto del tipo de transición epitelio-mesenquimal.

**053. (455) ROL DEL COMPLEJO NUCLEAR RP-REá-AIB1 MODULADO POR PROGESTÁGENOS EN CÁNCER DE MAMA EXPERIMENTAL.**

Giulianelli S.<sup>1</sup>; Gorostiaga M.<sup>2</sup>; Lanari C.<sup>3</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>2 3</sup>  
giulianelli@dna.uba.ar

Hemos demostrado que los receptores de estrógenos *alfa* (REá) interaccionan con la isoforma A del receptor de progesterona (RP<sub>A</sub>) en el núcleo de células de cáncer de mama humano T47D, y en células epiteliales de carcinomas mamarios murinos C4-HD o C4-HI, estimuladas con acetato de medroxiprogesterona (MPA). Los estrógenos, los antiestrógenos y los antiprogestágenos, como el RU486, inhiben el crecimiento tumoral en el modelo murino. Mientras que los 2 primeros bloquean la asociación nuclear entre REá y RP<sub>A</sub>, el RU486 muestra efectos agonistas induciendo la asociación de ambos receptores en el núcleo celular. El objetivo de este trabajo fue evaluar la participación de la isoforma B del RP (RP<sub>B</sub>) en la interacción nuclear con el REá, e investigar el rol del coactivador de la transcripción AIB1 en células estimuladas con MPA o inhibidas con RU486. Por inmunofluorescencia y microscopía confocal, demostramos que el tratamiento con MPA (10nM) por 10 ó 30 minutos, incrementó la colocalización nuclear entre RP<sub>B</sub>, fosforilado en Ser162 y la pSer118 REá ( $p<0,001$ ) en células murinas, ó entre la pSer162 RP<sub>B</sub> con el REá total en células T47D ( $p<0,001$ ). Ensayos de coimmunoprecipitación a partir de extractos nucleares, corroboraron la interacción entre ambas isoformas del RP con el REá. Además, el MPA incrementó la interacción nuclear entre la pSer294 RP, y el REá con el coactivador AIB1 ( $p<0,001$ ) en células tumorales murinas, mientras que el RU486, a pesar de no inhibir la interacción entre RP y REá, sí bloqueó la interacción entre RP y AIB1. Los resultados indican que el complejo nuclear formado entre ambas isoformas del RP, con el REá y con AIB1, sería importante para activar respuestas proliferativas mediadas por MPA. Nuestros datos sugieren que el efecto antagonista del RU486 en el modelo murino, está relacionado con la falta de asociación del complejo RP-RE con AIB1.

**054. (458) INHIBIDORES DE HDAC Y DNMT SENSIBILIZAN A CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS A LA TERAPIA CON ANTIPROGESTÁGENOS.**

Wargon V.<sup>1</sup>; Lanari C.<sup>2</sup>



Instituto de Biología Y Medicina Experimental<sup>1, 2</sup>  
wargon@dna.uba.ar

A partir de carcinomas mamarios murinos hormono-dependientes se generaron variantes hormono-independientes sensibles al tratamiento con antiprogéstágenos, caracterizadas por expresar mayor proporción de isoforma A del receptor de progesterona (RPA) que de isoforma B (RPB), y variantes con resistencia *de novo* a dicho tratamiento, con mayor expresión de RPB que de RPA. Hemos demostrado que en estos últimos, la expresión de RPA está silenciada por metilación de su promotor. El tratamiento con el agente desmetilante 5azadC, indujo la reexpresión de RPA sensibilizando a los tumores al tratamiento con antiprogéstágenos. El objetivo de este trabajo fue: (a) estudiar los niveles de expresión de la histona deacetilasa 1 (HDAC1) por *western blot* e inmunohistoquímica en los tumores sensibles (59-2-HI) y en los resistentes *de novo* (59-HI), y (b) evaluar si el tratamiento combinado de 5azadC con el inhibidor de HDAC1, TSA, resulta más efectivo que el 5azadC solo para sensibilizar a los tumores al antiprogéstágeno RU-486. Los tumores 59-HI expresaron mayores niveles de HDAC1 que los 59-2-HI ( $p < 0,01$ ). Asimismo, se trataron ratones hembra BALB/c portadoras de tumores 59-HI subcutáneos, palpables, durante 2 semanas. Observamos una mayor inhibición del crecimiento tumoral con el tratamiento combinado de 5azadC + TSA (ambos 1mg/kg/día por medio) + RU-486 (12mg/kg/día), que con el tratamiento de 5azadC + RU-486 ( $p < 0,01$ ), que también resultó inhibitorio respecto a los tumores control ( $p < 0,01$ ). Los tratamientos con TSA, 5azadC, 5azadC + TSA o RU-486, no resultaron inhibitorios. En conclusión hemos logrado revertir la resistencia *de novo* a antiprogéstágenos mediante un agente desmetilante y un inhibidor de las HDAC, sugiriendo que en estos tumores la expresión de RPA está regulada no sólo por metilación de su promotor sino también por acetilación de histonas.

## FARMACOLOGIA 1

### 055. (358) EFECTO ANTIHELMÍNTICO IN VITRO E IN VIVO DEL TAMOXIFENO SOBRE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS: MECANISMO DE ACCIÓN DUAL DEPENDIENTE DE LA DISRUPCIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL CALCIO E INHIBICIÓN DE LA GLICOPROTEÍNA-P.

Nicolao M.<sup>1</sup>; Maggiore M.<sup>2</sup>; Pensel P.<sup>3</sup>; Fernández M.<sup>4</sup>; Denegri G.<sup>5</sup>; Elissondo M.<sup>6</sup>; Cumino A.<sup>7</sup>  
Universidad Nacional de Mar del Plata<sup>1, 3, 4</sup>; Universidad Nacional de Mar del Plata; ANPCyT<sup>2</sup>; Universidad Nacional de Mar del Plata; CONICET<sup>5, 6, 7</sup>  
celestenicolao@hotmail.com

El tratamiento quimioterapéutico de la hidatidosis indispensable y/o alternativo a las recurrentes cirugías sigue sin resolverse. Reportes previos (Cumino 2009; 2010) han demostrado que la modulación exógena de Ca<sup>2+</sup> o modificación de su señal, alteran la viabilidad del estadio larval por pérdida de la homeostasis del ión en el cestode. El objetivo de este trabajo fue realizar estudios farmacológicos con moduladores de Ca<sup>2+</sup> aprobados para uso *in vivo*, para diseñar esquemas terapéuticos en humanos. Se demuestra la elevada efectividad *in vitro* e *in vivo* del tamoxifeno (Tx), antagonista estrogénico no esteroideo, activador de canales de Ca<sup>2+</sup> e inhibidor de calmodulina. Tx provocó un significativo aumento en el [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, modificaciones ultraestructurales, destrucción del tegumento de protoescólices y membrana germinal de metacestodes y mortalidad elevada de protoescólices (100% a 100 µM en 24 h) comparado con BZM, macrólidos, avermectinas y praziquantel. Se demostró un efecto inhibitorio del Tx sobre la funcionalidad *in vivo* de la glicoproteína-P con sustratos fluorescentes y se analizaron niveles de expresión de dicha proteína mediante inmunodetección, inmunolocalización e identificación de transcritos. Mientras que BZM y verapamil fueron identificados como sustratos, Tx y TFP resultaron ser los mejores inhibidores de la proteína exportadora de fármacos, favoreciendo la permanencia de la droga en el tejido larvario y contribuyendo a observar la efectividad farmacológica demostrada. Finalmente, fueron reali-

zados 5 experimentos demostrándose la eficacia clínica del Tx en el modelo experimental murino (cepa CF-1) sobre hidatidosis secundaria y quimioprofilaxis, con resultados estadísticamente significativos frente a diferentes esquemas de tratamiento con dosis de 100 y 25 mg/kg/día, acompañado por cambios ultraestructurales y elevadas concentraciones intraquística de Tx. Este trabajo contribuirá a interpretar y replantear estrategias de quimioterapia en humanos.

### 056. (44) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR NUCLEAR DE PREGNANOS X (PXR) EN LA INDUCCIÓN DE P-GLI-COPROTEÍNA (PGP) POR ESPIRONOLACTONA (E) EN CÉLULAS HEPG2.

Rigalli J.<sup>1</sup>; Ruiz M.<sup>2</sup>; Perdomo V.<sup>3</sup>; Villanueva S.<sup>4</sup>; Mottino A.<sup>5</sup>; Catania V.<sup>5</sup>  
Instituto de Fisiología Experimental<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup>  
jprigalli@gmail.com

Pgp, transportador de xenobióticos, se expresa en epitelios polarizados. Su expresión es regulada por diversos fármacos que actúan a través de receptores nucleares, para los cuales se han caracterizado elementos de respuesta en el gen codificante de Pgp. E es usada como diurético. Previamente vimos una inducción en la expresión y actividad de Pgp en respuesta a E (~70%) en la línea celular humana HepG2, derivada de un hepatocarcinoma. Nuestro objetivo fue evaluar si la inducción observada es mediada por receptores nucleares. A tal fin, las células se trataron con E (50 µM, 48h) y/o ketoconazol (KTZ, 50 µM), inhibidor pan-específico de receptores nucleares. Los controles fueron adicionados con DMSO (vehículo de ambas drogas). Se determinó la expresión de Pgp por immunoblotting. Los resultados (D.O., unidades arbitrarias, media ± DE, n=3; \* $p < 0,001$  diferente de los 3 grupos restantes) fueron: control: 2,87 ± 0,48; control + KTZ: 3,56 ± 0,27; E: 5,95 ± 0,05\*; E + KTZ: 2,67 ± 0,9, indicando la participación de algún receptor nuclear en la respuesta. Existiendo evidencias de que E es ligando de PXR, se disminuyó su expresión mediante la transfección de un ARN de interferencia (ARNi) contra PXR (PXR-). Se empleó además un ARNi que no tiene afinidad por ningún ARN celular (PXR+). Las células se trataron con E o vehículo, y se determinaron los niveles de Pgp. Los resultados fueron: control PXR+: 3,37 ± 0,18; control PXR-: 2,86 ± 0,60; E PXR+: 5,57 ± 0,65\*; E PXR-: 2,79 ± 0,47. La falta de inducción observada frente al tratamiento con E en las células PXR- confirma la participación de este receptor como mediador de la respuesta. La activación de PXR en el tratamiento con E y la consiguiente regulación del gen de Pgp podría tener implicancias terapéuticas al desencadenar interacciones farmacológicas cuando E se co-administra con fármacos que son sustratos del transportador.

### 057. (634) ACTIVIDAD PRO-APOPTÓICA Y TOXICIDAD SELECTIVA DE COMPLEJOS DE TIOSEMICARBAZONAS DE 1-INDANONAS EN CÉLULAS LEUCÉMICAS.

Gómez N.<sup>1</sup>; Santos D.<sup>2</sup>; Vázquez R.<sup>3</sup>; Suescun L.<sup>4</sup>; Mombrú á.<sup>5</sup>; Vermeulen M.<sup>6</sup>; Shayo C.<sup>7</sup>; Moglioni A.<sup>8</sup>; Gambino D.<sup>9</sup>; Davio C.<sup>10</sup>  
Cátedra de Química Medicinal - FFYB - UBA<sup>1, 3, 8, 10</sup>; Cátedra de Química Inorgánica, Facultad de Química, U. de la R., Montevideo, Uruguay<sup>2, 9</sup>; Crystallography, Solid State and Materials Laboratory, DETEMA, Facultad de Química, U. de la R., Montevideo, Uruguay<sup>5</sup>; Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.<sup>6</sup>; IBYME (Instituto de Bioquímica y Medicina Experimental), Buenos Aires, Argentina<sup>7</sup>  
natgmz@gmail.com

El tratamiento del cáncer continúa siendo hoy uno de los mayores desafíos de la medicina. Las tiosemicarbazonas (TSCs) han sido compuestos de interés para el desarrollo de agentes quimioterápicos en los últimos tiempos. Previamente demostramos que mientras que una serie de TSC derivadas de 1-indanonas no presentan actividad antiproliferativa ni citotóxica en la línea celular promonocítica humana U937, los complejos de Cu<sup>II</sup>, Pt<sup>II</sup> y

Pd<sup>II</sup> derivados de la TSC de la 1-indanona si poseen una elevada actividad. En el presente trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa (<sup>3</sup>H-timidina) y citotóxica (Azul Tripán) de complejos de Pd<sup>II</sup> y Pt<sup>II</sup> de la TSC de la 5,6-dimetoxi-1-indanona, obteniéndose las siguientes actividades CI<sub>50</sub>: 23,31 (18.35-29.60), 24,12 (19.48-29.87), 0,2803 (0.2349-0.3346), 0,1297 (0.08525-0.1972) uM para [(TSC)Cl<sub>2</sub>], [Pt(TSC)(HTSC)]Cl, [Pd(TSC)]Cl<sub>2</sub> y [Pd(TSC)(TSC-H)]Cl respectivamente. Posteriormente evaluamos su actividad proapoptótica mediante la determinación de la actividad enzimática de caspasa-3, el ensayo de Anexina V por citometría de flujo y western-blot de caspasa-3-activada/PARP-clivado. Todos los compuestos resultaron positivos para dicho *screening*, siendo los complejos de Pd<sup>II</sup> los más activos detectándose inducción de apoptosis a concentraciones del orden de 0,2 uM. Por último, evaluamos la acción selectiva sobre células leucémicas de los complejos derivados tanto de TSC de 1-indanona como TSC de 5,6-dimetoxi-1-indanona, estudiando su actividad citotóxica y proapoptótica en monocitos y en la línea de carcinoma hepatocelular (HepG2). Los complejos de Pd<sup>II</sup> resultaron tóxicos en ambos tipos celulares, mientras que no lo fueron los de Pt<sup>II</sup>, pudiendo estos últimos ser considerados como prototipos farmacológicos potencialmente aplicables.

**058. (548) CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS (TS) EN RATONES DE LA COLONIA CBI/GE. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE LOS GENOTIPOS CBI+ Y CBI/L EN LA FASE ENTÉRICA**

Panero Schipper N.<sup>1</sup>; Vasconi M.<sup>2</sup>; Bertorini G.<sup>3</sup>; Kiluk B.<sup>4</sup>; Di Masso R.<sup>5</sup>; Hinrichsen L.<sup>6</sup>  
*Instituto de Genética Experimental (IGE), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario<sup>1 4</sup> ; Instituto de Genética Experimental (IGE); Facultad de Ciencias Médicas, Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas; Universidad Nacional de Rosario<sup>2</sup> ; Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario<sup>3</sup> ; Instituto de Genética Experimental (IGE), Facultad de Ciencias Médicas; CIC-UNR, Universidad Nacional de Rosario<sup>5 6</sup>*  
 paneronatalia@gmail.com

Los mecanismos de defensa del huésped infectado por nematodos intestinales comprenden interacciones complejas que culminan con una reacción inflamatoria a nivel de la mucosa intestinal. Se han propuesto "factores candidatos", pero actualmente se desconoce la constitución genética responsable de la resistencia/susceptibilidad a la infección con estos parásitos. En un experimento anterior, las líneas de ratones CBI/L y CBI+ (colonia CBI/IGE) respondieron de forma distinta al desafío con dosis crecientes de *Ts*; la carga parasitaria aumentó al aumentar la dosis infectante pero la magnitud del incremento fue distinta para cada genotipo: CBI/L fue "resistente" y CBI+ "susceptible". Se estudió, por ello, el efecto del genotipo en la fase entérica de la infección. Se utilizaron machos y hembras adultos, infectados por vía oral con 2 larvas infectantes L1 de *Ts* por g de peso corporal. Los animales se sacrificaron en el período agudo (6 y 13 días post-infección, p-i) para analizar SEQ CHAPTER \h \r 11a fecundidad (Fh) de las hembras extraídas del intestino delgado y el número de parásitos adultos (nPA). Las líneas no mostraron efecto de sexo en las variables estudiadas. nPA y Fh disminuyeron entre los 6 y 13 días post-infección en los ratones CBI/L (P<0.01). En CBI+, nPA disminuyó (p<0.025) mientras que Fh no se modificó. La "resistencia" de CBI/L sería el resultado de una respuesta inmune temprana que retardaría la maduración de las larvas infectantes y crearía un ambiente inapropiado para el establecimiento de los adultos. CBI+ sería "susceptible" por una respuesta inmune tardía que facilitaría al parásito completar su ciclo biológico. Los resultados obtenidos en esta experiencia sugieren que el análisis de este modelo animal será útil para desentrañar los mecanismos que regulan la compleja y dinámica relación entre hospedero y parásito. Este conocimiento será de utilidad para predecir estrategias de control de las enfermedades parasitarias basadas en la resistencia genética del huésped.

**059. (247) EL EFECTO DE COMPUESTOS AMARGOS ESTÁ MEDIADO POR PROTEÍNA GI EN GLÁNDULA SUBMAXILAR MURINA**

Dasso M.<sup>1</sup>; Diez R.<sup>2</sup>; Baldasseroni E.<sup>3</sup>; Crivelli F.<sup>4</sup>; Sales M.<sup>5</sup>  
*Segunda Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina UBA<sup>1 2 3 4</sup> ; CEFyBO-CONICET<sup>5</sup>*  
 maximilianodasso@gmail.com

La percepción del gusto amargo está mediada por receptores T2R, expresados tanto en células gustativas linguales como en el tracto gastrointestinal. La unión de ligandos amargos activa la proteína G gustaducina (Ggust), cuya subunidad  $\alpha$  estimula la adenilato ciclasa y/o fosfodiesterasas, mientras que el dímero  $\beta\gamma$  activa la vía de la fosfolipasa C (PLC)  $\beta 2$ . Puesto que las glándulas salivales forman parte del aparato digestivo, investigamos la capacidad de los T2R para modular la secreción de amilasa, vía PLC, óxido nítrico sintasa y guanilil ciclasa (GC) en glándula submaxilar murina (GSM). La expresión proteica se estudió por Western blot (Wb), la actividad de amilasa por la técnica de Bernfeld, la actividad NOS con el reactivo de Griess y la de GC por ELISA. Observamos que tanto denatonio (DEN) ligando de T2R8, como cicloheximida (CICLO) agonista T2R5, inhiben la secreción de amilasa, siendo 10<sup>-5</sup>M la concentración inhibitoria máxima (DEN: 48,1 $\pm$ 3,49%; CICLO: 55,9 $\pm$ 9,63%; vs. control sin tratamiento; p<0,001, n=3). El tratamiento conjunto durante 20 minutos con DEN y CICLO en concentraciones subumbrales resultó en un mayor efecto inhibitorio de la secreción de amilasa (DEN10<sup>-9</sup>M+CICLO10<sup>-9</sup>M: 62,9 $\pm$ 2,50% p<0,001, n=3), sugiriendo que las GSM expresarían al menos receptores de los subtipos 5 y 8 funcionales. Además, observamos un efecto análogo sobre la actividad NOS (DEN: 38,7 $\pm$ 7,4%; CICLO: 59,7 $\pm$ 4,4%; DEN10<sup>-9</sup>M+CICLO10<sup>-9</sup>M: 71,32 $\pm$ 1,17%; p<0,001, n=3). Ambos compuestos amargos redujeron los niveles de GMPc con respecto al control (DEN: 33,1 $\pm$ 9,8%; CICLO: 58,4 $\pm$ 9,8%; n=2). Este efecto inhibitorio ocurre probablemente por el acoplamiento de los T2R vía proteína Gi a la PLC $\beta 2$  expresadas en la GSM, como demostramos por Wb, y a la ausencia de proteína G gust. Concluimos que las GSM poseerían más de un tipo de T2R funcional y que la inhibición de la secreción de amilasa por compuestos amargos ocurriría por activación de la vía T2R-Gi-PLC $\beta 2$ -NOS-GC.

**060. (258) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA IN VITRO DE BETA-MIRCENO SOBRE PROTOESCÓLICES Y QUISTES DE ECHINOCOCCUS GRANULOSUS**

Maggiore M.<sup>1</sup>; Pensel P.<sup>2</sup>; Denegri G.<sup>3</sup>; Elissondo M.<sup>4</sup>  
*Lab. Zoonosis Parasitarias, FCEyN, UNMDP; ANPCyT<sup>1 3 4</sup> ; Lab. Zoonosis Parasitarias, FCEyN, UNMDP<sup>2</sup>*  
 maggiore@mdp.edu.ar

En trabajos previos se demostró el efecto protoescolicida del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*). Uno de sus componentes mayoritarios es el beta-mirceno, un hidrocarburo monoterpénico que varía su concentración según el área de cultivo y la etapa de desarrollo de la planta. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* del beta-mirceno sobre protoescolices y quistes de *E. granulosus*. Protoescolices y quistes obtenidos de ratones CF1 fueron incubados en presencia beta-mirceno (disuelto en DMSO) a las siguientes concentraciones finales: 10, 5 y 1 mg/ml. Protoescolices y quistes suspendidos en medio 199 se utilizaron como controles. La vitalidad de los protoescolices se determinó cada 4 días mediante el test de exclusión con azul de metileno. El mayor efecto protoescolicida se observó con la mayor concentración, donde la viabilidad disminuyó a 15.6% luego de 8 días post incubación y llegó a 0% al día 12. Con la concentración final de 5  $\mu$ g/ml del componente se obtuvieron resultados similares. En donde, la vitalidad fue aproximadamente 10% al día 8 y llegó a 0% al día 12 post-incubación. A la mínima concentración, la vitalidad de los protoescolices fue de aproximadamente 90% al día 12 y alcanzó el 0% luego de 80 días post incubación. Los quistes mostraron pérdida de turgencia y el colapso de la membrana germinativa durante el primer día post incubación, con la mayor concentración tratada. Con las concentraciones de 5 y 1  $\mu$ g/ml las alteraciones en la membrana y la disminución de

la turgencia de los quistes se observaron recién luego de 6 días de incubación. Tanto sobre quistes como sobre protoesclótes se observó efecto de la droga, alterando la vitalidad y la estructura y ultraestructura del parásito en ambos estadios. En trabajos posteriores se estudiará su efecto en un modelo animal.

**061. (729) EFECTO DE MACRÓFAGOS SOBRE LA FORMACIÓN Y METABOLISMO OXIDATIVO DE BIOFILMS DE CANDIDA**

Arce Miranda J.<sup>1</sup>; Baronetti J.<sup>2</sup>; Sotomayor C.<sup>3</sup>; Albesa I.<sup>4</sup>; Paraje M.<sup>5</sup>  
 Dto. de Farmacia. Fac. de Cs. Qs. Unc<sup>1 2 4 5</sup>; Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.<sup>3</sup>  
 jarce@fcq.unc.edu.ar

**Introducción:** *Candida* es un patógeno que causa infecciones intrahospitalarias asociadas al uso de dispositivos biomédicos, donde posee la capacidad de formar biofilms. Nuestro objetivo fue evaluar la presencia de metabolitos oxidativos en biofilms de *C. albicans* y *C. no albicans* expuestos a  $M\phi$ , en diferentes estadios de formación, en 2 modelos experimentales. **Metodología:** Líneas celulares de  $M\phi$  (RAW 264) fueron adheridas a microplacas y posteriormente cepas *C. albicans* o *C. no albicans* fueron agregadas e incubadas (24 hs); en un segundo modelo, a un biofilm maduro de *Candida* se le agregó  $M\phi$  y se incubó (24 hs). Se determinaron las unidades de biomasa de biofilms (UBB) con cristal violeta, las especies reactivas del oxígeno (ERO) por azul de nitro tetrazolium y especies reactivas del nitrógeno (ERN) por técnica de Griess. **Resultados:** Se observó incremento en la formación de biofilms por *C. albicans* (p $\leq$ 0,005), acompañado de un aumento en los niveles intracelulares de ERO (p $\leq$ 0,010) y una disminución de ERO extracelulares (p $\leq$ 0,005), con respecto a los controles. En contraste, la cepa *C. no albicans* presentó una reducción de las UBB con disminución en la producción de ERO intracelulares, y aumento de los extracelulares. Con respecto a la producción de ERN en biofilms co-cultivados con  $M\phi$ , la misma no fue modificada con respecto a la observada en cultivos sin tratamiento de ambos modelos. **Conclusiones:** Los  $M\phi$  pudieron interactuar con biofilms en formación y ya formados de diferentes especies de *Candida*, modificando tanto su biomasa como su balance oxidativo. No obstante, futuros estudios son necesarios para dilucidar el mecanismo por el cual estas células inducen estos fenómenos.

## REPRODUCCION 1

**062. (40) EFECTO DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS (G-CSF) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA METALOPROTEINASA-2 Y LA SECRECIÓN DE VEGF EN UNA LÍNEA DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS.**

Furmento V.<sup>1</sup>; Marino J.<sup>2</sup>; Roguin L.<sup>3</sup>  
 IQUIFIB Cátedra de Química Biológica Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>1 2 3</sup>  
 alejandra\_furmento@hotmail.com

Aunque las funciones del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) han sido caracterizadas en células granulocíticas, sus acciones en otros tipos celulares no fueron aún esclarecidas. Se ha demostrado que la placenta es uno de los pocos tejidos no hematopoyéticos que secreta grandes cantidades de G-CSF y expresa receptores para esta citoquina (G-CSFR). Con el propósito de investigar si el G-CSF desempeña un rol biológico en este tejido, utilizamos una línea de células trofoblásticas humanas de primer trimestre (Swan 71). Inicialmente, determinamos la expresión de G-CSFR en esta línea celular mediante ensayos de detección inmunocitoquímica y Western Blot (WB). Luego demostramos que aunque el G-CSF induce la proliferación y sobrevida en líneas granulocíticas, estos efectos no fueron evidentes en células Swan 71. Para estudiar el efecto biológico del G-CSF, se evaluó la actividad de la metaloproteinasa-2 (MMP-2) y la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en sobrenadantes de cultivo de células estimuladas con distintas

concentraciones de citoquina. Mediante ensayos de zimografía, se observó un aumento de un 35% (p < 0.001) en la actividad de la forma latente de MMP-2 (proMMP-2) en presencia de 100 ng/ml de G-CSF. También demostramos por WB que la misma concentración de G-CSF produjo un incremento en los niveles de VEGF. Puesto que tanto la MMP-2 como el VEGF están relacionados con la invasión trofoblástica, comenzamos a estudiar la participación de vías de transducción activadas en este proceso, como PI3K/Akt. Ensayos de WB de células incubadas durante distintos tiempos con 1  $\mu$ g/ml de G-CSF, mostraron una inducción en la fosforilación de Akt luego de 5 minutos de incubación. Los resultados revelan la presencia de receptores para G-CSF en células Swan 71 y sugieren que esta citoquina participaría en el proceso de invasión trofoblástica aumentando la secreción de MMP-2 y de VEGF, posiblemente a través de la vía PI3K/Akt.

**063. (113) EXPRESIÓN DE GNRH EN EL HIPOTÁLAMO DE LAGOSTOMUS MAXIMUS (VIZCACHA DE LAS LLANURAS)**

Dorfman V.<sup>1</sup>; Insera P.<sup>2</sup>; Saucedo L.<sup>3</sup>; Vitullo A.<sup>4</sup>  
 Centro de Estudios Biomédicos Biotecnológicos Ambientales y Diagnóstico Ceppard Universidad Maimónides<sup>1 2 3 4</sup>  
 dorfman.veronica@maimonides.edu

En la mayoría de los mamíferos, la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) es secretada en forma pulsátil desde la pubertad hasta la menopausia, exceptuando la preñez, para regular la folículoogénesis. La vizcacha de las llanuras presenta ovulación natural, con oogénesis a edad adulta y pseudo-ovulación durante la gestación. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de GnRH en el hipotálamo de este roedor para comprender la modulación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) durante la gestación. Se utilizaron vizcachas adultas hembras no preñadas (NP), preñadas (P), y machos (M), (n=6 c/u) que fueron anestesiadas con ketamina-xilacina y sacrificadas con Eutanyl. Se determinó la expresión hipotalámica de GnRH por Western-Blot y se observó una disminución del 50% en el nivel de expresión de GnRH en el hipotálamo de P respecto a NP y M, sin diferencias en los niveles de expresión entre los dos últimos. Se estudió su expresión en el hipotálamo anterior (HA) y posterior (HP) y se observó que los NP presentaron el 78 $\pm$ 5% de la expresión en el HP y 32 $\pm$ 7% en el HA, los P presentaron una diferencia mayor, con 89 $\pm$ 12% de expresión en el HP, mientras que los M no mostraron variaciones de expresión entre ambas regiones. Mediante cortes cerebrales coronales teñidos con Hematoxilina se localizó el Área Preóptica (APO) en el hipotálamo anterior, y la Eminencia Media (EM) y Núcleo Arcuato (NA) en el hipotálamo posterior. Se detectó inmunolocalización de GnRH en somas y ramificaciones de neuronas del APO y NA, y en varicosidades de APO y EM, con distribución similar en los tres grupos. La presencia de GnRH en el hipotálamo de hembras preñadas indicaría un funcionamiento basal del eje HHG aún durante la preñez, con diferencias funcionales en las diferentes regiones. El estudio del funcionamiento del eje HHG en este animal permitirá la extrapolación a patologías que involucren problemas de fertilidad en el ser humano.

**064. (123) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MMPS) POR PEROXINITRITOS EN PLACENTAS A TÉRMINO DE GESTANTES CON DIABETES TIPO 2**

Capobianco E.<sup>1</sup>; Higa R.<sup>2</sup>; Basualdo N.<sup>3</sup>; Di Marco I.<sup>4</sup>; Faingold C.<sup>5</sup>; Jaberbaum A.<sup>6</sup>  
 Laboratorio de Reproducción y Metabolismo CEFYBO CONICET UBA<sup>1 2 6</sup>; Unidad de Obstetricia<sup>3</sup> Hospital Materno-infantil Ramón Sardá<sup>4</sup>; Departamento de Endocrinología Unidad Asistencial por más Salud Dr. César Milstein<sup>5</sup>  
 evacapobianco@yahoo.com.ar

Las alteraciones metabólicas en la diabetes tipo 2 conducen a la sobreproducción del óxido nítrico (NO) y sus productos de oxidación. Estos agentes regulan la actividad de las MMPs, enzimas proteolíticas que regulan la función placentaria. **Objetivo:** evaluar parámetros de estrés oxidativo y nitrativo, niveles y actividad de

MMPs, y la regulación de la actividad de MMPs por peroxinitritos en placentas a término de pacientes sanas (C) y con Diabetes Tipo 2 (D). Métodos: Las vellosidades de placentas de pacientes C y D provenientes del Hospital R. Sardá (protocolo aprobado por el comité de ética), fueron aisladas y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la determinación de MMP2 y MMP9 totales y nitradas (Western Blot e inmunoprecipitación). Los explantes placentarios fueron incubados: a) en presencia/ausencia de FeTPPs (catalizador de peroxinitritos,  $50\mu\text{M}$ ) para la posterior determinación de nitros/nitritos (índice de producción de NO) y de TBARS (índice de peroxidación lipídica) y b) en presencia/ausencia de peroxinitritos ( $10\text{-}100\mu\text{M}$ ) a fin de evaluar su efecto sobre la actividad de MMPs (mediante zimografía). Resultados: En las placentas D se halló sobreproducción de NO (C:  $1\pm 0.1$ , D:  $1.7\pm 0.3$ , nmol/mg proteína,  $p<0.05$ ), de TBARS (C:  $7.4\pm 0.8$ , D:  $11.8\pm 1.9$ , nmol/mg proteína,  $p<0.01$ ) y mayor nitración proteica (C:  $4.5\pm 1.2$ , D:  $22.6\pm 3.2$ , unidades relativas,  $p<0.001$ ), y el catalizador de peroxinitritos redujo los niveles de NO (35%,  $p<0.05$ ) y TBARS (47%,  $p<0.01$ ). Los peroxinitritos incrementaron la actividad de MMP2 ( $p<0.05$ ) y MMP9 ( $p<0.05$ ) sólo en placentas C. La actividad de MMP2 ( $p<0.01$ ) y de MMP9 ( $p<0.01$ ) fue mayor en placentas D, siendo similares los niveles pero mayor la nitración de dichas MMPs en relación a C ( $p<0.05$ ). Conclusión: En la placenta de pacientes D se incrementan marcadores de estrés oxidativo y nitrativo como los peroxinitritos, que causan daño debido a su capacidad de inducir peroxidación lipídica y activar a las MMPs al producir su nitración.

**065. (128) EXPOSICIÓN A DIETILSTILBESTROL Y SU EFECTO SOBRE EL DESARROLLO FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

Altamirano G.<sup>1</sup>; Manfroni Ghibardo G.<sup>2</sup>; Luque E.<sup>3</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>4</sup>; Kass L.<sup>5</sup>

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral<sup>2 3 4 5</sup>  
gabyaltamirano@hotmail.com

La exposición neonatal a dietilstilbestrol (DES) ejerce efectos permanentes en la proliferación de la glándula mamaria de roedores como resultado de una perturbación endocrina. Nuestro objetivo fue evaluar la influencia de la exposición DES sobre la funcionalidad de la glándula mamaria durante la gestación y lactancia. Ratas preñadas de la cepa Wistar fueron expuestas por vía oral a 0.001% de etanol (control) y DES ( $5\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ ) desde el día 9 de gestación (D9) hasta el destete. Las crías hembras (F1), fueron apareadas a los 90 días de edad con machos fértiles. Durante la gestación (D18 y D21) se obtuvieron muestras de glándula mamaria y sangre. A otro grupo de animales se les permitió amamantar a sus crías (F2) hasta el día 14 de lactancia, y se estudió la cantidad de leche producida midiendo la leche ingerida por las crías. Se determinaron los niveles séricos de estradiol ( $E_2$ ), progesterona ( $P_4$ ) y prolactina (PRL); y en la glándula mamaria se evaluó por inmunohistoquímica el receptor de estrógeno alfa (RE $\alpha$ ), el de progesterona (RP) y el factor transcripción Stat 5 a/b fosforilado. Por RT-PCR en tiempo real se midió la expresión del receptor de prolactina (RPRL),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LALBA) y  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CAS). La exposición a DES no modificó la concentración sérica de  $E_2$ ,  $P_4$  y PRL ni la expresión de RE $\alpha$ , RP y Stat5 a/b en la glándula mamaria. En cambio, el tratamiento perinatal con DES produjo una menor expresión de los ARNm de  $\alpha$ -LALBA y  $\beta$ -CAS que se correlacionó con una disminución en la expresión del ARNm del RPRL. Contrario a lo esperado, no se observaron diferencias significativas en el aporte de leche a las crías lactantes (F2). La  $\alpha$ -LALBA y  $\beta$ -CAS son componentes importantes de la leche materna, la menor expresión de estas proteínas durante la gestación sugiere que, si bien el volumen de leche no se modificó, su calidad nutricional podría estar alterada.

**066. (130) ROL DE LA LEPTINA EN LA INDUCCIÓN DE MACROSOMÍA Y PLACENTOMEGALIA DE LA RATA GESTANTE CAUSADA POR UNA SOBRECARGA DE GRASAS EN LA DIETA MATERNA**

Mazzucco M.<sup>1</sup>; Martínez N.<sup>2</sup>; Jawerbaum A.<sup>3</sup>; White V.<sup>4</sup>  
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos<sup>1 2 3 4</sup>  
m.bmazzucco@yahoo.com.ar

La sobrecarga de grasas en la dieta materna puede aumentar el transporte placentario de lípidos. Lipasas placentarias como la endotelial (LE) y la de lipoproteínas (LPL) son claves en el transporte de lípidos. La leptina es una hormona que regula el metabolismo de lípidos. *Objetivo:* estudiar los efectos de una sobrecarga de grasas en la dieta materna y de la administración fetal de leptina sobre el peso materno, fetal y placentario, los niveles de lípidos, insulina y leptina en suero materno y fetal y la expresión de LPL y LE placentaria. *Métodos:* Ratas Wistar fueron alimentadas con: dieta estándar (5% de lípidos) (DS) o DS suplementada con un 25% de grasas saturadas (DG), fueron apareadas con machos DS. Un grupo de ratas DS fueron operadas en los días 19, 20 y 21 de preñez y sus fetos inyectados con leptina ( $200\text{ ng}/\text{feto}/\text{día}$ ) (DS+L) o solución fisiológica (DS+F). La eutanasia se realizó en el día 21 de preñez. Se pesaron placentas y fetos y se obtuvo plasma fetal y materno donde se evaluó el perfil lipídico por colorimetría y los niveles de insulina y leptina por EIA. Se evaluó la expresión de LE y LPL placentaria por PCR. *Resultados:* Ratas DG poseen placentas ( $p<0.01$ ) y fetos ( $p<0.05$ ) con mayor peso que las ratas DS. Los niveles plasmáticos de triglicéridos ( $p<0.01$ ), insulina ( $p<0.05$ ) y de leptina ( $p<0.01$ ) fueron mayores en madres y fetos DG comparado con DS. Los fetos del grupo DG presentaron mayores niveles de colesterol plasmático (58%,  $p<0.01$ ) con respecto a DS. La expresión placentaria de LE no cambia mientras que LPL fue mayor en DG ( $2.32\pm 0.15\text{ UR}$ ) con respecto a DS ( $1.71\pm 0.08\text{ UR}$ ) ( $p<0.05$ ), al igual que en DS+L ( $2.21\pm 0.011\text{ UR}$ ) con respecto a DS+F ( $1.68\pm 0.09\text{ UR}$ ) ( $p<0.01$ ). *Conclusión:* El incremento de grasas en la dieta materna causa un aumento en los niveles plasmáticos de lípidos y de leptina fetal, que induciría la sobreexpresión placentaria de LPL, que facilitaría el transporte de lípidos hacia el feto condicionando la placentomegalia y la macrosomía.

**067. (154) LOS ANDRÓGENOS CRÓNICAMENTE ELEVADOS INDUCEN ALTERACIONES EN LA PROGRAMACIÓN DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPOFISARIO EN RATONES MACHO TRANSGÉNICOS HIPERSECRETORES DE HCG.**

Gonzalez B.<sup>1</sup>; Ratner L.<sup>2</sup>; Di Giorgio N.<sup>3</sup>; Poutanen M.<sup>4</sup>; Huhtaniemi I.<sup>5</sup>; Calandra R.<sup>6</sup>; Lux-lantos V.<sup>7</sup>; Rulli S.<sup>8</sup>  
Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>2 3 6 7 8</sup>; Department of Physiology, Institute of Biomedicine, University of Turku<sup>4</sup>; Department of Surgery and Cancer, Imperial College London<sup>5</sup>  
betina\_g\_b@yahoo.com.ar

Ratones macho transgénicos (TG) que sobreexpresan hCG presentan hiperplasia/hipertrofia de las células de Leydig, hiperandrogenismo e infertilidad. Previamente hemos demostrado que los machos TG prepúberes presentan alteraciones en la regulación hipotálamo-hipofisaria comparados con los de la cepa salvaje (WT), evidenciadas por un aumento en la concentración y pulsatilidad de GnRH en el hipotálamo y una inhibición persistente en los niveles séricos de FSH y expresión génica de las gonadotropinas en la hipófisis, que no se modifican con el tratamiento desde el día postnatal (DPN) 14 con el antiandrógeno flutamida (F) ni con la castración (Gonzalez y col., SAIC 2009). El objetivo del presente estudio fue evaluar en machos TG prepúberes, el efecto de un tratamiento perinatal con F sobre la regulación hipotálamo-hipofisaria, tratando a los animales desde el día gestacional (DG) 18 hasta el DPN28. Se evaluaron los niveles séricos de FSH (RIA) y la expresión génica (PCR en tiempo real) de: a) subunidad beta de FSH (*Fshb*) y receptor de GnRH (*Gnrhr*) en hipófisis, b) p450-aromatasa (*Cyp19a1*) y kisspeptina (*Kiss1*) en hipotálamo. Los resultados obtenidos mostraron una recuperación parcial en los niveles séricos de FSH en los machos TG tratados con F (WT:  $43.6\pm 2.1\text{ a}$ , TG:  $3.9\pm 0.5\text{ b}$ , TGF:  $19.7\pm 3.3\text{ c}$  ng/ml, letras distintas:  $p<0.05$ , ANOVA-Bonferroni), acompañada de una recuperación parcial en la expresión génica de *Fshb* y de *Gnrhr* en machos TGF comparados con TG y WT. En el hipotálamo, se observaron

niveles de expresión elevados de *Cyp19a1* y disminuidos de *Kiss1* ( $p < 0.05$ ) en los machos TG comparados con los WT, mientras que en los TGF los valores resultaron comparables con los de WT. Estos resultados muestran la existencia de una ventana de tiempo entre el DG18 y el DPN14 durante la cual los andrógenos crónicamente elevados y/o sus metabolitos convertidos localmente son capaces de inducir una activación del hipotálamo y un silenciamiento concomitante sobre el eje gonadotrófico.

**068. (295) LA EXPOSICIÓN NEONATAL AL PESTICIDA ENDOSULFÁN AFECTA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS QUE REGULAN EL DESARROLLO Y LA DIFERENCIACIÓN DEL ÚTERO**

Milesi M.<sup>1</sup>; Varayoud J.<sup>2</sup>; Rivera O.<sup>3</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>4</sup>; Luque E.<sup>5</sup>

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral<sup>1 2 4 5</sup>; Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora<sup>3</sup>  
mmilesi@fbc.unl.edu.ar

El endosulfán es un pesticida organoclorado de uso masivo en nuestro país. Numerosos estudios han demostrado su toxicidad en la reproducción y en el desarrollo, especialmente en machos expuestos durante la gestación y lactancia a dosis muy superiores a las establecidas como referencia (6 mcg/kg/día). En el presente trabajo, nos propusimos determinar si la exposición neonatal a dosis bajas de endosulfán afecta la expresión de proteínas que regulan la diferenciación y el desarrollo del útero, tales como receptor de estrógeno alfa (ERα), receptor de progesterona (PR) y Hoxa10. Para tal fin, ratas hembras Wistar fueron inyectadas (vía sc) desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta el DPN7 con vehículo (Control), Endosulfán 6 mcg/kg/día (Endo6) ó 600 mcg/kg/día (Endo600), y sacrificadas los días 8 y 21 para detectar alteraciones uterinas transitorias y/o permanentes. Biopsias de útero fueron incluidas en parafina y por inmunohistoquímica se determinó la expresión de las moléculas mencionadas. El grupo Endo600 mostró un aumento en la expresión del ERα en el estroma subepitelial (ES) y miometrio (M) en DPN8. Estos cambios fueron transitorios dado que virieron en DPN21, donde se observó una mayor expresión de ERα en epitelio. En DPN8 y 21, los animales tratados con Endo600 mostraron un aumento en la expresión de Hoxa10 en el M; y específicamente en DPN21 también se verificó una mayor expresión en el ES. El tratamiento con la dosis más baja de endosulfán no produjo cambios en la expresión del ERα y Hoxa10 en ninguna de las etapas estudiadas. Si bien no se observaron cambios en la expresión de PR en DPN8, el tratamiento con ambas dosis de endosulfán disminuyó significativamente su expresión en todos los compartimentos uterinos en DPN21. La exposición neonatal a dosis ambientalmente relevantes de endosulfán altera la expresión de proteínas que regulan la organogénesis uterina. Dicha disrupción fue dosis-dependiente, siendo mayor en repuesta a la dosis más alta de endosulfán.

**069. (304) ESTUDIO DE NUEVAS TERAPÉUTICAS NATURALES POSIBLES PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENDOMETRIOSIS (EDT)**

Ricci A.<sup>1</sup>; Olivares C.<sup>2</sup>; Bilotas M.<sup>3</sup>; Singla J.<sup>4</sup>; Meresman G.<sup>5</sup>; Barañao R.<sup>6</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 3 5 6</sup>; Hospital de Clínicas José de San Martín<sup>4</sup>  
analia.ricci@gmail.com

La EDT es una enfermedad crónica, con altos grados de recidivas luego de la terapéutica médica habitual estrógenosupresora. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto *in vivo* e *in vitro* de dos tratamientos con polifenoles naturales: el resveratrol (Res), una fitoalexina presente en las uvas, y el galato de epigallocatequina (EGCG), catequina más abundante del té verde. Se ha visto que ambos polifenoles poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticarcinogénicas. Para ello, a ratones hembras BALB/c se les indujo quirúrgicamente EDT. A los 15 días postcirugía se comenzó con los tratamientos. Los

animales fueron asignados al azar a los siguientes grupos: Res I (10mg/kg); Res II (25mg/kg); Control Res; EGCG I (20mg/kg); EGCG II (100mg/kg); Control EGCG. Res se administró por vía intraperitoneal y EGCG por sonda esofágica. Ambos tratamientos consistieron en una dosis diaria durante 30 días. Luego los animales fueron sacrificados, se localizaron las lesiones y se determinó su volumen. Por otra parte, analizamos el efecto de estos compuestos *in vitro* sobre la proliferación de células epiteliales endometriales humanas (CEE). Se realizaron cultivos primarios de CEE partiendo de biopsias de endometrio eutópico de pacientes con EDT. A las 48 h se estimularon con Res 0, 25, 50 y 100  $\mu$ M; o con EGCG 0, 20, 40, 80 y 100  $\mu$ M. Se evaluó la proliferación celular a las 24 h utilizando el kit de reducción de MTS. Observamos *in vivo* que tanto EGCG I como II disminuyeron el número ( $p < 0.05$ ) y el tamaño de las lesiones desarrolladas por ratón (I  $p < 0.05$  y II  $p < 0.01$ ). Sin embargo sólo Res II disminuyó el tamaño de las lesiones ( $p < 0.01$ ). Por otra parte, observamos *in vitro* que ambos compuestos indujeron una inhibición de la proliferación de CEE ( $p < 0.05$ ). Nuestros resultados sugieren un efecto inhibitorio de Res y EGCG, *in vivo* e *in vitro*, sobre el crecimiento del tejido endometrial y avalan seguir investigando estos compuestos como estrategias novedosas para tratar la EDT.

**070. (322) EFECTO DEL HIPERANDROGENISMO Y DEL TRATAMIENTO CON METFORMINA SOBRE EL METABOLISMO DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO UTERINO**

Elia E.<sup>1</sup>; Motta A.<sup>2</sup>

CEFYO-CONICET-UBA<sup>1 2</sup>  
evelinmariel@hotmail.com

Las mujeres con Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) presentan disfuncionalidad uterina aún cuando la ovárica es normal. En su tratamiento se usa Metformina (M). Los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR) regulan la funcionalidad uterina y son activados por metabolitos derivados del ácido araquidónico (aa). Objetivo: evaluar el metabolismo del aa uterino en un modelo de SOP y al tratar con M. Se indujo SOP en ratones hembras prepúberes BALB/c con dehidroepiandrosterona sc. (DHEA: 60 mg/Kg peso, 0.1 ml aceite) por 20 días. Otro grupo recibió oralmente M (500 mg/Kg peso, 0.1 ml agua) junto con DHEA y los controles recibieron vehículo, n=8 ratones/grupo. Los niveles de Cicloxigenasas (COX) fueron evaluados por Western Blot, los de Prostaglandinas (PG) por Radioinmunoensayo y los de 9-cetoreductasa (9CR) y PGD Sintasa (PGDS) por RT-PCR. Encontramos que DHEA produjo una disminución en la expresión de la COX 2, mientras que M previno ese efecto (C: 130,052  $\pm$  4; DHEA: 107 $\pm$ 8; DHEA+M: 126,253 $\pm$ 6 unidades arbitrarias (ua);  $p < 0.001$ ). No detectamos cambios al analizar la expresión de la COX 1. Se produjo una disminución en la síntesis de PGE al administrar DHEA ya sea sola o junto con M (C: 181297 $\pm$ 15099; DHEA: 75113 $\pm$ 7081; DHEA+M: 67744 $\pm$ 5719 pg/mg tejido;  $p < 0.01$ ) y un aumento en la de PGF2a que fue normalizado al administrar M (C: 236789 $\pm$ 6436; DHEA: 323320 $\pm$ 12437; DHEA+M: 234000 $\pm$ 4932 pg/mg tejido;  $p < 0.001$ ). Detectamos un aumento en la expresión de 9CR al tratar con DHEA, que fue prevenido al tratar conjuntamente con M (C: 0,990 $\pm$ 0,092; DHEA: 1,728 $\pm$ 0,065; DHEA+M: 1,030 $\pm$ 0,029 ua;  $p < 0.001$ ). Al evaluar la expresión de la PGDS, encontramos una disminución al tratar con DHEA ya sea solo o junto con M (C: 1,03 $\pm$ 0,25; DHEA: 0,04 $\pm$ 0,04; DHEA+M: 0,09 $\pm$ 0,04 ua;  $p < 0.001$ ). Conclusiones: alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico serían responsables, al menos en parte, de los problemas implantatorios y/o de los abortos recurrentes presentes en SOP.

**071. (323) LA EXPOSICIÓN A DIETILSTILBESTROL DURANTE EL DESARROLLO AUMENTA LA INCIDENCIA DE LESIONES UTERINAS A LARGO PLAZO**

Vigezzi L.<sup>1</sup>; Bosquiaz V.<sup>2</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>3</sup>; Luque E.<sup>4</sup>

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral<sup>1 2 3 4</sup>  
lucia.vigezzi@gmail.com

Nuestro objetivo fue estudiar los efectos de la exposición prenatal y postnatal temprana al xenoestrógeno dietilstilbestrol (DES) sobre la proliferación y diferenciación uterina en diferentes etapas reproductivas de la rata. Ratas preñadas (Wistar) fueron expuestas a través del agua de bebida a 0.001% de etanol (control) o DES (5ug/Kg/día) desde el día 9 de gestación hasta el destete. Las crías hembra fueron sacrificadas en estro a los 3 y 12 meses de edad, 2 horas antes fueron inyectadas con bromodeoxyuridina (BrdU) para evaluar proliferación celular. Se diseccionaron los cuernos uterinos y se incluyeron en parafina. Se estudiaron las secciones uterinas mediante tinción con hematoxilina-eosina, inmunohistoquímica de citoqueratinas (CK) 8 y 34 $\beta$ E12, p63,  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), BrdU, receptor de estrógeno alfa (RE $\alpha$ ) y receptor de progesterona (RP). A los 3 meses, las hembras expuestas a DES presentaron una disminución en la incorporación de BrdU glandular (controles: 3.18 $\pm$ 0.46 vs DES: 1.91 $\pm$ 0.19,  $p < 0.05$ ) y en la expresión de  $\alpha$ -SMA periglandular (controles: 78.7 $\pm$ 3.1 vs DES: 63.7 $\pm$ 3.3,  $p < 0.05$ ). La expresión glandular de receptores hormonales no se modificó por el tratamiento. A los 12 meses se observaron diversas lesiones uterinas: glándulas con metaplasias escamosas, quísticas, hipertróficas y con anomalías nucleares (núcleos hipocrómicos). En los animales expuestos a DES la incidencia de glándulas hipertróficas y con anomalías aumentó significativamente (controles: 31% vs DES: 69%,  $p < 0.05$ ). Estas estructuras presentaron baja actividad proliferativa y al igual que las glándulas normales expresaron CK8 (marcador de epitelio luminal) y RE $\alpha$ , fueron negativas para la inmunomarcación de células basales (CK34 $\beta$ E12 y p63) y RP. Los resultados sugieren que la exposición perinatal a DES podría reprogramar el desarrollo uterino modificando el microambiente tisular del útero y aumentando la susceptibilidad a lesiones uterinas en la adultez.

**072. (464) LA ANANDAMIDA (AEA) PARTICIPA EN EL AUMENTO DE LA ACTIVIDAD DE LA AMIDOHIDROLASA DE ÁCIDOS GRASOS (FAAH) INDUCIDA POR EL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS).**

Vercelli C.<sup>1</sup>; Aisemberg J.<sup>2</sup>; Wolfson M.<sup>3</sup>; Franchi A.<sup>4</sup>  
 Centro de Estudios Farmacológicos Y Botánicos<sup>1 2 3 4</sup>  
 clauverce77@yahoo.com.ar

La anandamida (AEA) participa en la fisiología reproductiva de las hembras uniéndose a sus receptores específicos CB (receptor de cannabinoides) 1 y 2, pero niveles elevados de esta molécula se relacionan con pérdidas tempranas de la preñez. El lipopolisacárido (LPS) induce la síntesis de AEA en linfocitos humanos y en macrófagos murinos. Por otro lado, el grupo de Maccarrone ha propuesto que los blastocistos murinos liberan un compuesto lipídico que activa a la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) uterina, la enzima que degrada la AEA, disminuyendo así su concentración en el sitio de implantación. Nosotros hemos observado que el LPS incrementa la expresión proteica y la actividad de la FAAH en la decidua murina. Conociendo la naturaleza lipídica de la AEA investigamos si este endocannabinoide podría modular la actividad y la expresión de la FAAH en explantos de decidua murina. Deciduas de ratonas en día 7 de preñez fueron incubadas por 12h a 37°C en presencia de: A) LPS (1ug/ml) para determinar los niveles de ARNm de CB1 y CB2 por RT-PCR; B) m-AEA 10<sup>-7</sup>M (análogo sintético no hidrolizable de la AEA) ensayando luego la actividad de la FAAH por radioconversión y los niveles proteicos de esta enzima por western blot; C) LPS+AM251 (antagonista de CB1) o LPS+SR144528 (antagonista de CB2) ensayando luego la actividad de la FAAH por radioconversión. Observamos que la decidua de ratón expresa tanto CB1 como CB2 y que el LPS incrementó los niveles de ARNm de ambos receptores ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$ , respectivamente). Además, observamos que la actividad ( $p < 0,01$ ) y los niveles proteicos de la FAAH ( $p < 0,05$ ) se incrementaron cuando los explantos de decidua se incubaron en presencia de m-AEA. Finalmente, observamos que los antagonistas de CB1 ( $p < 0,01$ ) y CB2 ( $p < 0,01$ ) revirtieron el aumento de la actividad de la FAAH inducido por el LPS. Estos resultados sugieren que la AEA regula su propio metabolismo y estaría involucrada en el aumento de la actividad de la FAAH inducida por el LPS.

**073. (480) MODULACIÓN DEL CATABOLISMO DE LAS PROSTAGLANDINAS (PGS) EN UN MODELO MURINO DE REABSORCIÓN EMBRIONARIA (RE) INDUCIDA POR LPS.**

Aisemberg J.<sup>1</sup>; Bariani M.<sup>2</sup>; Vercelli C.<sup>3</sup>; Wolfson M.<sup>4</sup>; Franchi A.<sup>5</sup>  
 Centro de Estudios Farmacológicos t Botánicos CEFYBO  
 CONICET UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 <jaisemberg@yahoo.com.ar

Hemos desarrollado un modelo de aborto por infección mediante la administración de LPS (1 $\mu$ g/g) a hembras BALB/c en su día 7 de gestación. La endotoxina produce incremento en los niveles de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PGs) en la interfase materno-fetal luego de 6 h de tratamiento y RE completa en 24 h. Posteriormente a expulsar los restos de embriones reabsorbidos, la hembra restituye su capacidad gestacional. Las PGs, por sus propiedades uterotónicas son abortivas en las primeras semanas de embarazo. Son mediadores inflamatorios que tienen una vida media muy corta debido en parte a su rápida inactivación biológica por la acción de la 15-hidroxiprostaglandina dehidrogenasa (15-PGDH). Nuestro objetivo fue evaluar la modulación por LPS y NO sobre el catabolismo de las PGs como parte del mecanismo de acción de la endotoxina en la inducción del aborto. Hembras BALB/c en el día 7 de preñez fueron tratadas con vehículo, LPS o SNAP (un dador de NO, 3 mg/Kg) por 2 y 6 h. Se extrajeron los úteros para realizar western blot de 15-PGDH y para determinar los niveles de PGE por RIA y de un derivado estable de sus metabolitos por EIA. El tratamiento con la endotoxina disminuyó la expresión de la enzima a ambos tiempos evaluados en relación al control ( $p < 0.001$ ). Observamos que la relación PGE/metabolitos de PGE uterina aumenta respecto del control y que esto se debe tanto al incremento en los niveles de la PG como a la disminución en la producción de sus metabolitos ( $p < 0.01$ ). Por otro lado, las hembras tratadas con SNAP mostraron menores niveles proteicos de la enzima 15-PGDH uterina luego de 6 h de tratamiento ( $p < 0.05$ ), sugiriendo una modulación por parte del NO sobre el catabolismo de las PGs. En conclusión, los efectos patológicos producidos por los elevados niveles locales de PGs en nuestro modelo de aborto por infección, en parte son producto de la regulación negativa de su catabolismo.

**074. (675) EFECTO INMUNOMODULADOR DE VIP Y PROGESTERONA EN LOS SITIOS DE IMPLANTACIÓN DE HEMBRAS NOD.**

Azzam S.<sup>1</sup>; Hauk V.<sup>2</sup>; Laura F.<sup>3</sup>; Roca V.<sup>4</sup>; Grasso E.<sup>5</sup>; Ramhorst R.<sup>6</sup>; Pérez Leirós C.<sup>7</sup>  
 Laboratorio de Inmunofarmacología Depto. de Química Biológica FCEYN<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
 sofia.azzam@gmail.com

La gestación en ratones diabéticos no obesos (NOD) durante la etapa prediabética se presenta con alteraciones tales como un aumento de la tasa de reabsorción embrionaria asociado a infiltración mononuclear en los sitios de implantación, menor expresión local de LIF, defectos en la actividad de células Treg, NK y niveles séricos de progesterona (P4) disminuidos. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) tiene efecto inmunomodulador y trófico en la interacción de células trofoblásticas e inmunes, favoreciendo la proliferación de las primeras y promoviendo respuestas Th2 y Treg. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto modulador de VIP y de P4 en sitios de implantación viables y con procesos de reabsorción en hembras NOD. En el día 10 de gestación se obtuvieron explantes de útero libres de decidua. Se analizó la expresión de VIP, de sus receptores y de las citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$ , por RT-PCR en sitios de implantación viables (SN) y con procesos de reabsorción (SR). Se observó una disminución de los niveles de VIP en los SR respecto a los SN. Por otra parte, el tratamiento *in vitro* con VIP indujo un aumento en la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$  en los SN (u. arbitrarias: IL-10/GAPDH, X  $\pm$  ES: Basal 0.2 $\pm$ 0.07; VIP 0.5 $\pm$ 0.1 P<0,05; TGF- $\beta$ /GAPDH: Basal 0.2 $\pm$ 0.04; VIP 0.5 $\pm$ 0.07 P<0,05). No se observó efecto de VIP en los SR. El tratamiento con P4 moduló positivamente la expresión del receptor de VIP, VPAC2, e indujo un aumento en la expresi-

sión de TGF- $\beta$  e IL-10 (IL-10/GAPDH: Basal  $0.2 \pm 0.07$ ; P4  $0.6 \pm 0.09$   $P < 0,05$ ). En los sitios de implantación viables de ratones NOD la P4 aumenta la expresión de los receptores VPAC2 y ejerce un efecto inmunomodulador similar al de VIP con aumento de las citoquinas inmunosupresoras IL-10 y TGF- $\beta$ ; esta modulación se encuentra ausente en sitios con procesos de reabsorción.

**075. (793) ROL DE LAS PROSTAGLANDINAS EN EL PARTO PREMATURO INDUCIDO EN RATAS POR LA TOXINA SHIGA TIPO 2 RESPONSABLE DEL SINDROME UREMICO HEMOLITICO**

Burdet J.<sup>1</sup>; Cella M.<sup>2</sup>; Franchi A.<sup>3</sup>; Ibarra C.<sup>4</sup>  
Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 4</sup>; CEFyBO-CONICET<sup>2 3</sup>  
julianaburdet@yahoo.com.ar

Infecciones asociadas con *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) y el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico han cobrado gran relevancia como problema de salud pública en la Argentina. Las infecciones por STEC podrían ser una de las causas de morbi-mortalidad fetal en mujeres embarazadas. El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga tipo 1 ó 2 (Stx1, Stx2) aunque las cepas de STEC que producen Stx2 son de mayor prevalencia en nuestro país. Previamente hemos informado que la inyección por vía intraperitoneal (i.p.) de sobrenadante de cultivo filtrado de *E. coli* que expresa Stx2 y contiene LPS (sStx2) en ratas en estadio tardío de gestación induce parto prematuro de fetos muertos. El óxido nítrico (NO) estaría involucrado en estos mecanismos, ya que aminoguanidina, un inhibidor de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), parcialmente inhibe la acción de Stx2 en ratas preñadas. Nuestro objetivo fue evaluar el papel de las prostaglandinas (PGs) en el parto prematuro inducido por sStx2. El diseño experimental fue inyectar por vía i.p. con sStx2 (0,7 - 2 ng Stx2 y 15 - 45 ng LPS/g de peso) ratas en el día 15 de gestación y sacrificarlas 12 hs post-inyección. Los niveles de PGE y de PGF2 $\alpha$  fueron evaluados en útero y placenta mediante un análisis de radioinmunoensayo. Los resultados muestran que sStx2 indujo parto prematuro de fetos vivos y/o muertos dependiendo de la dosis inyectada. Los niveles de PGs detectados en útero y placenta de animales tratados con la menor dosis de sStx2 (0,7 ng Stx2 y 15 ng LPS/g de peso) fueron significativamente mayores que aquellos observados en ratas controles ( $p < 0,05$ ). Teniendo en cuenta que sStx2 aumenta la expresión de iNOS y en consecuencia la producción de NO y sabiendo que NO esta involucrado en la regulación de la producción de PGs, nuestros resultados sugieren que el aumento de la actividad de iNOS previamente observada podría inducir el parto prematuro a través de un aumento de PGs.

## TOXICOLOGIA 1

**076. (80) LA ADMINISTRACIÓN DIARIA DE  $\alpha$  O  $\beta$ -NAFTOFLAVONA ESTIMULA LA ESTEROIDOGÉNESIS Y EL PROCESO OVULATORIO DE LA RATA**

Artillo Guida R.<sup>1</sup>; Barreiro K.<sup>2</sup>; Di Yorio M.<sup>3</sup>; Bilbao M.<sup>4</sup>; Faletti A.<sup>5</sup>  
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET), Facultad de Medicina (UBA)<sup>1 2 3 4 5</sup>  
artilloromina@hotmail.com

Los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) producen efectos tóxicos en la salud reproductiva por actuar a través de receptores específicos de hidrocarburos aromáticos (AhR). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de dos naftoflavonas,  $\beta$ -naftoflavona ( $\beta$ NF) y  $\alpha$ -naftoflavona ( $\alpha$ NF), sobre la esteroidogénesis durante el proceso ovulatorio, ya que son ligandos del AhR y conocidos como agonista y antagonista de AhR, respectivamente. Para ello utilizamos ratas inmaduras estimuladas con gonadotropinas (eCG/hCG) y tratadas diariamente (12 días) con  $\alpha$ NF (0,1-80 mg/kg) y  $\beta$ NF (0,01-50 mg/kg) o vehículo (C). La tasa ovulatoria, determinada por el número de oocitos presentes en oviductos, aumentó en las ratas tratadas con 0,1 mg/kg de  $\beta$ NF ( $52 \pm 9$ ,  $P < 0,01$ ) y con todas

las dosis de  $\alpha$ NF (entre  $46 \pm 2$  y  $70 \pm 1$ ,  $P < 0,01$ ) comparadas con los C ( $28 \pm 4$ ). Los niveles de progesterona sérica, determinados por radioinmunoensayo y expresados en ng/ml, fueron aumentados por  $\alpha$ NF a 10 mg/kg ( $56 \pm 15$ ;  $P < 0,01$ ) y por  $\alpha$ NF a 0,1 mg/kg ( $66 \pm 11$ ;  $P < 0,01$ ) respecto a los C ( $30 \pm 4$ ). Para estudiar el mecanismo de estos efectos se determinó la expresión de la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR) y de la primera enzima que participa en la síntesis de progesterona, el citocromo P450 11A1 (CYP11A1) por RT-PCR (RNAm) y Western blot (proteína). Sólo  $\beta$ NF a 0,1 mg/kg fue capaz de aumentar los niveles proteicos de StAR (140%,  $P < 0,01$ ) pero ambas naftoflavonas, a distintas dosis y consistente con los aumentos respectivos de la progesterona sérica, aumentaron los niveles del RNA mensajero del CYP11A1 en alrededor del 50% ( $P < 0,05$ ) respecto a los C. Estos resultados demuestran que un tratamiento diario con estas naftoflavonas, a distintos niveles, son capaces de: i) inducir el proceso ovulatorio; ii) estimular la esteroidogénesis, al menos en parte, a través de un aumento de la CYP11A1; y que iii) en este modelo biológico ambas naftoflavonas parecen tener efectos similares, aunque a distintas dosis.

**077. (82) ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA Y GENOTOXICIDAD DE ARTEMISIA DOUGLASIANA BESSER EN ROEDORES**

Gil L.<sup>1</sup>; García J.<sup>2</sup>; García Aseff S.<sup>3</sup>; Wendel G.<sup>4</sup>; Pelzer L.<sup>5</sup>  
Universidad Nacional de San Luis<sup>1 2 3 4 5</sup>  
luscia\_216@hotmail.com

*Artemisia douglasiana* Besser (*Ad*) conocida comúnmente como "matico", es ampliamente utilizada en medicina popular por su actividad citoprotectora gástrica. Para la utilización de las plantas medicinales es necesario comprobar que las mismas no produzcan toxicidad ni a corto ni a largo plazo. Es por eso que su evaluación toxicológica es un requisito indispensable, una vez evaluada su efectividad farmacológica. En este trabajo evaluamos el potencial tóxico de *Ad* en ratón y rata. Toxicidad aguda: Se utilizaron ratas Wistar, ambos sexos (200-250 g) con ayuno de 4h a las que se administraron 5, 50, 300 y 2000 mg/kg, v.o. de infusión acuosa de *Ad*. El lote control recibió agua destilada. Los animales se observaron durante 14 días para registrar peso corporal, mortalidad u otro síntoma tóxico. Se sacrificaron, se registró el peso de corazón, pulmón, hígado, bazo y riñones. (Vega y Montalvo, 1997) Genotoxicidad: Se utilizaron ratones Rockland, 3 machos y 3 hembras, que se inyectaron i.p. con agua destilada (lote control), paracetamol 1 g/kg (lote positivo) y con *Ad* 10% y 25%. Se sacrificaron a las 24 y 48 h. Se evaluaron micronúcleos (MN) presentes en 2000 eritrocitos policromáticos (EPC) (Heddle y col., 1983) en médula ósea. No se observaron diferencias significativas en la frecuencia de MN/1000 EPC (media  $\pm$  SEM) entre ratones tratados con *Ad* 10% y 25%:  $4.83 \pm 0.88$  y  $3.91 \pm 0.15$ , respectivamente y control:  $4.33 \pm 0.30$ , a las 24 h. como tampoco a las 48h: *Ad* 10% y 25%:  $6.25 \pm 0.86$  y  $4.83 \pm 0.38$ , respectivamente y control  $4.16 \pm 0.30$ . Paracetamol indujo un aumento significativo en la frecuencia de MN a las 24 h.:  $13.87 \pm 0.62$ ,  $p < 0.0001$  y a las 48 h.:  $15 \pm 0.46$ ,  $p < 0.0001$ . *Ad* no produjo mortalidad ni síntomas visibles de toxicidad en las concentraciones estudiadas. No se observaron signos o síntomas de inquietud, depresión de la respiración, convulsiones o coma. *Ad* no produjo daño cromosómico *in vivo*: no indujo efecto aneupéptico ni clastogénico.

**078. (100) EFFECT OF 2,4-DICHLOROPENOXYACETIC ACID ON DAMS EXPOSED DURING LACTATION**

Pochettino A.<sup>1</sup>; Jahn G.<sup>2</sup>; Duffard R.<sup>3</sup>; Evangelista A.<sup>4</sup>  
Laboratorio de Toxicología Experimental Facultad de Cs Bioquímica y Farmacéuticas Universidad Nacional De Rosario<sup>1 3 4</sup>; IMBECU - CRICYT (CONICET) - MENDOZA<sup>2</sup>  
aristidespochettino@gmail.com

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and its derivatives are herbicides widely used to control the growth of broadleaf and woody plants. Recently our laboratory has reported that 2,4-D exposed

dams transfer the herbicide to suckling pups through mother's milk. The goal of the present study was to evaluate the different stages of lactation in mother rats exposed to 2,4-D. Pregnant Wistar rats were treated with 2,4-D (70 mg/kg/day, sprayed on food) from gestation day 16 onward. On post partum day (PPD) the treated group continued to be fed with 2,4-D until sacrifice by decapitation at PPD 1, 7, 14 and 23. We determined serum prolactin (PRL), progesterone (P), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), growth hormone (GH) and tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining in the arcuate nucleus (ArN). We observed a significant decrease in IGF-1 concentration at PPD 1 (52%), PPD 14 (56%) and PPD 23 (22%) respectively with respect to controls, but GH levels were not affected. The levels of PRL and P decreased significantly on day 7 (56% and 46%, respectively) and 14 (20% and 45%, respectively) of lactation. There was increased TH immunostaining in the ArN at PPD 7 (9%), PPD 14 (11%) and PPD 23 (10%) with respect to controls. In conclusion, the increase of dopaminergic activity in ArN (estimated by increased TH - immunostaining) produced by 2,4-D exposure may be the cause of the inhibition of PRL release, which in turn may be responsible for the decreased circulating P.

#### 079. (165) METABOLISMO DEL FE EN CÉLULAS DE CEREBRO EN DESARROLLO IRRADIADAS IN UTERO

Robello E.<sup>1</sup>; Piloni N.<sup>2</sup>; Puntarulo S.<sup>3</sup>;  
Fisicoquímica Pralib FFYB UBA<sup>1 2 3</sup>  
erobello@ffyb.Uba.ar

El objetivo de este trabajo fue determinar el metabolismo oxidativo del Fe en cerebro de fetos de rata de 17 días de gestación (DG), para analizar posibles alteraciones en el metabolismo oxidativo del Fe por la exposición a la radiación gamma. Se establecieron cultivos celulares de cerebro de feto de rata de 17 DG que fueron expuestos a 1 Gy de radiación gamma *in utero*. Datos previos de nuestro laboratorio indican que en sistemas irradiados *in vitro* no se observan alteraciones ni en el contenido de Fe total ni en el contenido de Fe lábil (LIP) con un aumento significativo en el índice de estrés oxidativo contenido de ascorbilo /contenido de ascorbato en las muestras irradiadas. En las células irradiadas *in utero* se determinó una alteración significativa en el contenido de Fe total a las 4 h post-irradiación (pi) ( $4,2 \pm 0,1$ ;  $5,2 \pm 0,3$ ;  $5,1 \pm 0,8$  y  $14 \pm 1$  nmol/10<sup>6</sup>cél. analizadas a 0, 1, 2 y 4 h pi), en el LIP a las 2 h pi ( $0,39 \pm 0,02$ ;  $0,27 \pm 0,04$ ;  $0,38 \pm 0,05$  y  $0,46 \pm 0,08$  nmol/10<sup>6</sup>cél. analizadas a 0, 1, 2 y 4 h pi) y en el contenido de radicales lipídicos a las 4 h pi ( $1,1 \pm 0,3$ ;  $0,7 \pm 0,3$ ;  $1,0 \pm 0,3$ ;  $2,1 \pm 0,3$  nmol/10<sup>6</sup>cél. a 0, 1, 2 y 4 h pi). Dado el diferente perfil observado frente a la exposición a radiación en cultivos irradiados *in vitro* e *in utero* se evaluó el contenido de Fe en el medio de cultivo, resultando de  $107 \pm 22$  µM. Sin embargo, las células de cerebros de fetos de ratas irradiadas *in utero* recibieron aportes de Fe a través de la sangre materna con un contenido de LIP de  $1,9 \pm 0,3$ ;  $3,7 \pm 0,7$ ;  $4 \pm 1$  y  $5 \pm 1$  µM a 0, 1, 2 y 4 h pi. Estos resultados indican que la radiación gamma afecta la disponibilidad de Fe en las células fetales de cerebro según el LIP en la sangre materna. Estos resultados indican que este estudio requiere establecer condiciones de irradiación *in utero* que representa más adecuadamente la situación observada *in vivo*.

#### 080. (208) RESPUESTA CELULAR A NANOPARTÍCULAS DE ORO CON DISTINTAS FUNCIONALIZACIONES SUPERFICIALES

Grillo C.<sup>1</sup>; Flores C.<sup>2</sup>; Vericat C.<sup>3</sup>; Fernández Lorenzo M.<sup>4</sup>  
Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) CCT-CONICET La Plata, UNLP, La Plata, Argentina<sup>1 2 3 4</sup>; Facultad de Ingeniería, UNLP, La Plata, Argentina<sup>4</sup>  
cgrillo@inifta.unlp.edu.ar

Las nanopartículas de oro (NPsAu) han despertado gran interés en el campo de la Medicina, tanto para fines terapéuticos como en diagnóstico. Esto se debe a su biocompatibilidad y a que presentan propiedades únicas, dependiendo de su tamaño, forma y funcionalización. Sin embargo, existe controversia respecto a su toxicidad en células de mamíferos. El objetivo de este trabajo

fue evaluar la citocompatibilidad de NPsAu con dos recubrimientos diferentes (citrato y polisorbato 20) en células osteoblásticas. Las NPsAu se sintetizaron por reducción de una sal de Au(III) con citrato. Se obtuvieron NPs monodispersas con un diámetro promedio de 15 nm (determinado por microscopía electrónica de transmisión). Para obtener las NPs recubiertas con polisorbato se adicionó una solución de éste a las NPs citratadas. Las células UMR-106 se cultivaron por 24 h en presencia de diferentes concentraciones de NPs (25, 50, 100 y 200 µM) a fin de evaluar la citotoxicidad a través del ensayo de viabilidad de azul de tripán, la incorporación del colorante rojo neutro (RN) y la reducción del metil tetrazolio (MTT). Los resultados del ensayo de RN no evidenciaron diferencias significativas de la actividad lisosomal para los dos tipos de NPs y con todas las concentraciones estudiadas. El ensayo de viabilidad corroboró lo observado con RN. Con MTT se evidenció un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) del valor de absorbancia de los tratamientos con NPsAu con polisorbato 20 al compararlos con el control. Sin embargo, las NPsAu citratadas no mostraron este comportamiento. Estos resultados indican que, en las condiciones experimentales empleadas, las NPsAu estudiadas no evidencian citotoxicidad. Sin embargo, no se descarta una posible interferencia de las NPs recubiertas con polisorbato 20 con el ensayo de MTT. De esta manera se pone de manifiesto la necesidad de realizar una serie de ensayos que evalúen el posible impacto de las NPs en la actividad celular a fin de no abordar falsas conclusiones.

#### 081. (277) MECANISMOS MOLECULARES DE CITOTOXICIDAD INDUCIDOS POR MICROCISTINA-LR EN RATONES TRATADOS SUBCRONICAMENTE

Lezcano N.<sup>1</sup>; Lucotti I.<sup>2</sup>; Sedán D.<sup>3</sup>; Andrinolo D.<sup>4</sup>; Vittone L.<sup>5</sup>; Mundiña-Weilenmann C.<sup>5</sup>

Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1</sup>; Centro de Investigaciones Cardiovasculares CCT-CONICET La Plata, Facultad de Ciencias Médicas (UNLP)<sup>2 5 6</sup>; Laboratorio de Toxicología General CIDCA-CCT - Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), La Plata - Argentina<sup>3 4</sup>  
noarlez@hotmail.com

La microcistina-LR (MC-LR) es una toxina producida por cianobacterias de agua fresca. Se sugiere que la acción de MC-LR se debe en parte a su capacidad de inhibir proteínas fosfatasa tipo 1 y 2A (PP1 y PP2A), lo cual deriva en hiperfosforilación proteica, desestabilización del citoesqueleto, activación de cascadas apoptóticas y muerte celular. Si bien estos efectos han sido ampliamente estudiados en células expuestas a MC-LR, poco se sabe acerca de las consecuencias de la exposición crónica a la toxina en el animal entero. Nuestro objetivo fue estudiar los mecanismos y cascadas de señales involucradas en los efectos de la toxina y los daños por ella ocasionados, en un modelo de administración prolongada. Para ello, se trataron ratones con dosis subletales de MC-LR (25 µg/kg i.p.) o con solución salina (control) durante 1 mes. La fragmentación del ADN y el incremento significativo de la relación entre las proteínas pro y anti-apoptóticas (Bax/Bcl-2) indicaron que la administración de MC-LR indujo apoptosis sólo en hígado y no en riñón, intestino o corazón. El análisis de homogenatos hepáticos demostró una disminución de la actividad de fosfatasa ( $12,44 \pm 2,09$  vs.  $31,43 \pm 6,49$  mU/ml en el grupo control  $n=3$ ,  $p < 0,05$ ) debida a PP2A sin cambios en la actividad de PP1; disminución en la expresión de la proteína  $\alpha$ -tubulina, componente esencial de los microtúbulos ( $45,56 \pm 7,65$  % del control,  $n=9$   $p < 0,05$ ) y aumento de la fosforilación de p38-MAPK ( $137,93 \pm 11,64$  % del control,  $n=5$   $p < 0,05$ ) y de la quinas dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina (CaMKII) ( $419,35 \pm 67,83$  % del control,  $n=9$   $p < 0,05$ ) sin cambios en la fosforilación de ERK1/2. Los resultados indican que la administración subcrónica de MC-LR produce apoptosis a nivel hepático, pudiendo estar mediada por dos vías apoptóticas independientes, CaMKII y p38-MAPK. Tanto la activación de estas vías como la disrupción del citoesqueleto podrían deberse a la inhibición de PP2A causada por la toxina.

#### 082. (496) USO DE ALBENDAZOLE EN AVES REPRODUCTORAS: EFECTO SOBRE LA FERTILIDAD E INCUBABILIDAD DE LOS HUEVOS



**Bistoletti M.**<sup>1</sup>; Moreno Torrejon L.<sup>2</sup>; Fernandez H.<sup>3</sup>; Alvarez L.<sup>4</sup>; Lanusse C.<sup>5</sup>

Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil; CONICET<sup>1 2 4 5</sup>; Area de producción avícola, UNCPBA<sup>3</sup>  
bistoletti@vet.unicen.edu.ar

Los fármacos benzimidazoles son antihelmínticos de amplio espectro frecuentemente utilizados en medicina veterinaria. Si bien en la mayoría de los países solo está autorizado el uso de flubendazole en aves de corral, por razones de costo se utilizan otras moléculas del grupo como por ejemplo albendazole (ABZ). Por su particular mecanismo de acción, estos fármacos son potencialmente embriotóxicos/teratogénicos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes dosis de ABZ administrado en el alimento a gallinas reproductoras, sobre el desarrollo embrionario. Cuarenta y seis (46) gallinas reproductoras Plymouth Rock fueron divididas en cuatro (4) grupos: sin tratamiento (Grupo Control) y tratados con ABZ a la dosis de 10 (Grupo 10), 40 (Grupo 40) y 80 (Grupo 80) mg/kg/día de ABZ. El fármaco fue administrado en la ración durante 7 días. Los huevos producidos durante el tratamiento fueron identificados y se procedió a su incubación bajo condiciones de humedad y temperatura controladas. A los 14 días de incubación se realizaron ovoscopías para determinación de fertilidad. A los 21 días se evaluó la incubabilidad de acuerdo al número de pollitos nacidos. Los valores de fertilidad obtenidos fueron de 94.2 (Grupo Control), 75.6 (Grupo 10), 52.9 (Grupo 40) y 50.0 (Grupo 80) %. De manera similar, la incubabilidad decreció con el aumento de la dosis de ABZ administrada, siendo de 90.9, 80.6, 77.7 y 68.7 para los grupos Control, 10, 40 y 80, respectivamente. La comparación estadística entre los resultados obtenidos para el grupo control y los tratados con ABZ, mostró diferencias significativas para la fertilidad pero no para la incubabilidad. En conclusión, la administración de ABZ en el alimento a gallinas reproductoras, pueden disminuir significativamente la fertilidad, no siendo significativo el efecto sobre la incubabilidad de los huevos producidos, hecho que deberá ser tenido en cuenta en caso de utilizar ABZ para el control de helmintos en aves reproductoras.

**083. (497) EL HEXACLOROBENCENO (HCB) INDUCE HIPO-FUNCIONALIDAD EN CÉLULAS TIROIDEAS FRTL-5 Y UN AUMENTO DE LA APOPTOSIS MEDIADA POR ERK1/2**

**Chiappini F.**<sup>1</sup>; Alvarez L.<sup>2</sup>; Pontillo C.<sup>3</sup>; Randi A.<sup>4</sup>; Kleiman De Pisarev D.<sup>5</sup>

Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
florenchiappini@hotmail.com

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental deletéreo para la salud humana. En animales induce porfiria, disfunciones tiroideas, reproductivas, e inmunológicas y carcinogénesis hepática, mamaria y tiroidea. Demostramos previamente que el HCB, induce la expresión de TGF- $\beta$ 1 y apoptosis, así como la activación de las MAPKs en células FRTL-5. El TGF- $\beta$ 1 aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) resultando en la activación de enzimas antioxidantes. Los ROS actúan como mensajeros intracelulares de la señal apoptótica. **Objetivos:** Estudiar el efecto del HCB sobre parámetros funcionales tiroideos, el estado oxidativo celular y determinar la participación de ERK1/2 en la apoptosis en células tiroideas de rata FRTL-5. Se realizaron ensayos en función del tiempo (2, 6, 8, 24 y 48h) con HCB 5  $\mu$ M y de la dosis (0,005; 0,05; 0,5 y 5  $\mu$ M) a las 8h y 24h. Se evaluaron: a) los niveles de tiroglobulina (TG), de ERK1/2-P, y de caspasa-3 clivada por Western blot; b) la viabilidad celular por el ensayo de MTT y c) la expresión de la enzima catalasa por RT-PCR. **Resultados:** a) los niveles de TG disminuyeron 50% (p<0.05) con HCB 5  $\mu$ M (24h); b) la viabilidad celular disminuyó en función del tiempo (p<0.05) y de la dosis (p<0.01) de manera similar a la activación de la caspasa-3 la cual presentó un pico a las 8h (460%, p<0.05); c) los niveles de ERK1/2-P aumentaron en función de la dosis y del tiempo con un pico a las 8h (208%, p<0.05); d) el pre-tratamiento con PD98059, un inhibidor

específico de ERK1/2 llevó la viabilidad a los niveles controles (HCB 5  $\mu$ M, 24h); e) la expresión de la enzima catalasa aumentó de manera dosis dependiente (100% p<0.01, 140% p<0.001 y 150% p<0.001 HCB 0.005, 0,5 y 5  $\mu$ M respectivamente) a las 8h. **Conclusión:** El HCB altera la funcionalidad celular, e induce apoptosis dependiente de la vía de ERK1/2 en células FRTL-5. Los resultados sugieren que los ROS podrían estar involucrados en el mecanismo de acción del mismo.

**084. (595) ACTIVIDADES METABOLICAS DE FASE 1 Y 2 EN LA MUCOSA INTESTINAL, HIGADO Y RIÑON DE RATAS EXPUESTAS AL HERBICIDA GLIFOSATO**

**Larsen K.**<sup>1</sup>; Virkel G.<sup>2</sup>; Lifschitz A.<sup>3</sup>; Gonzalez Borda E.<sup>4</sup>; Najle R.<sup>5</sup>

Laboratorio de Ecotoxicología y Biología Celular FCV UNCPBA<sup>1 4 5</sup>; Laboratorio de Farmacología<sup>2 3</sup>  
kelarsen@vet.unicen.edu.ar

El glifosato (GLF) es un herbicida organofosforado de elevada solubilidad acuosa. Si bien es considerado un herbicida seguro, es controversial la información disponible en relación a sus efectos medioambientales, particularmente sobre seres vivos expuestos en forma crónica a trazas del herbicida a través del agua potable. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la exposición crónica al GLF sobre las actividades metabólicas carboxil-esterasa (CES) y glutatión-S-transferasa (GST) a nivel intestinal, hepático y renal en ratas. Microsomas y citosoles de la mucosa intestinal y de los tejidos hepático y renal fueron obtenidos de ratas Wistar hembra controles (n=6) y expuestas (30 días) a dos concentraciones de GLF en el agua de bebida: 0,7 mg/L (GLF07, n=6) y 7 mg/L (GLF7, n=6). Se evaluaron dos actividades metabólicas mediante espectrofotometría: CES (fase 1) utilizando p-nitrofenilacetato como sustrato y GST (fase 2) empleando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno. En la mucosa intestinal, la actividad CES resultó entre 89 y 181% mayor en los animales expuestos a 7 mg/L (1,23  $\pm$  0,69  $\mu$ mol/min\*mg, p<0,01) y a 0,7 mg/L (1,83  $\pm$  0,44  $\mu$ mol/min\*mg, p<0,001), en comparación con las ratas del grupo control (0,65  $\pm$  0,14  $\mu$ mol/min\*mg). La actividad GST en la mucosa intestinal del grupo GLF07 (170  $\pm$  56,5 nmol/min\*mg) resultó un 35% menor (p<0,05) con respecto al grupo control (262  $\pm$  52,6 nmol/min\*mg) mientras que no se observaron diferencias significativas con el grupo GLF7. No se observaron diferencias significativas entre los tres grupos al cuantificar ambas actividades enzimáticas a nivel hepático y renal. Los cambios observados a nivel intestinal podrían estar relacionados con la mayor exposición de los enterocitos al herbicida, en comparación con el hígado y los riñones. Modificaciones en el patrón de biotransformación de xenobióticos por la exposición crónica al GLF y a otros herbicidas podrían ser de relevancia en medicina humana y veterinaria.

**085. (638) EL INCREMENTO DE LA MIGRACIÓN CELULAR INDUCIDO POR EL HEXACLOROBENCENO, EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HUMANO MDA-MB-231, ESTÁ MEDIADO POR EL RECEPTOR DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS**

**Pontillo C.**<sup>1</sup>; García M.<sup>2</sup>; Peña D.<sup>3</sup>; Cocca C.<sup>4</sup>; Alvarez L.<sup>5</sup>; Chiappini F.<sup>6</sup>; Kleiman D.<sup>7</sup>; Randi A.<sup>8</sup>

Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 5 6 7 8</sup>; Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.<sup>4</sup>  
caroponti@hotmail.com

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida organoclorado de alta persistencia en el ambiente, promotor de tumores hepáticos y tiroideos. Es un compuesto tipo dioxina, que se une en forma débil al Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR), por lo cual, sus efectos pueden o no estar mediados por este receptor. Previamente observamos que el HCB activa a c-Src, HER1, ERK1-2 y STAT5b e induce migración en forma dependiente de c-Src y HER1 en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Nuestro objetivo fue estudiar si la activación de las vías c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1-2, como la migración

celular inducidas por el tóxico, podrían estar mediadas por su unión al AhR. Para analizar las vías de señalización y si el AhR está involucrado, las células fueron pretratadas con inhibidores de c-Src (PP2), HER1 (AG1478) y AhR (4,7-Phe) por 3 h y luego expuestas al HCB (0.05, 0.5 y 5  $\mu$ M) por 15 m y se analizaron los niveles de fosforilación de Y416-c-Src, Y845-HER1, ERK1-2 y Y699-STAT5b por inmunoblot. Para estudiar migración por el ensayo del transwell, las células fueron expuestas por 24 h al HCB (5  $\mu$ M) en presencia o ausencia de 4,7-Phe. Los resultados mostraron que la fosforilación de Y845-HER1 inducida por el tóxico, se previno al inhibir c-Src ( $p < 0,001$ ); que se bloqueó la fosforilación de ERK1-2 al inhibir HER1 ( $p < 0,05$ ) pero no al inhibir c-Src; y que se previno la fosforilación de Y699-STAT5b al inhibir tanto c-Src como HER1 ( $p < 0,001$ ). En presencia del inhibidor del AhR, tanto la activación del Y699-STAT5b como de Y416-c-Src inducidas por dosis altas y bajas de HCB, se bloquearon ( $p < 0,01$ ), mientras, la activación del ERK1-2 se previno sólo por dosis altas ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, la migración celular estimulada por el tóxico se bloqueó al tratar con este inhibidor ( $p < 0,001$ ). En conclusión, el HCB estimula la migración celular en MDA-MB-231, a través de las vías de señalización de c-Src/HER1/STAT5b y HER1/ERK1-2, en forma dependiente del AhR.

**086. (671) IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE PLACENTA HUMANA**

Rivero Osimani V.<sup>1</sup>; Lombardo P.<sup>2</sup>; Valdez S.<sup>3</sup>; Guiñazú N.<sup>4</sup>; Magnarelli G.<sup>5</sup>  
 Libiquima IDEPA-CONICET; Fac De Ciencias Médicas, Universidad Nacional Del Comahue<sup>1 5</sup>; Libiquima IDEPA-CONICET, Universidad Nacional Del Comahue<sup>2 4</sup>; IMBECU-CCT Mendoza, Instituto de Ciencias Básicas, UNCuyo<sup>3</sup>  
 valetirivero@hotmail.com

La exposición a xenobióticos puede afectar el equilibrio del sistema materno-fetal. Considerando que la placenta representa una matriz asequible para investigar efectos de la toxicidad *in utero*, el objetivo de este trabajo fue estudiar si la exposición ambiental a plaguicidas organofosforados (OP) afecta la funcionalidad de las mitocondrias. Previa utilización de criterios de exclusión y obtención de consentimiento informado, se colectaron placentas de residentes en zona rural (ZR) (n=11) en período de aplicación de OP (PA) y de receso (PR) y de residentes urbanas (ZU) (n=11) no expuestas. La exposición a OP se evaluó en base a la actividad de carboxilesterasa del homogenato. Por otra parte, se aislaron por centrifugación diferencial mitocondrias livianas (MI), propias del sincitiotrofoblasto y pesadas (Mp), del citotrofoblasto. La actividad del complejo enzimático II (succinato-diclorofenol indofenol oxidoreductasa) de la cadena respiratoria de MI y Mp de ZR disminuyó durante el PA respecto de PR (media  $\pm$  ES; MI: 33,12 $\pm$ 1,9 vs 50,14 $\pm$ 2,81;  $p < 0,001$  y Mp: 46,03 $\pm$ 1,55 vs 73,40 $\pm$ 3,32;  $p < 0,001$  nmol/mg prot x min) y respecto de ZU ( $p < 0,05$ ). No se observaron cambios significativos en la actividad de los complejos II + III (succinato-citocromo C oxidoreductasa). Dado que la progesterona es sintetizada en las MI, se determinó en homogenato, la concentración por RIA, hallándose una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en PA respecto de PR y de ZU (media  $\pm$  ES; PA: 826 $\pm$ 90, PR: 1294 $\pm$ 88; ZU: 1354 $\pm$ 175 ng/mg prot). Estos resultados indican que la producción de progesterona y ATP mitocondrial se encuentran disminuidas en la exposición ambiental a OP, hallazgos que podrían explicar, en parte, alteraciones en los parámetros morfofométricos del neonato reportados en estudios epidemiológicos. Agradecimientos: Clínica San Lucas; Méd. M. Curioni y Lic. T. Solari. Méd. Obstetra S. Santa Cruz. Subsidios: UNComahue, CONICET, FONCyT. Beca FONCyT y Carrillo Oñativia M. de Salud de la Nación.

**087. (747) EL HEXACLOROBENCENO AUMENTA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES PRENEOPLÁSICOS, Y DESREGULA EL CRECIMIENTO A FAVOR DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN HÍGADO DE RATA**

De Tomaso A.<sup>1</sup>; Chiappini F.<sup>2</sup>; Pontillo C.<sup>3</sup>; Randi A.<sup>4</sup>; Alvarez L.<sup>5</sup>

Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 laura6alvarez@yahoo.com.ar

El hexaclorobenceno (HCB) es un pesticida órganoclorado ampliamente distribuido en el medio ambiente, que afecta la salud humana. En animales de experimentación es neurotóxico, disruptor endocrino, e inductor de enzimas microsomales hepáticas (UDPGT, CYP1A1), y promotor de cáncer de hígado, mama y tiroides. En células epiteliales el TGF- $\beta$  tiene acción antiproliferativa y proapoptótica. En células tumorales se pierde esta respuesta y estimula la proliferación, invasión y metástasis. Hemos demostrado que en hígado de rata, el HCB aumenta la proliferación celular y la apoptosis, estando involucradas las MAPKs JNK, ERK y p38. Dado que el HCB altera la regulación del crecimiento, nuestro objetivo fue: estudiar su mecanismo de acción en un modelo de iniciación-promoción tumoral, [dietilnitrosamina (DEN) (50 mg/kg) y HCB (100 mg /kg p. c.)] en hígado de ratas hembras. Se analizaron en los grupos C vs HCB (modelo normal) y DEN vs DEN+HCB (modelo iniciado): 1- hipertrofia celular (tinción H-E), 2- Niveles proteicos de marcadores preneoplásicos (GST-P), de PCNA, de Citocromo c y JNK (fosforilados/tales), por Western-blot; 3- Expresión de TGF $\beta$ 1 y Citocromo P4501A1, por RT-PCR; 4- Degradación de ADN, TUNEL. Se observó un aumento en: la hipertrofia celular en ambos modelos; en los niveles proteicos de GST-P<sup>+</sup> (47%,  $p \leq 0,05$ ) en DEN/DEN-HCB; de PCNA (20 y 75%,  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,001$ ); en la expresión de TGF- $\beta$ 1 (50 y 81%,  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,001$ ), y de CYP1A1 (40 y 70%,  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,005$ ), en ambos modelos respectivamente. Por el contrario el efecto apoptótico del HCB fue mayor en el modelo normal que en el iniciado: citocromo c (50 y 35%,  $p \leq 0,005$ ,  $p \leq 0,05$ ), JNK-P/JNK (50 y 27%,  $p \leq 0,005$ ,  $p \leq 0,05$ ) e índice apoptótico (80 y 50%,  $p \leq 0,005$ ,  $p \leq 0,05$ ), respectivamente. Conclusión: El Hexaclorobenceno aumenta la expresión de marcadores preneoplásicos, y desregula el crecimiento a favor de la proliferación celular en un modelo de iniciación -promoción.

**088. (771) 2,4- DICHLOROPHENOXYACETIC ACID (2,4-D) INDUCE OLIGODENDROCYTES DEATH**

Konjuh C.<sup>1</sup>; Evangelista De Duffard A.<sup>2</sup>; Duffard R.<sup>3</sup>  
 LATOEX - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR<sup>1 2 3</sup>  
 cink26@gmail.com

Oligodendrocytes are the highly specialized myelin-forming cells of the Central Nervous System. The myelin sheath is a multi-layered structure, which wraps around axons, acting as an insulating material to speed the conduction of electrical impulses along the axon. Myelination is especially susceptible to perturbations such as nutritional deficiencies, genetic disorders of metabolism, viral infections toxic insult and other environmental factors. 2,4-D is a phenoxyherbicide used for selective control of broadleaf weeds. Unfortunately, 2,4-D produces different harmful effects on mammals, including humans, which range from embryotoxicity and teratogenicity to neurotoxicity. In previous work, we found hypomyelination in neonate rats exposed to herbicide through the mother's milk. The aim of this study was to determine if 2,4-D affects the oligodendrocytes viability. For this purpose primary oligodendrocytes cultures were used and the effects of several 2,4-D concentration (0,2 – 0,5 – 1 and 1,5 mM) upon cell viability was evaluated using MTT assay after 24, 48 or 72 hours of exposition. Moreover, rat pups exposed lactationally to 70 mg/kg bw of the herbicide in the myelination period and their respective control group were used and the number of oligodendrocytes was counted immunohistochemically, in brain sections, using carbonic anhydrase II antibody (oligodendrocyte marker) and haematoxyline counterstaining. 2,4-D caused a decreased viability of oligodendrocytes in culture at all doses and times studied and a decrease in the number of oligodendrocytes in slice brains of exposed pups. These results indicate that 2,4-D induce oligodendrocytes death both *in vitro* and *in vivo* and could be one of the causes of the hypomyelination observed in pups lactationally exposed to the herbicide.

**089. (796) CROSS-NEUTRALIZATION OF THE COAGULANT ACTIVITY OF CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS VENOM FROM THE NORTHEAST OF ARGENTINA BY BIVALENT BOTHROPIC ANTIVENOM**

Rodríguez J.<sup>1</sup>; Fusco L.<sup>2</sup>; Gauna M.<sup>3</sup>; Acosta O.<sup>4</sup>; Leiva L.<sup>5</sup>

Laboratorio de Investigación en proteínas Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional del Nordeste<sup>1</sup>; Laboratorio de Investigación en proteínas (LABINPRO) FACENA UNNE<sup>2,3,5</sup>; Cátedra de Farmacología FCV UNNE<sup>4</sup> rodriguezcasco@yahoo.com.ar

Snake venoms, particularly those belonging to Viperidae, often induce disorder of the blood coagulation system, and this represents a serious complication in snake bite. *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) venom may cause complete and long lasting incoagulability of blood in patients, due to the hypofibrinogenemia developed after the bite. Beside the substitution therapy with plasma or plasma derived, the use of antivenoms is the only effective treatment to this disturbance of hemostasis. Owing to the therapeutic implications in this medically relevant intoxication, the aim of this work was to investigate the neutralization of *C.d.t.* venom coagulant activity by bivalent antivenom raised in horses against the species mainly responsible for bothropic envenomations from the northeast of Argentina: *Bothrops alternatus* (*B.a.*) and *Bothrops diporus* (*B.d.*). Horse hyperimmune antisera were obtained by immunization with different amount of *B.a.* or *B.d.* venom per animal mixed with Freund's adjuvant. The antibody levels in the sera were monitored by ELISA and its specificity was tested by immunoblotting. Antibodies were purified by ion exchange chromatography in a FPLC System. Crotalic thrombin-like activity neutralization was test including different amount of venom with antivenom for 30 min at 37°C and the clotting time measured in a Fibrintimer Winner Lab<sup>®</sup> Coagulometer. According to demonstrate that crotalic thrombin-like enzymes (TLEs) from *C.d.t.* venom are neutralized by the antivenom produced, a TLE were purified from the whole venom and similar neutralization tests were developed. Our experiments confirmed that the antivenom obtained with venoms from the northeast of Argentina neutralize thrombin-like activities of *C.d.t.* venom but, higher amount of antivenom is required compared to bothropic venoms neutralization. These results provide crucial information for a rational and effective treatment of snake bite and are also useful for the development of new antivenoms formulations.

## NEUROCIENCIAS 1

**090. (75) EFECTOS DEL ESTRÉS POSTNATAL AGUDO Y CRÓNICO EN LA RATA ADULTA**

Odeon M.<sup>1</sup>; Orta M.<sup>2</sup>; Salatino A.<sup>3</sup>; Acosta G.<sup>4</sup>  
ININFA CONICET UBA<sup>1,2,3,4</sup>  
merodeon@hotmail.com

Durante los períodos críticos del desarrollo, ciertas regiones del cerebro, principalmente las relacionadas con situaciones adversas, pueden desarrollar anomalías a veces irreversibles y así alterar el procesamiento emocional y la respuesta al estrés a lo largo de toda la vida. Se cree que estos efectos en la vida temprana son mediados por la alta plasticidad del SNC en desarrollo. En el presente trabajo se evaluaron los posibles efectos del estrés postnatal agudo y crónico, sobre la conducta y la respuesta al estrés en animales adultos. Se trabajó con neonatos de 5, 7, 13 y 21 días postnatales (PD). Se utilizaron protocolos de estrés por separación materna y frío durante 1 h a 4°C, con una sola exposición al estrés agudo y durante 20 días al estrés crónico, luego hubo un período de 30 días sin estrés (washout), hasta que los animales alcanzaron la adultez. Se evaluó el efecto ansiolítico mediante la prueba de transición luz-oscuridad y se midieron los niveles plasmáticos de corticosterona por HPLC. En los animales estresados crónicamente encontramos un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el tiempo de permanencia en la luz sin diferencias en el número de transiciones, esto revela una actividad exploratoria

aumentada. Mientras que en el estrés agudo no observamos efectos en la conducta en las ratas adultas. En los niveles de corticosterona notamos un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) inducido por el estrés agudo en todas las edades estudiadas. En el estrés crónico se observó una disminución a edades tempranas (PD5 y PD7). Nuestros resultados, observados en el animal adulto, evidencian efectos permanentes del estrés postnatal en el SNC, demuestran que el desarrollo de los circuitos que responden al estrés podrían ser modificados por el ambiente. Las edades analizadas en este trabajo presentan ventanas temporales de períodos críticos para estos circuitos, por lo tanto, serían susceptibles a ser alterados. Financiado por UBA B-019 y CONICET PIP N° 11420090100118

**091. (181) LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO INDUCE CAMBIOS EN EL HIPOCAMPO Y REDUCE LOS NIVELES CEREBRALES SOLUBLES DE BETA AMILOIDE EN UN MODELO MURINO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

Beauquis J.<sup>1</sup>; Galván V.<sup>2</sup>; Roig P.<sup>3</sup>; De Nicola A.<sup>4</sup>; Saravia F.<sup>5</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1,3</sup>; University of Texas, Health Science Center At San Antonio, USA<sup>2</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental; Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>4,5</sup> juanbeauquis@gmail.com

Antecedentes en la literatura sugieren que la estimulación ambiental ejerce un rol protector en la enfermedad de Alzheimer (AD). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del ambiente enriquecido (AE) sobre el proceso neurodegenerativo en un modelo de AD. Ratones hembra transgénicos (Tg) portando las mutaciones humanas Swedish e Indiana en la proteína precursora de amiloide (PDAPP J20) y sus congéneres no transgénicos (NTg) fueron alojados en jaulas con tubos, juguetes, material para nidos y casas de plástico (AE) o en jaulas estándar (CS) por 3 meses (5 a 8 meses de edad). Se estudiaron niveles cerebrales de beta amiloide (A $\beta$ ), neurogénesis y expresión de BDNF en el hipocampo. Los niveles cerebrales de A $\beta$  soluble 1-40 y 1-42 (ELISA) en los Tg, se redujeron drásticamente con el AE, sin diferencias en el número de placas A $\beta$  en el hipocampo. Por hibridación in situ se vio un aumento del mRNA de BDNF en el giro dentado de los Tg en AE comparados con los Tg en CS. Con respecto a la neurogénesis, la proliferación celular en el giro dentado (inmunohistoquímica para Ki67) fue menor en Tg comparados con NTg. El AE no afectó este parámetro. En los Tg se encontró menor número de neuronas doublecortin+, sin efecto del AE. La supervivencia celular se determinó administrando bromodeoxiuridina (BrdU) 21 días pre-sacrificio. El AE aumentó el número de células BrdU+ en Tg y en NTg (NTg-CS 59,8  $\pm$  11,4; Tg CS 21,3  $\pm$  7,05; NTg AE 135,2  $\pm$  16,9,  $p < 0,01$  vs. NTg CS; Tg AE 64  $\pm$  11,3,  $p < 0,05$  vs. Tg CS; células BrdU+). Por microscopía confocal se calculó la proporción de células BrdU+NeuN+/BrdU+ totales hallando una disminución en los Tg en CS y un aumento con el AE (Tg CS 0,53  $\pm$  0,11; Tg AE 0,65  $\pm$  0,03;  $p < 0,01$ ). Los resultados indicarían que el AE estimula la supervivencia de progenitores neuronales en ratones Tg, modelo de AD, con mayores niveles de BDNF y menores de A $\beta$  soluble, sugiriendo un rol significativo de los estímulos sociales y sensoriales en el desarrollo de la AD.

**092. (278) IMPACT OF BILIRUBIN ON THE ABCC1 EXPRESSION IN BRAIN PARENCHYMA IN VIVO**

Berengeno A.<sup>1</sup>; Gazzin S.<sup>2</sup>; Bellarosa C.<sup>3</sup>; Robert M.<sup>4</sup>; Tiribelli C.<sup>5</sup>;  
Liver Research Center<sup>1,2,3,4,5</sup>  
a.berengeno@csf.units.it

**Background:** Severe hyperbilirubinemia in newborns and in patients with Crigler Najjar syndrome type I (CNSI) can result in the accumulation of unconjugated bilirubin (UCB) in specific regions of the brain (cerebellum, basal ganglia and various brainstem nuclei) leading to chronic neurological damage. We demonstrated a strong down regulation of ABCc1 in the blood cerebrospinal fluid

barrier of jaundiced Gunn rats (jj), the animal model for kernicterus and CNSI. ABCc1 (Mrp1) is the ABC family transporter with the highest affinity for UCB. Its expression was demonstrated to be protective against UCB toxicity in neurons and astrocytes *in vitro*. **Aim:** To compare *in vivo* the Mrp1 protein and gene expression in the brain regions accumulating UCB (cerebellum: Cll, striatum: St, hippocampus: Hip) in hyperbilirubinemic (jj) animals and age-matched controls rats (JJ Gunn). Cerebral cortex (Cx) was used as control. **Methods:** Cx, Cll, St and Hip were examined in homozygous hyperbilirubinemic (jj) Gunn and age-matched controls (JJ) rats. Mrp1 mRNA level was assessed by Real Time-qPCR at P9, P17, P60 and protein expression by quantitative Western blot at P9. **Results:** Similar Mrp1 mRNA levels were found in Cx, Cll, St and Hip of JJ and jj rats at P9 and P17. In P60 animals, Mrp1 mRNA expression was unchanged in Cx, Cll and St; while an increase ( $p < 0.05$ ) in Hip of jj rats (as compared to JJ animals) was observed. Mrp1 protein expression was similar in Cll, St and Hip of P9 JJ animals; whereas in Cx the expression was lower ( $p < 0.05$ ). No significant difference between genotypes was found in Cll and St. Mrp1 level decrease ( $p < 0.05$ ) in the Hip while an increase ( $p < 0.05$ ) was found in Cx of jj animals (both Hip and Cx compared to JJ littermates). **Conclusions:** The lack of correlation among Mrp1 (protein and mRNA levels) and selective UCB accumulation, suggest that contrary to *in vitro* Mrp1 is not a major *in vivo* player in protecting against UCB neurotoxicity.

**093. (351) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PROLONGADA DE BENZODIAZEPINAS SOBRE LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR GABA-A**

Ferreri M.<sup>1</sup>; Gutiérrez M.<sup>2</sup>; Gravielle M.<sup>3</sup>

Instituto De Investigaciones Farmacológicas-CONICET-Uba<sup>1 2 3</sup>  
mcferreri@ffyb.uba.ar

La administración crónica de benzodiazepinas induce tolerancia a la mayoría de sus efectos farmacológicos y está acompañada por cambios en la estructura y/o función del receptor GABA<sub>A</sub>, sin embargo, el mecanismo molecular no se conoce aún. Por otro lado, ha sido demostrado que la exposición prolongada de cultivos neuronales primarios a benzodiazepinas induce una reducción en la interacción alostérica entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas, un fenómeno llamado desacoplamiento, sin cambios en el número de receptores. La relación entre la tolerancia y el desacoplamiento no ha sido establecida. El objetivo del presente trabajo fue investigar las bases moleculares de la tolerancia inducida por la aplicación crónica *in vivo* de diazepam, una benzodiazepina clásica. A tal fin, ratas macho fueron tratadas con una inyección diaria subcutánea de diazepam (15 mg/kg) durante 7 días de acuerdo a un protocolo descripto previamente para inducir tolerancia. El grado de acoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas se llevó a cabo mediante experimentos de unión específica de [<sup>3</sup>H]flunitrazepam en homogenatos de membrana de corteza cerebral y fue estimado como la potenciación de la unión del radioligando por GABA. Los resultados indican que el tratamiento indujo un desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas del  $87 \pm 4\%$  ( $p < 0,05$ ). Numerosas evidencias demuestran que la función del receptor GABA<sub>A</sub> es regulada por su estado de fosforilación. Resultados obtenidos a partir de experimentos de inmunoprecipitación seguidos por ensayos de western blot indicarían que el desacoplamiento no está acompañado por un cambio en el grado de fosforilación de las subunidades del receptor. En conclusión, los resultados demuestran que el tratamiento prolongado con benzodiazepinas induce un desacoplamiento entre los sitios de unión de GABA y benzodiazepinas y este proceso regulatorio podría estar relacionado con el desarrollo de tolerancia.

**094. (376) CAMBIOS TEMPRANOS EN EL SISTEMA NEVIOSO CENTRAL EN LA INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA AGUDA EXPERIMENTAL**

Souto P.<sup>1</sup>; Di Carlo M.<sup>2</sup>; Romay S.<sup>3</sup>; Delfante A.<sup>4</sup>; Vistaprop A.<sup>5</sup>; Novak A.<sup>6</sup>; Lemberg A.<sup>7</sup>; Perazzo J.<sup>8</sup>; Tallis S.<sup>9</sup>; Eizayaga F.<sup>10</sup>

IMBS y Laboratorio de Encefalopatía Hepática. FFYB, Uba.<sup>1 3 4 5 6 7 8 9 10</sup>; Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Uba.<sup>2</sup>  
psouto@ffyb.uba.ar

**Introducción.** La intoxicación alcohólica aguda es un frecuente problema sanitario que afecta crecientemente a la población joven, trayendo como consecuencia una elevada tasa de accidentes y comportamiento violento. **Objetivo.** Investigar las alteraciones hepáticas y del Sistema Nervioso Central (SNC) luego de una intoxicación alcohólica aguda en ratas sin contacto previo con el etanol. **Métodos.** Se utilizaron ratas Wistar hembras adultas, de 250g. de pc. divididas en 2 grupos (n=6), uno control (GC) y otro experimental (GA). Se administró al GA alcohol al 14%, 2.5 g/kg. en sc. salina ip. en una única dosis y al GC sc. salina. Se midieron movimientos espontáneos por control láser en un Open Field (Columbus Opto Varimex) a T<sub>0</sub>+24h.; T<sub>0</sub> en T<sub>0</sub>+30min. y T<sub>0</sub>+24h. en períodos de 10 min./rata. Luego se sacrificaron a las 24 h. de la administración única, midiendo en sangre: AST, ALT, Fosfatasa Alcalina, Lípidos, Ionograma, LDH, CK, Che, Proteínas totales (PT), Amilasa, Urea, Glucemia y la histopatología hepática y de SNC. **Estadística:** Se usó ANOVA y post-test de Dunnet,  $p < 0.05$  fue considerado significativo. **Resultados.** El grupo GA mostró un incremento significativo en distancia recorrida en T<sub>0</sub>+30min. y T<sub>0</sub>+24h. con respecto a T<sub>0</sub> del GC. El GA disminuyó significativamente los movimientos verticales en T<sub>0</sub>+30min. En el GA se observó diferencias significativas en la concentración plasmática de Urea, Na, Colesterol, HDL, LDH, CK, PT y Amilasa. La histopatología hepática fue normal en tanto en el SNC se observó aumento de los espacios intercelulares de células epiteliales de plexos coroideos con interrupción de las uniones estrechas. **Conclusiones.** Los resultados evidencian en la intoxicación alcohólica aguda experimental en dosis de 2.5 g/kg. ip. cambios morfológicos en la Barrera Hemato Coroidea y de comportamiento en el SNC previos a los hepáticos.

**095. (412) COMPARACION Clínica ENTRE DISPLASIA CORTICAL FOCAL Y DISPLASIA CORTICAL FOCAL DE TRANSAMANTO. UNA SERIE DE 28 CASOS.**

Seifer G.<sup>1</sup>; Consalvo D.<sup>2</sup>; Kauffman M.<sup>3</sup>; Princich J.<sup>4</sup>; Blenkmann A.<sup>5</sup>; Kochen S.<sup>6</sup>

Hospital Ramos Mejia - Divison Neurología - Centro de Epilepsia<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
seifergustavo@yahoo.com.ar

**Objetivo:** Analizar las características clínicas, EEG y de neuroimágenes en una serie de pacientes con epilepsia resistente por Displasia Cortical Focal (DCF) vs. Displasia Focal del Transmanto (DFT). **Método:** Revisamos 28 historias clínicas de pacientes con epilepsia por DCF del Centro de Epilepsia del Htal Ramos Mejía, Buenos Aires, Argentina. Analizamos sexo, edad de inicio de las crisis (EIC), antecedentes personales (AP), patología asociada (PA), frecuencia de crisis (FC) y las imágenes de resonancia magnética (IMR). **Resultados:** DCF: (n=20), edad media 34 años, EIC de 9.68 años, FC 4 crisis por mes, AP (anoxia perinatal) en 5/20 (25%), 17/20 pacientes en politerapia, 4/20 generalizan, EEG patológico 16/20. Ubicación en lóbulo frontal 7/20, PA en 4/20, esclerosis hipocampal (3/4)DFT: (n=8), edad media 35 años, EIC de 10.8 años, FC 6.12 crisis por mes, AP (anoxia perinatal) en 6/8 (75%), 8/8 pacientes se encuentran en politerapia, 3/8 generalizan, el EEG es patológico en 7/8. Ubicación en lóbulo frontal 6/8, PA en 0/8. Los AP y la politerapia discrimina entre los 2 grupos ( $p=0,015$  y  $p=0,023$ ). Se observó una menor asociación del grupo de DFT con otras patologías (PA) pero no alcanza valores significativos ( $p=0,29$ ). **Conclusión:** Las DFT son mas frecuentes en el lóbulo frontal, parecen tener un comportamiento más agresivo (dado por una mayor FC y necesidad de politerapia). En sus génesis parecería ser más importante factores traumáticos cercanos al parto.

**096. (472) EFECTOS DEL ESTRES PRENATAL EN EL COMPORTAMIENTO DE ANIMALES EXPUESTOS A ESTRÉS CRONICO. PARTICIPACION DE NEUROTRÓFINAS**

Pascuan C.<sup>1</sup>; Palumbo M.<sup>2</sup>; Zorrilla Zubilete M.<sup>3</sup>; Genaro A.<sup>4</sup>

CEFYO- Dto de Farmacología. Fac Medicina- CONICET-UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
ceciliapascuan@gmail.com

Departamento de Química Biológica. IQUIFIB. Facultad De Farmacia y Bioquímica UBA - CONICET<sup>1 2</sup>  
mjuliaperez@gmail.com

Se ha descrito que el estrés prenatal (EP) puede influenciar el comportamiento de la descendencia. El objetivo de este trabajo fue investigar si existen alteraciones en el comportamiento y en la expresión de neurotrofinas en animales adultos sujetos a EP. Para ello, ratones preñados fueron sometidos a estrés por inmovilización durante dos horas diarias, desde el día 14 de preñez hasta el parto. Se utilizaron crías, de dos meses de edad, provenientes de madres estresadas (EP; n=10) y de madres sin estresar (control; n=10). La mitad de los animales de cada grupo fue sometida a estrés crónico. El EP no indujo cambios en el desempeño en la prueba de alternancia ni en la prueba de campo abierto. Observamos una disminución en los niveles de BDNF ( $24 \pm 8\%$ ,  $p < 0,05$ ) en el hipocampo de animales EP. Además observamos una disminución en los niveles de BDNF ( $46 \pm 5\%$ ,  $p < 0,05$ ) y NT3 ( $63 \pm 6\%$ ,  $p < 0,01$ ) en linfocitos de estos animales. Por otro lado los animales EP expuestos a estrés crónico (EP+EC) mostraron un peor desempeño en la prueba de alternancia (EP+ EC:  $50,3 \pm 1,5\%$  de alternancias; EP:  $62 \pm 2,5\%$  de alternancias,  $p < 0,05$ ), respecto a animales control sometidos a estrés crónico (EC:  $55 \pm 2,5\%$  de alternancias; controles:  $59 \pm 4\%$  de alternancias). Además observamos una disminución en los niveles de BDNF (control:  $23 \pm 4\%$ ,  $p < 0,01$ ; EP:  $10 \pm 5\%$ ,  $p < 0,05$ ) en el hipocampo y NT3 (control:  $70 \pm 12\%$ , EP  $37 \pm 3\%$ ) en linfocitos de animales control y EP sometidos a estrés crónico. Observamos además una disminución de los niveles de BDNF ( $78 \pm 5\%$ ,  $p < 0,01$ ) en animales control pero no observamos una disminución adicional en animales EP sometidos a estrés crónico. Estos resultados indican que el EP induce una mayor sensibilidad a los efectos deletéreos del estrés crónico en la vida adulta. Además los linfocitos podrían ser un marcador periférico de las alteraciones que ocurren en el hipocampo.

**097. (578) MODULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE IL-10 Y DE LA EXPRESIÓN DE PPAR-GAMMA POR UN ANÁLOGO DE ALFA-MSH EN CÉLULAS GLIALES.**

Carniglia L.<sup>1</sup>; Caruso C.<sup>2</sup>; Durand D.<sup>3</sup>; Lasaga M.<sup>4</sup>  
Instituto de Investigaciones en Reproducción - Facultad de Medicina - UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
lcarniglia@fmed.uba.ar

Los astrocitos y la microglia juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria en el sistema nervioso central. La hormona alfa-melanocito estimulante (alfa-MSH) ejerce efectos inmunomoduladores en diversos modelos de neuroinflamación. Previamente demostramos que esta hormona ejerce sus acciones anti-inflamatorias en astrocitos a través de los receptores de melanocortinas (MCR) tipo 4. En este estudio decidimos evaluar el efecto de la NDP-alfa-MSH (análogo sintético de la alfa-MSH y agonista de los MCR) sobre la liberación de la citoquina anti-inflamatoria interleuquina 10 (IL-10) y sobre la expresión proteica del receptor activado por proliferadores de peroxisomas-gamma (PPAR-gamma, un receptor nuclear supresor de la respuesta inflamatoria), en cultivos primarios de astrocitos y microglia. El tratamiento con NDP-alfa-MSH ( $10^{-8}$  -  $10^{-5}$  M) por 24 hs indujo un aumento significativo en la liberación de IL-10 desde microglia pero no desde astrocitos ( $10^{-8}$ M:  $79\%*$ ;  $10^{-7}$ M:  $140\%**$ ;  $10^{-6}$ M:  $129\%**$ ;  $10^{-5}$ M:  $103\%**$  vs control) ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ). Por otro lado, NDP-alfa-MSH  $10^{-7}$ M provocó un aumento en la expresión de PPAR-gamma evaluada por western blot en ambos tipos celulares a las 24 hs (2.4 veces en astrocitos; 6.4 veces en microglia) ( $p < 0,05$ ). En conclusión, el aumento de la liberación de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 y de la expresión de PPAR-gamma, podrían ser mecanismos involucrados en el efecto anti-inflamatorio de las melanocortinas en células gliales.

**098. (731) LA TRANSFERRINA Y SU RECEPTOR EN LA MADURACIÓN DE CÉLULAS OLIGODENDROGLIALES**

Pérez M.<sup>1</sup>; Pasquini J.<sup>2</sup>

En nuestro laboratorio se ha estudiado a la transferrina (Tf) como factor trófico en los procesos de mielinización y remielinización del SNC y se ha demostrado su rol como inductora de la diferenciación oligodendroglial. En este trabajo, describiremos si el mecanismo celular de la acción de la Tf involucra al receptor de Tf (RcTf) estudiando la presencia del mismo en diferentes estadios del linaje oligodendroglial y las vías de señalización que activa la Tf en cultivos primarios de precursores oligodendrogliales (OPC). Los cultivos primarios se realizaron utilizando ratas de la cepa Wistar de 2 días de edad de acuerdo al método de Mc Carthy and De Vellis (1980). Hemos caracterizado mediante inmunocitoquímica la expresión del RcTf en la ontogenia oligodendroglial: en OPC y pre-oligodendrocitos (preOLG) (células que expresan NG2 y PDGFR-alfa), se observa una intensa inmuno tinción, mientras que en OLGs maduros (positivos para la proteína básica de mielina) la expresión del RcTf disminuye. El tratamiento con Tf disminuye el número de células positivas para el RcTf. Estos datos coinciden con los ensayos de incorporación de Tf-Texas red en función del tiempo dado que a los 10 min, tanto OPC como preOLG, incorporan Tf. Ensayos de Western blot muestran que el tratamiento con Tf produce un aumento de la proteína fosfo-Fyn quinasa a los 15 min ( $67 \pm 3\%$ ), seguido de un incremento de la fosforilación de AKT y ERK a los 30 min ( $273 \pm 37\%$  y  $239 \pm 140\%$ , respectivamente). La activación en las vías de señalización intracelular mencionadas se exacerban en presencia del anticuerpo anti-RcTf. El tratamiento con Tf evidencia un efecto madurativo de los OPC en cultivo y se asocia con una activación de las vías de señalización del PI3K y MAPK. La expresión del RcTf varía durante la ontogenia OLG y se expresa fuertemente en estadios inmaduros, coincidiendo con los estadios más susceptibles al tratamiento con Tf.

**099. (735) LA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE HORMONA TIROIDEA PROMUEVE LA REMIELINIZACIÓN CORTICAL EN UN MODELO DE DESMIELINIZACIÓN INDUCIDO POR CUPRIZONA**

Bartucci S.<sup>1</sup>; Silvestroff L.<sup>2</sup>; Marziali L.<sup>3</sup>; Pasquini J.<sup>4</sup>; Franco P.<sup>5</sup>  
Departamento de Química Biológica e Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB) Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA - CONICET.<sup>1 2 3 4 5</sup>  
pgfranco@ffyub.uba.ar

La Esclerosis Múltiple es una enfermedad desmielinizante que afecta principalmente regiones del SNC ricas en sustancia blanca. Recientemente se ha determinado que los pacientes presentan lesiones desmielinizantes en la corteza que podrían ser la causa directa de la disfunción cognitiva. En este trabajo utilizamos un modelo de desmielinización en ratas Wistar de 21 días de edad, por administración de 0.6% cuprizona en la dieta durante 2 semanas. Estudiamos la evolución temporal de la desmielinización y determinamos que 1 semana después del retiro del tóxico de la dieta se observa una marcada desorganización de la mielina en los axones del cuerpo calloso por microscopía electrónica. Sin embargo, la desmielinización cortical parece ser un evento más temprano. El análisis inmunohistoquímico en cortes de cerebro reveló que la expresión de MBP, un marcador de oligodendrocitos mielinizantes, se reduce progresivamente en la corteza en el transcurso de las 2 semanas en que el tóxico es administrado, aún antes que se observen daños evidentes en el cuerpo calloso. En paralelo, se detectó una marcada astrogliosis por aumento en el número de astrocitos GFAP<sup>+</sup>. Las capas corticales con mayor depleción de mielina son las que presentan mayor astrogliosis, sugiriendo una correlación directa entre el daño oligodendroglial y la activación astrogliar. La función de la hormona tiroidea (HT) sobre los mecanismos de remielinización en el cuerpo calloso ya ha sido demostrada previamente pero se desconoce su acción sobre las lesiones corticales. La administración intranasal de HT en

ratas desmielinizadas acelera la remielinización cortical respecto de animales tratados con solución salina. La expresión de MBP se recupera gradualmente desde las capas más profundas de la corteza hacia las más superficiales. La manipulación de los niveles de HT podría utilizarse como estrategia para promover el proceso de desmielinización o prevenir el daño neuronal irreversible.

**100. (788) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN NEURONAL NCAM EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO**

Codagnone M.<sup>1</sup>; Podestá M.<sup>2</sup>; Reinés A.<sup>3</sup>  
*Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, Uba-CONICET); Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 2 3</sup>*  
*mcodagnone@ffyba.uba.ar*

Alteraciones sinápticas han sido descritas en patologías del espectro autista (EA). Se ha sugerido que estas alteraciones promoverían cambios en la conectividad neuronal y se ha postulado la posible participación de las moléculas de adhesión sináptica en estas patologías. La administración de ácido valproico (VPA) en ratas durante la gestación es un modelo experimental de autismo ampliamente aceptado ya que simula varias de las características conductuales y neuroanatómicas descritas en esta patología. En este trabajo nos propusimos estudiar la posible participación de la molécula de adhesión neuronal (NCAM) en las alteraciones de la conectividad sináptica descrita en animales VPA. Para ello, determinamos los niveles de expresión de NCAM en áreas cerebrales altamente comprometidas como el hipocampo y la corteza cerebral. Los animales VPA evidenciaron un déficit en las pruebas de evaluación madurativa. Mostraron un retraso en el crecimiento, evaluado como ganancia de peso, y en la apertura de ojos y un incremento en la latencia al reconocimiento del nido durante la prueba de discriminación olfatoria. Estos animales presentaron alteraciones en el reflejo de geotaxis negativa y en la conducta de nado. A PND 30, se observaron alteraciones en la organización estructural del hipocampo y de la corteza cerebral, tales como una variación en la contribución celular de las distintas subregiones hipocámpales y de las diferentes capas corticales. En ambas áreas cerebrales, estos cambios se acompañaron de una reducción en la expresión de NCAM evidenciada por inmunohistoquímica. Nuestros resultados indican que los animales VPA presentan un retraso madurativo compatible con la presencia de alteraciones de manifestación temprana, requisito indispensable para simular patologías del tipo EA. La reducción de NCAM observada en estos animales sugiere cambios en la adhesividad sináptica en estas áreas cerebrales, compatibles con una disminución de la conectividad neuronal.

**101. (147) CAMBIOS EN EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DEL RECEPTOR GABA-A INDUCIDOS POR UNA BREVE EXPOSICIÓN DE NEURONAS CORTICALES A GABA**

Gutiérrez M.<sup>1</sup>; Ferrerí M.<sup>2</sup>; Gravielle M.<sup>3</sup>  
*Instituto de Investigaciones Farmacológicas CONICET UBA<sup>1 2 3</sup>*  
*mgutierrez@ffyba.uba.ar*

Numerosas evidencias indican que la activación continua del receptor GABA<sub>A</sub> en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas produce cambios en su estructura y/o función. Experimentos realizados en cultivos primarios de corteza cerebral de rata mostraron que una exposición crónica (48 hs) a GABA induce una reducción en el número de receptores y una disminución de la interacción entre los sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas, fenómeno llamado desacoplamiento. Sin embargo, una exposición breve a GABA ( $t_{1/2}$ =3 min), induce desacoplamiento horas más tarde ( $t_{1/2}$ =12 hs) pero no produce modificación en el número de receptores. Este paradigma nos permitió estudiar el mecanismo de desacoplamiento en forma independiente al mecanismo de regulación del número de receptores. En estudios previos, utilizando el modelo antes mencionado, encontramos una disminución en los niveles de ARNm y proteína de ciertas subunidades del receptor, y en la proporción de receptores conteniendo la subuni-

dad  $\alpha$ 3. Por otro lado demostramos que inhibidores de proteínas quinasas PKA y PKC previenen el desacoplamiento inducido por exposiciones breves de los cultivos neuronales a GABA. Dado que la fosforilación del receptor GABA<sub>A</sub> regula su función y su tráfico intracelular, el objetivo del presente trabajo fue estudiar posibles cambios en el estado de fosforilación de residuos serina presentes en las subunidades  $\beta$ 2 y  $\gamma$ 2, que se conoce son susceptibles a ser fosforiladas. La exposición a GABA produjo un aumento del 27.8  $\pm$  5.3% ( $p \leq 0.05$ ) en el grado de fosforilación de residuos serina de la subunidad  $\gamma$ 2 pero no se encontraron cambios significativos en el grado de fosforilación en la subunidad  $\beta$ 2. Estos resultados sugieren que la activación de las vías de fosforilación de las proteínas quinasas PKA y PKC forman parte del mecanismo de desacoplamiento, probablemente a través de la fosforilación de ciertas subunidades del receptor.

**102. (238) AUTOANTICUERPOS ANTI-M3 EN EL SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO (SSP) INHIBEN LA PRODUCCIÓN DE MUCINA POR LA GLÁNDULA SUBMAXILAR DE LA RATA**

Passafaro D.<sup>1</sup>; Sterin-borda L.<sup>2</sup>; Reina S.<sup>3</sup>; Borda E.<sup>4</sup>  
*Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA<sup>1</sup>;*  
*Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA;*  
*CONICET<sup>2 3 4</sup>*  
*danielapassafaro@yahoo.com.ar*

Los pacientes con SSp poseen autoanticuerpos circulantes en el suero del tipo IgG que interaccionan con los receptores glandulares colinérgicos muscarínicos del subtipo M<sub>3</sub>. En este trabajo estudiamos el efecto de dichos anticuerpos sobre la producción y liberación de mucina y la participación de segundos mensajeros en su señalización. Se cuantificó en la glándula submaxilar de la rata la producción y liberación de mucina mediante técnica colorimétrica, la producción de PGE<sub>2</sub> (por enzimo inmuno ensayo) y los inosítoles fosfatos (InsP) totales (por liberación de [<sup>3</sup>H]inositol) en presencia de la IgG anti-M<sub>3</sub> (desde 1x10<sup>-9</sup>M hasta 1x10<sup>-6</sup>M), de inhibidores enzimáticos (U-73122, FR 122047, DuP 697) y de bloqueantes de receptores muscarínicos (pirenzepina [M<sub>1</sub>], 4-DAMP [M<sub>2</sub>] y de receptores a prostaglandinas (SC 19220 [EP1], AH 6809 [EP1/EP2]). Los resultados muestran que la IgG anti-M<sub>3</sub> (1x10<sup>-7</sup>M) al interaccionar con los receptores M<sub>3</sub> glandulares disminuye la producción (basal: 595 $\pm$ 62; IgG anti-M<sub>3</sub>: 313 $\pm$ 47) y liberación (basal: 29 $\pm$ 3; IgG anti-M<sub>3</sub>: 16 $\pm$ 2) de mucina [ $\mu$ g/mg proteína; X $\pm$ SEM; n=7 en cada caso]. Esta disminución no se observa en presencia de la IgG control ni de la IgG anti-M<sub>3</sub> + DuP 697 5x10<sup>-8</sup>M (inhibidor de ciclooxigenasa-2 [COX-2]) o U-73122 1x10<sup>-6</sup>M (inhibidor de fosfolipasa C [PLC]). Asimismo, el efecto de la IgG anti-M<sub>3</sub> fue también bloqueado por el 4-DAMP (1x10<sup>-6</sup>M), por el péptido sintético M<sub>3</sub> (10 $\mu$ g/ml) y por el SC 19220 (1x10<sup>-8</sup>M). Concluimos que la IgG anti-M<sub>3</sub> presente en el suero de los pacientes con SSp disminuye la mucina salival (producción y liberación) por interacción con el receptor M<sub>3</sub> glandular, y modulando la activación de PLC y COX-2, con incremento de inosítoles fosfatos y PGE<sub>2</sub>. De esta manera los autoanticuerpos anti-M<sub>3</sub> podrían participar en la etiopatogenia de la sequedad bucal, reduciendo la protección que la mucina brinda a los tejidos bucales contra las agresiones físico-químicas y biológicas.

**103. (279) BILIRUBIN MODULATES CELL CYCLE IN RAT CEREBELLA**

Robert M.<sup>1</sup>; Gazzin S.<sup>2</sup>; Berengeno A.<sup>3</sup>; Bellarosa C.<sup>4</sup>;  
 Tiribelli C.<sup>5</sup>;  
*Centro Studi Fegato- Fondazione Italiana Fegato<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*celest.robert@csf.units.it*

High levels of unconjugated bilirubin (UCB) in plasma can lead to accumulation of bilirubin in the brain as occurs in the inherited deficiency of hepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (Crigler-Najjar type I Syndrome) or to its immaturity in neonates. The Gunn rat represents the animal model for the condition. Homozygous hyperbilirubinemic jj Gunn rats develop marked cerebellar hypoplasia with the greatest damage occurring in brain areas that mature postnatally. Recently, an effect of UCB on cell cycle progression

has been described with cell cycle arrest in the late G1 phase. The aim of this study was to investigate if the cerebellar hypoplasia observed in *jj* Gunn rat could be caused by UCB by cell cycle arrest. The cerebella from hyperbilirubinemic (*jj*) and normal (*JJ*) Gunn rat at 9 days after birth was dissected and divided in two parts. The first was used to evaluate the mRNA relative expression of Cyclin A, D1, E, and Cdk2 genes using Real Time q-PCR ( $n=11$ ); and the other one to determine the protein levels of Cdk2 and Cyclin A by quantitative Western Blot ( $n=9$  and  $n=4$  respectively). At mRNA level, we observed a slight reduction in Cyclin D1 expression in *jj* rats ( $JJ 1.00 \pm 0.18$  vs. *jj*  $0.80 \pm 0.30$ ) and a significant increase in the Cyclin E expression ( $JJ 1.00 \pm 0.34$  vs. *jj*  $1.44 \pm 0.26$ , \*\*  $p < 0.01$ ). The mRNA expression of Cyclin A and Cdk2 was unchanged. The protein relative expression of Cdk2 was significantly reduced in *jj* animals ( $JJ 1.12 \pm 0.11$  vs. *jj*  $0.84 \pm 0.07$  \*\*\*  $p < 0.001$ ), while the protein level of Cyclin A was unchanged. Our *in vivo* study shows that bilirubin could exert an effect on the cell cycle regulation through alteration of the protein expression of the Cdk2, the catalytic subunit of the cell cycle regulators. The exact point of the cell cycle at which bilirubin is acting needs to be elucidated.

#### 104. (359) EFECTO A LARGO PLAZO DEL ESTRÉS SOBRE LA EXPRESIÓN DE CRF EN HIPOCAMPO Y AMÍGDALA. RESULTADOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESIÓN

Fernández Macedo G.<sup>1</sup>; Cladouchos M.<sup>2</sup>; Sifonios L.<sup>3</sup>; Cassanelli P.<sup>4</sup>; Wikinski S.<sup>5</sup>  
 Instituto de Investigaciones Farmacológicas ININFA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 georginafm@ffyba.uba.ar

En trabajos anteriores hemos descrito una disminución de la expresión del receptor tipo 1 del factor liberador de corticotrofina (CRF1) y de la señalización intracelular mediada por ERK 1/2 en el hipocampo de ratas 25 días después de haber sido expuestas a un estrés severo. Estas alteraciones coinciden con cambios comportamentales característicos del modelo experimental de depresión (learned helplessness o LH) utilizado para estos estudios. Además, la disminución de la expresión de CRF1 se corrige con el tratamiento crónico con antidepresivos. En este trabajo postulamos que esta disminución persistente a lo largo del tiempo en la expresión del receptor podría responder a un aumento, igualmente persistente, del péptido CRF a nivel local (hipocampal) o en la amígdala, uno de los principales núcleos cerebrales con *input* sobre el hipocampo en respuesta al estrés. Por lo tanto, nos propusimos medir mediante qRT-PCR en tiempo real, los niveles de ARNm de CRF en hipocampo y en amígdala de ratas Wistar 25 días después de haber sido expuestas al paradigma LH. Se compararon animales control (ratas no expuestas al estrés inescapable) con animales LH (ratas expuestas al estrés inescapable que desarrollaron el comportamiento de desesperanza). Los animales LH presentaron un aumento del 92% en la expresión de CRF con respecto al control ( $p < 0,05$ ) en amígdala, mientras que en hipocampo no presentaron diferencias significativas. Estos resultados muestran que una única exposición a estrés provoca un aumento persistente de CRF en amígdala y también permiten proponer que la disminución anteriormente observada en la expresión de CRF1 en hipocampo podría constituir una respuesta adaptativa.

### ENDOCRINOLOGIA 1

#### 105. (127) ROL DEL RECEPTOR MAS EN LOS EFECTOS POSITIVOS DE LA ANGIOTENSINA-(1-7) SOBRE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA INSULINA

Muñoz M.<sup>1</sup>; Pons R.<sup>2</sup>; Giani J.<sup>3</sup>; Carranza A.<sup>4</sup>; Burghi V.<sup>5</sup>; Corapi M.<sup>6</sup>; Taira C.<sup>7</sup>; Turyn D.<sup>8</sup>; Dominici F.<sup>9</sup>  
 IQUIFIB; Cátedra de Química Biológica, UBA<sup>1 2 3 5 6 8 9</sup>;  
 Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA<sup>4 7</sup>  
 <marinacmg@hotmail.com>

A través de la activación del receptor AT1, la Ang II atenúa la vía de señalización de insulina (INS). El antagonismo farmacológico de la Ang II mejora la resistencia a la INS en diversos modelos animales de síndrome metabólico. Dicho fenómeno se asocia a un incremento de los niveles circulantes de Ang-(1-7). Esta hormona revierte el efecto negativo que ejerce la Ang II sobre la activación de la enzima Akt en respuesta a INS en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado y su administración crónica mejora la resistencia a la INS en un modelo animal de síndrome metabólico. Sin embargo, la participación del receptor Mas, específico para Ang-(1-7), en estos efectos no ha sido determinada. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación del receptor Mas en los efectos agudos y crónicos de la Ang-(1-7). En los ensayos agudos, ratas Sprague-Dawley (SD) macho fueron inyectadas vía vena cava inferior con solución salina, con soluciones conteniendo 8pmol/Kg de INS, Ang-(1-7), Ang II o con una mezcla equimolar de INS+Ang II, INS+Ang II+Ang-(1-7) o INS+Ang II+Ang-(1-7)+A-779 (80pmol/Kg; antagonista específico del receptor Mas). En los tejidos analizados, se determinó la fosforilación de la enzima Akt por inmunoblotting. En el ensayo crónico, se implantaron mini bombas osmóticas con soluciones conteniendo Ang-(1-7), Ang II, A-779 o una mezcla equimolar de Ang-(1-7)+A-779 (100ng/Kg.min) en ratas SD con insulino-resistencia generada por sobrecarga de fructosa (FRU) y se realizó un test de tolerancia a la glucosa. En los estudios agudos, la Ang-(1-7) revirtió el efecto negativo generado por la Ang II sobre la estimulación de Akt en todos los tejidos estudiados. En el estudio crónico, la administración crónica de Ang-(1-7) normalizó la secreción de insulina en respuesta a la sobrecarga de glucosa en el modelo de FRU. Los efectos observados fueron revertidos en presencia de A-779, sugiriendo la participación del receptor Mas en los efectos observados.

#### 106. (168) EFECTO PREVENTIVO DE UNA TIAZOLIDINEDIONA SOBRE LA DISFUNCIÓN DEL TEJIDO ADIPOSITIVO ABDOMINAL INDUCIDA POR DIETA RICA EN FRUCTOSA

Alzamendi A.<sup>1</sup>; Giovambattista A.<sup>2</sup>; Castro M.<sup>3</sup>; Masa L.<sup>4</sup>; Francini F.<sup>5</sup>; Gagliardino J.<sup>6</sup>; Spinedi E.<sup>7</sup>  
 Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICP-BA)<sup>1 2 7</sup>; Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, GENEXA (CONICET-UNLP)<sup>3 4 5 6</sup>  
 neuroend@imbice.org.ar

**Antecedentes:** Nuestros grupos demostraron que la administración de dieta rica en fructosa (DRF) durante 3 semanas, induce un estrés oxidativo (EO), acompañado de hipertrigliceridemia, insulinoresistencia con hiperinsulinemia e hiperleptinemia. Igualmente cambios significativos en la masa, composición y función endocrino-metabólica del tejido adiposo abdominal (TAA). Este último muestra cambios en la composición de ácidos grasos (AG) con aumento del porcentaje de AG saturados y aumento de la liberación de AG libres (AGL) y leptina (L). **Objetivo:** analizar el efecto de la administración de pioglitazona sobre los cambios inducidos en el TAA por la DRF. **Metodología:** alimentamos ratas macho adultas normales durante 3 semanas con dieta comercial estándar (C) o igual dieta más 10% de F en agua de bebida (DRF); en ambos casos agregamos un grupo tratado con pioglitazona (0,25 mg/Kg/día; PIO-C y PIO-DRF). Al momento del sacrificio obtuvimos sangre para determinar glucemia (G), triglicéridos (TG), Insulina (I), L y PAI-1; diseccamos la grasa abdominal y, aislamos (digestión con colagenasa) e incubamos adipocitos. **Resultados:** el peso corporal y la G fue comparable en todos los grupos. Las ratas DRF mostraron aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en TG ( $1,93 \pm 0,09$  vs  $1,18 \pm 0,06$  g/L), I ( $1,13 \pm 0,05$  vs  $0,76 \pm 0,03$  ng/mL), L ( $6,67 \pm 0,62$  vs  $4,77 \pm 0,35$  ng/mL) y PAI-1 ( $3,72 \pm 0,52$  vs  $1,59 \pm 0,23$  ng/mL). La PIO previno ( $p < 0,05$ ) dichos aumentos manteniendo su concentración en valores similares al grupo C. Los adipocitos de DRF incubados en ausencia o presencia de I (10 nM) liberaron mayor cantidad de L que los aislados de C ( $0,39 \pm 0,02$  vs  $0,23 \pm 0,02$  ng/mL en basal; y  $0,45 \pm 0,02$  vs  $0,32 \pm 0,01$  ng/mL post-I). El tratamiento con PIO disminuyó a valores comparables a los registrados

en adipocitos C. **Conclusión:** la co-administración de PIO con DRF previene la disfunción endocrina del TAA y la insulinoresistencia inducida por el exceso de fructosa alimentaria, hecho de aplicación potencial en clínica (PICT 1051-2007).

**107. (178) EFECTO DEL ANTIOXIDANTE N-ACETILCISTEINA EN LA ACUMULACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS EN UN MODELO DE ADIPOCITOS DE RATON**

Calzadilla P.<sup>1</sup>; Calvo J.<sup>2</sup>; Guerra L.<sup>3</sup>  
FCEYN Uba<sup>1 2 3</sup>  
pablo\_calza@hotmail.com

La cascada de señalización en adipogénesis incluye los factores de transcripción C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\delta$  y PPAR $\gamma$ , así como fosforilación de AKT por insulina. Se ha visto que la acumulación de triglicéridos (Tg) provoca estrés oxidativo sistémico. Para estudiar la relación "acumulación de ácidos grasos y estrés oxidativo" evaluamos el antioxidante N-acetil-cisteína (NAC) sobre la acumulación de Tg, determinando la expresión de estos factores y el nivel de ROS celular en la línea celular 3T3-L1, que diferencia adipocitos maduros con el agregado de agentes inductores (DC: Células diferenciadas, CC: Células Control). Las células son tratadas con 10  $\mu$ M NAC durante la diferenciación (DCN), sin observarse toxicidad. Estudios de a) fluorimetría y b) citometría de flujo usando diacetato de 2'7' Diclorodihidrofluoresceína mostraron que el nivel de ROS intracelular aumentó durante la diferenciación. (a)  $1034 \pm 65$  nmol ROS/ $10^6$  células [DC] vs.  $485 \pm 7$  nmol ROS/ $10^6$  células [CC],  $p < 0.01$ , b) 50% en DC respecto a CC (1 UA [CC] vs  $1.80 \pm 0.38$  UA [DC]  $p < 0.01$ ). En comparación con DC, NAC redujo significativamente ( $p < 0.01$ ) ROS en adipocitos maduros [DCN] (a)  $306 \pm 43$  nmol ROS/ $10^6$  células; b)  $0.10 \pm 0.38$  UA). El nivel de Tg se evaluó por 14 días, al día 8 de la diferenciación disminuyó bajo tratamiento con NAC, ( $0.83 \pm 0.15$  g Tg/g proteínas [DC] vs  $0.2 \pm 0.12$  g Tg/g proteínas [DCN],  $p < 0.01$ ;  $0.16 \pm 0.1$  g Tg/g proteínas [CC]) NAC reduce la expresión de C/EBP $\alpha$  ( $11.8 \pm 2.0$  UA [DC] vs  $4.1 \pm 1.0$  UA [DCN],  $p < 0.01$ ); la expresión de C/EBP $\delta$  ( $2.79 \pm 0.67$  UA [DC] vs  $0.91 \pm 0.18$  UA [DCN]); y de PPAR $\gamma$  ( $3.4 \pm 0.6$  UA [DC] vs  $0.6 \pm 0.5$  UA [DCN],  $p < 0.01$ ). Sin embargo NAC no modifica la relación pAKT/AKT entre DC y DCN. Al evaluar la cascada de señalización para la producción de Tg mostramos que NAC alteraría las vías regulatorias de la expresión de los factores de transcripción adipogénicos, en un tiempo posterior a la fosforilación de AKT. NAC afecta el nivel de ROS así como también la acumulación de Tg.

**108. (232) IMPACTO DE LA ANDROGENIZACIÓN NEONATAL EN LA RATA HEMBRA, SOBRE PARÁMETROS ENDOCRINO-METABÓLICOS A LA EDAD PRE-PUBERAL**

Ongaro L.<sup>1</sup>; González B.<sup>2</sup>; Rulli S.<sup>3</sup>; Calandra R.<sup>4</sup>; Giovambattista A.<sup>5</sup>; Spinedi E.<sup>6</sup>  
Unidad de Neuroendocrinología IMBICE CONICET CICPBA<sup>1 5 6</sup>; IBYME CONICET<sup>2 3 4</sup>  
ongaroluisina@imbice.org.ar

Estudios de nuestro laboratorio indican que la androgenización neonatal (AN) en la rata hembra induce disturbios endocrino-metabólicos a la edad adulta. En el presente trabajo se estudió el impacto de la AN en la rata hembra a la edad pre-puberal (30 días de edad). Con este objetivo, neonatos (día 5 edad) hembra fueron inyectados s.c. con aceite de maíz estéril (50  $\mu$ L) solamente (CT) o conteniendo propionato de testosterona (PT; 1,25 mg), y estudiados 25 días después. En el día del sacrificio se recolectó sangre del tronco corporal y, se disecaron el tejido adiposo parametral (TAP) y las glándulas adrenales (GA). En las muestras de plasma se determinaron las concentraciones de LH, FSH, corticosterona (B), testosterona total (TT), y leptina (LEP). Con las GA se procedió al aislamiento e incubación *in vitro* (basal y post-ACTH) de una fracción celular enriquecida de la zona fasciculata-reticularis (350.000 cél/tubo). Los resultados indican que el peso corporal (PC) y las concentraciones circulantes de B y LEP fueron significativamente ( $p < 0.05$ ) mayores en el grupo PT vs. el CT. Sin embargo, el mayor PC en los animales PT no fue dependiente de cambios en la masa de TAP. No se hallaron

diferencias significativas en las concentraciones circulantes de TT, LH y FSH. Los resultados de los experimentos *in vitro* indicaron que la secreción de B al medio, aunque similar en condición basal, fue significativamente ( $p < 0.05$  vs. CT) mayor en el grupo PT luego del estímulo con ACTH (0,1-1 ng/ml). Estos resultados indican que la AN en la rata hembra induce, a la edad pre-puberal, un incremento en el PC, las concentraciones circulantes de LEP y la sensibilidad adrenal a la ACTH, siendo este último efecto observado tanto *in vivo* como *in vitro*. Este estudio sugiere que la AN en la rata hembra impacta modulando positivamente la función corticoadrenal durante el estadio pre-puberal. (PIP 0704-2007)

**109. (306) METFORMINA REVIERTE LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO ÓSEO ASOCIADAS AL SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR FRUCTOSA EN RATAS**

Felice J.<sup>1</sup>; Cortizo A.<sup>2</sup>; Molinuevo M.<sup>3</sup>; Gangoiti M.<sup>4</sup>; Tolosa M.<sup>5</sup>; Sedlinsky C.<sup>6</sup>; Schurman L.<sup>7</sup>; Mccarthy A.<sup>8</sup>  
GIOMM, Depto de Cs Biológicas, Fac De Cs Exactas, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
jifelice@biol.unlp.edu.ar

Varios estudios muestran que el Síndrome Metabólico (SM) se asocia con un aumento en la incidencia de fracturas osteoporóticas. Recientemente encontramos que la Metformina oral promueve la diferenciación osteoblástica de células progenitoras de médula ósea (CPMO). En este trabajo evaluamos los efectos del SM inducido por Fructosa sobre el metabolismo óseo en ratas, y la modulación de estos efectos por Metformina oral. Dividimos ratas Sprague Dawley machos jóvenes (200g) en cuatro grupos: C (sin tratamiento), M (100 mg/kg/día Metformina), F (10% Fructosa en el agua de bebida) y FM (Fructosa+Metformina). Luego de 3 semanas de tratamiento, se tomaron muestras de sangre, se sacrificaron los animales y se disecaron sus fémures para obtención de CPMO por lavado del canal diafisario con medio de cultivo. Las CPMO se cultivaron 2-3 semanas en un medio osteogénico (con ácido ascórbico y b-glicerofosfato), midiendo luego su actividad de Fosfatasa Alcalina (FAL), secreción de Colágeno de tipo 1 (Col-1) y mineralización extracelular. Se observó un incremento en la glucemia y trigliceridemia en el grupo F versus el C, compatible con el desarrollo de SM. Las CPMO provenientes del grupo M mostraron un aumento en la FAL, Col-1 y mineralización, respecto del grupo C. Por el contrario, para las CPMO provenientes del grupo F encontramos una disminución significativa en la FAL (82% de C,  $p < 0.05$ ), en la secreción de Col-1 (62% de C,  $p < 0.01$ ) y en la mineralización extracelular (81% de C,  $p < 0.05$ ). El co-tratamiento con Metformina y Fructosa (grupo FM) no modificó el descenso en la FAL inducido por Fructosa; sin embargo, revirtió parcialmente la disminución de Col-1 (74% de C) y anuló completamente la inhibición de la mineralización inducida por Fructosa (103% de C). Estos resultados muestran: (a) que el SM inducido por Fructosa en ratas disminuye el potencial osteogénico de las CPMO; y (b) que estos efectos pueden ser parcial o totalmente revertidos por un tratamiento oral con Metformina.

**110. (341) IMPACTO DEL CONSUMO DE UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA POR LA RATA GESTANTE SOBRE LA FUNCIÓN ENDOCRINO-METABÓLICA DE LA PRIMER GENERACIÓN DE RATAS HEMBRA A LA EDAD ADULTA**

Alzamendi A.<sup>1</sup>; Castrogiovanni D.<sup>2</sup>; Spinedi E.<sup>3</sup>; Giovambattista A.<sup>4</sup>  
Unidad de Neuroendocrinología, IMBICE (CONICET-CICPBA)<sup>1 2 3 4</sup>  
neuroend@imbice.org.ar

El objetivo del presente estudio fue evaluar el impacto de la ingesta materna de una dieta rica en fructosa (DRF, fructosa 10% p/v en el agua de bebida) durante la gestación sobre las crías hembra en la vida adulta. Ratas hembra S-D preñadas fueron separadas en dos grupos: uno recibió agua (MC) y el otro DRF (MF); y alimento *ad libitum*, durante la gestación. Desde el nacimiento ambos grupos recibieron agua durante la lactancia. A partir del destete y hasta el día 60 las crías C y F (provenientes de madres MC y MF, respectivamente) recibieron agua y alimen-



to *ad libitum*; se registró el peso corporal (PC) y el consumo de alimento cada 48 hs. El día 60 se sacrificaron las ratas hembra, y se obtuvo sangre para el posterior dosaje de glucosa (GLU), triglicéridos (TG), insulina (INS) y leptina (LEP). Las hembras C y F remanentes fueron divididas en subgrupos: uno recibió agua (CC y FC, la primer letra indica el tratamiento de la madre, y la segunda al tratamiento en la vida adulta) y el otro recibió DRF (CF y FF), y alimento *ad libitum* durante 3 semanas. Se registró el PC diariamente, y el día 81 fueron sacrificadas, se obtuvo sangre para la determinación de GLU, TG, INS y LEP. Desde el día 21 al 60, no se observaron diferencias (entre C y F) en: PC; alimento consumido; niveles de GLU, TG, INS y LEP. Al día 81 de vida, se vio un aumento en el PC de las ratas CF vs. CC ( $p < 0,05$ ) y en las FF vs. CC, CF y FC ( $p < 0,001$ ). Las crías CF mostraron un aumento significativo vs. CC en los niveles de TG e INS ( $p < 0,05$ ). Las crías FF mostraron un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en los niveles de GLU, TG, INS y LEP (vs. CC, CF y FC). Estos resultados indican que la DRF en madres gestantes no induce, en sus crías hembra adultas, efectos metabólicos significativos en condiciones basales. Sin embargo, cuando estos animales son expuestos a una carga alostática (DRF) en la vida adulta, estos evidencian una incrementada susceptibilidad al desarrollo de trastornos metabólicos (PICT 1051-2007).

**111. (356) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA NADPH OXIDASA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO DEL TEJIDO ADIPOSE INDUCIDO POR DIETA RICA EN FRUCTOSA**

Fariña J.<sup>1</sup>; García M.<sup>2</sup>; Alzamendi A.<sup>3</sup>; Giovambattista A.<sup>4</sup>; Spinedi E.<sup>5</sup>; Gagliardino J.<sup>6</sup>  
CENEXA (UNLP-CONICET La Plata)<sup>1 2 6</sup>; IMBICE (CONICET-CICPBA)<sup>3 4 5</sup>  
rodio@hotmail.com

*Antecedentes:* Previamente demostramos que la administración de dieta rica en fructosa (DRF) durante 3 semanas, induce estrés oxidativo (EO), hipertrigliceridemia, insulinoresistencia e hiperleptinemia. También cambios marcados en la masa, composición y función endocrino-metabólica del tejido adiposo abdominal (TAA). El TAA cambió la composición de sus ácidos grasos (AG) (aumento del porcentaje de AG saturados) y de marcadores de EO y un aumento de la liberación de AG y leptina (L). *Objetivo:* analizar el efecto del bloqueo de la NADPH oxidasa (NOX; generadora de radicales libres) sobre los cambios inducidos en el TAA por la DRF. *Metodología:* alimentamos ratas macho adultas normales durante 3 semanas con dieta comercial estándar sin (C) o con 10% de F en agua de bebida (DRF); en ambos casos agregamos un grupo tratado con apocinina (A; bloqueante de NOX) (0,15 mmol/día; A-C y A-DRF). Al momento del sacrificio obtuvimos sangre para medir glucemia (G), triglicéridos (TG), Insulina (I), y PAI-1; disecamos la grasa abdominal y aislamos e incubamos adipocitos. *Resultados:* el peso corporal y la G fue comparable en todos los grupos. En las ratas DRF aumentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) TG (1,93±0,09vs1,18±0,06 g/L), I (1,13±0,05vs0,76±0,03 ng/mL), L (6,67±0,62vs4,77±0,35 ng/mL) y PAI-1 (3,72±0,52vs1,59±0,23 ng/mL). La A previno dichos aumentos registrándose su concentración en valores similares al grupo C. Los adipocitos de DRF incubados en ausencia (basal) o presencia de I (10 nM) liberaron mayor cantidad de L que los aislados de C (0,39±0,02vs0,23±0,02 ng/mL en basal; y 0,45±0,02vs0,32±0,01 ng/mL post-I). El tratamiento con A los disminuyó a valores comparables a los registrados en adipocitos C. *Conclusión:* los efectos beneficiosos de la A sobre la disfunción endocrina del TAA y los cambios de metabolitos circulantes inducidos por la DRF, sugieren su utilidad potencial en la prevención de situaciones clínicas asociadas a dietas no saludables (PICT 1051-2007).

**112. (563) EFECTO DE UNA DIETA DE ALTA GRASA Y DEL ESTRÉS CRÓNICO MODERADO SOBRE EL DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE LA DIABETES TIPO II Y LA RESPUESTA INMUNE EN ANIMALES DE LAS CEPAS BALB/C Y C57BL/6.**

Albarracín R.<sup>1</sup>; Rubinstein R.<sup>2</sup>; Wald M.<sup>3</sup>  
CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1 2 3</sup>  
rommista@hotmail.com

La diabetes tipo II (D2) es un síndrome que se establece cuando factores ambientales, principalmente obesidad y también estrés, desenmascaran la susceptibilidad genética. Asimismo, se sugiere la existencia de una asociación entre diabetes e inmunosupresión. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de una dieta de alta grasa y del estrés crónico moderado (CMS) en el desarrollo y evolución de la D2 y la respuesta inmune considerando la participación del condicionamiento genético. Se utilizaron ratones de las cepas BALB/c y C57Bl/6 (C57) los cuales fueron alimentados durante 6 meses con dietas estándar (DS) o con el agregado de un 27% de grasa (AG). A los 2 meses de tratamiento un grupo de animales fue sometido a CMS (DS+CMS, AG+CMS). A los 6 meses, el tratamiento con AG produjo un incremento en los niveles de colesterol (Cho) y triglicéridos (TG) plasmáticos en ambas cepas de ratones y en el peso de los C57, teniendo el CMS un efecto variable (% control. Cho BALB/c AG: 184±28, AG+CMS: 155±2\*; C57 AG: 217±26, AG+CMS: 201±43; TG: BALB/c AG: 150±33, AG+CMS: 95±17\*; C57 AG: 151±25, AG+CMS: 203±44\*; Peso: C57 AG: 153±19 AG+CMS: 115±9\*, \* $p < 0,05$ ). No se observaron modificaciones en las glucemias en ayuno y en el test de sobrecarga a la glucosa. Al evaluar la respuesta inmune a través de la estimulación selectiva de la proliferación de linfocitos T (LT) y B (LB), se observó una disminución sólo en los ratones C57 con dieta AG. La exposición al CMS incrementa o disminuye dicho efecto, dependiendo del tipo celular, T o B respectivamente (% control. LT: AG: 70±7, AG+CMS: 23±2; LB: AG: 27±3, AG+CMS: 65±3,  $p < 0,05$ ). Podemos concluir que una dieta con alta grasa lleva sólo a alteraciones lipídicas en ambas cepas de ratones, sin un claro efecto del CMS. La respuesta inmune se afectó sólo en la cepa C57, avalando que la base genética podría condicionar la evolución de los pacientes con D2 frente a un proceso infeccioso.

**113. (589) LAS PROTEÍNAS INMUNO MODULADORAS TSG-6 E IDO NO PARTICIPARÍAN EN LA REGENERACIÓN DEL ISLOTE INDUCIDA POR EL OLIGODEOXINUCLEÓTIPO IMT504**

Bianchi M.<sup>1</sup>; Calvo V.<sup>2</sup>; Chasseing A.<sup>3</sup>; Lago N.<sup>4</sup>; Libertun C.<sup>5</sup>; Montaner A.<sup>6</sup>; Lux-lantos V.<sup>7</sup>  
Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 3 5 7</sup>; GEMA BIOTECH<sup>4</sup>; Fundación Pablo Cassará<sup>6</sup>  
mbianchi@dna.uba.ar

Recientemente demostramos que el IMT504, un oligonucleótido tipo PyNTTTTGT, mejora la hiperglucemia, aumenta el número de islotes, el contenido y proliferación de células beta e induce la expresión temprana de los marcadores de progenitores pancreáticos nestina y Ngn3 en un modelo de ratas diabéticas por estreptozotocina (STZ) (Diabetologia2010;53:1184-9). Como el IMT504 tiene propiedades inmuno moduladoras, evaluamos la participación del sistema inmune en la regeneración del islote. Investigamos la expresión de proteínas involucradas en la inmuno modulación y la remodelación tisular, como TSG-6 (proteína del gen 6 estimulada por TNF) e IDO (indolamina 2,3 dioxigenasa), al momento en que se expresan células progenitoras. Ratas machos fueron inyectadas i.p. con una dosis de STZ (60mg/kg) o diluyente como control (día 1). Comenzando el día 4, animales diabéticos (glucemia: 11-20mM) y controles, fueron diariamente inyectados s.c. con salina (STZ y Control) o con IMT504 (4mg/día: STZ-IMT504) y sacrificados luego de dos disminuciones consecutivas de la glucemia. Los páncreas fueron inmunoteñidos para insulina, TSG-6 e IDO. Al sacrificio, los STZ estaban hiperglucémicos (24±2mM, n=6) mientras que los STZ-IMT504 (11±2mM, n=6) eran similares a los Controles (7±1mM, n=4). TSG-6 fue escasamente observada en los islotes, sin diferencias entre los grupos. Tinción positiva fue observada en muy pocas células tipo linfoides en islotes y bazo. La expresión de IDO fue insignificante en islotes co-teñidos para insulina, pero fue positivo en glándula mamaria normal (control positivo). Dado que a esta dosis de STZ la inflamación no parece ser la causa principal de la destrucción de los islotes, postulamos que la regeneración de los islotes es probablemente una consecuencia de la acción del IMT504 sobre progenitores pancreáticos y la proliferación de

células beta, con participación limitada de las proteínas inmuno moduladoras TSG-6 e IDO al momento de la evaluación. (CONICET, UBA, ANCYPT).

**114. (791) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE CÉLULAS STEM/PROGENITORAS VINCULADOS CON LAS FLUCTUACIONES DE LA POBLACIÓN DE LACTOTROPAS.**

Vaca A.<sup>1</sup>; Sosa L.<sup>2</sup>; Petiti J.<sup>3</sup>; Mukdsi J.<sup>4</sup>; Alvarez C.<sup>5</sup>; Torres A.<sup>6</sup>

Centro de Microscopía Electrónica. Fac. de Ciencias Médicas. UNC<sup>1 2 3 4 6</sup>; Escuela de Fisiología-Facultad de Medicina-Universidad de Santiago de Compostela, España.<sup>5</sup>  
alicia\_vaca\_cba@hotmail.com

La población de células adenohipofisarias manifiesta ajustes dinámicos en respuesta a fluctuaciones hormonales tales como pubertad, embarazo y lactancia. La adaptación de la glándula a diferentes requerimientos fisiológicos podría deberse al reclutamiento y diferenciación de células stem/progenitoras (S/P) localizadas en la zona marginal que limita el cleft hipofisario. Previamente demostramos que la población de células lactotropas muestra cambios significativos durante la lactancia. El objetivo del presente trabajo fue identificar células S/P en hipófisis y cuantificar marcadores de pluripotencialidad: Sox2 y Oct-4, evaluando posibles cambios durante la lactancia. Se utilizaron ratas hembras Wistar adultas en fase diestro del ciclo estral y en lactancia activa. Las hipófisis fueron procesadas para inmunocitoquímica ultraestructural, la que permitió determinar la localización topográfica de las células S/P por detección de marcadores de diferenciación:  $\beta$ -catenina y vimentina e identificar a nivel subcelular marcadores asociados al fenotipo de células S/P, el receptor de membrana GFRA2 y factores de transcripción, Sox2 y Oct-4. Se realizó cuantificación morfométrica de la inmunomarcación de Sox2 y Oct-4 por microscopía electrónica utilizando software Image J. Estadística: ANOVA-Fisher. Las células ciliadas de la zona marginal fueron negativas para  $\beta$ -catenina, mientras que las que expresaron vimentina se localizaron a su alrededor como si fuesen células de sostén. El receptor GFRA2 se expresó en células que limitan el cleft hipofisario. Los factores de transcripción Sox2 y Oct-4 se expresaron en células de la zona marginal observándose un aumento ( $p < 0,05$ ) de los mismos durante la lactancia activa con respecto a la fase diestro del ciclo estral. Los hallazgos observados serían indicativos de la participación de las células stem/progenitoras en las fluctuaciones que manifiesta la población de células lactotropas en condiciones fisiológicas de alta demanda hormonal.

## GASTROENTEROLOGÍA I

**115. (153) PARTICIPACIÓN DE PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENO (MAPKS) EN LA FALLA SECRETORA CANALICULAR INDUCIDA POR ESTRADIOL 17 $\beta$ -GLUCURÓNIDO (E217G) EN DUPLAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHRs)**

Boaglio A.<sup>1</sup>; Crocenzi F.<sup>2</sup>; Roma M.<sup>3</sup>

Instituto de Fisiología Experimental IFISE CONICET<sup>1 2 3</sup>  
acboaglio@yahoo.com

En estudios previos (Hepatology 48: 1885, 2008), demostramos que el agente colestásico E<sub>2</sub>17G induce alteraciones en la función y localización de los transportadores canaliculares responsables de la formación de bilis Bsep y Mrp2, vía activación de PKCc. Dado que se ha descrito la existencia de vías dependientes de PKCc que regulan la actividad de MAPKs, indagamos su posible mediación en las alteraciones canaliculares inducidas por E<sub>2</sub>17G en DAHRs. E<sub>2</sub>17G indujo activación de todos los tipos de MAPKs, estimada por un aumento del grado de autofosforilación de las enzimas por Western blotting. La cuantificación de la acumulación apical de sustratos fluorescentes de Bsep y Mrp2 por análisis digital de imágenes reveló que E<sub>2</sub>17G (200  $\mu$ M) disminuyó la capacidad de las DAHRs para secretar apicalmente colil-lisil-fluoresceína (CLF; -59,72 $\pm$ 1,82%,  $p < 0,005$  vs. control) y glutation-

metil-fluoresceína (GS-MF; -57,73 $\pm$ 6,18%,  $p < 0,005$  vs. control), sustratos respectivos de Bsep y Mrp2. Los inhibidores selectivos de MAPKs del tipo ERK 1/2 (PD098059, 50  $\mu$ M), del tipo JNK (SP600125, 10  $\mu$ M) y del tipo p38<sup>MAPK</sup> (SB203580, 1  $\mu$ M) previnieron parcialmente esta alteración (PD098059: CLF: +56,74 $\pm$ 7,25%, GS-MF: +51,36 $\pm$ 13,7%; SP600125: CLF: +48,60 $\pm$ 9,7%, GS-MF: +66,95 $\pm$ 3,9%; SB203580: CLF: +43,1 $\pm$ 6,6%, GS-MF: +67,67 $\pm$ 4,46; % >200 duplas en cada grupo,  $n=3-4$ ,  $p < 0,05$  vs. E<sub>2</sub>17G). Inmunomarcación seguida de microscopía confocal reveló que E<sub>2</sub>17G indujo una extensa internalización de Bsep y Mrp2, y que el pretratamiento con los diferentes inhibidores de MAPKs previno parcial pero significativamente estas alteraciones. Concluimos que las MAPKs participan en la alteración de la función secretora biliar inducida por E<sub>2</sub>17G promoviendo internalización endocítica de transportadores canaliculares.

**116. (489) LA UBIQUITIN-LIGASA UBR1 Y LA DEUBIQUITINASA USP9X SON REQUERIDAS PARA LA AUTOFAGIA SELECTIVA DE GRÁNULOS DE ZIMÓGENO MEDIADA POR VMP1 EN UN NUEVO MODELO CELULAR DE PANCREATITIS AGUDA.**

Grasso D.<sup>1</sup>; Molejón M.<sup>2</sup>; Causada Calo N.<sup>3</sup>; Boggio V.<sup>4</sup>; Ropolo A.<sup>5</sup>; Vaccaro M.<sup>6</sup>

Laboratorio de Fisiopatología Molecular, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
dgrasso@ffy.uba.ar

Zimofagia es la autofagia mediada por VMP1, capaz de degradar selectivamente los gránulos de zimógenos (GZ) alterados durante la pancreatitis aguda (PA) y de este modo prevenir los efectos severos de la enfermedad. Se ha descrito un rol del sistema de ubiquitinación en autofagia selectiva. La ausencia de la ubiquitin-ligasa UBR1 causa una PA de inicio gestacional. El objetivo fue evaluar el rol del sistema de ubiquitinación en la zimofagia. Usamos un modelo de PA por sobre-estimulación de los receptores a CCK en células acinares AR42J, diferenciadas con dexametasona. Comprobamos la zimofagia por inmunofluorescencia de VMP1, LC3 y amilasa. Demostramos que la zimofagia previene la activación de tripsina durante la PA, utilizando el sustrato BZipAR. Durante la PA UBR1 se trasloca a autofagosomas LC3 positivos colocalizando con VMP1. El uso de shRNA-UBR1 bloqueó la zimofagia durante la PA, demostrado por transfección con RFP-LC3 y VMP1-RFP. La evaluación con BZipAR en las células knockdown para UBR1 evidenció abolición del efecto protector de VMP1 sobre la activación de tripsina. Por RT-PCR la expresión de la deubiquitinasa USP9x aumenta ante la PA a la vez que la proteína, por Western blot, disminuye, sugiriendo una acelerada degradación de USP9x durante la PA. Por inmunofluorescencia, USP9x colocaliza con VMP1 en autofagosomas inducidos por PA. Ambas proteínas se acumulan ante el tratamiento adicional con el inhibidor de flujo autofágico Cloroquina. El uso de shRNA-USP9x inhibió la autofagia e impidió la movilización de VMP1 desde el RE promoviendo acumulación de agregados proteicos. Utilizando pulldown comprobamos la interacción entre VMP1 y USP9x durante la PA. Concluimos que el sistema de ubiquitinación es requerido durante la zimofagia y proponemos a UBR1 como responsable de señalar los GZ alterados para su degradación autofágica. Asimismo, USP9x es requerida para la iniciación de esta autofagia selectiva mediada por VMP1 durante la PA.

**117. (527) UN NUEVO EJE PI3K-AKT-GLI3 ACTIVA LA MAQUINARIA QUE CONTROLA LA AUTOFAGIA A TRAVÉS DE VMP1 EN CÉLULAS DE CÁNCER PANCREÁTICO.**

Lo Ré A.<sup>1</sup>; Pardo R.<sup>2</sup>; Almada L.<sup>3</sup>; Molejón M.<sup>4</sup>; Elsawa S.<sup>5</sup>; Fernandez-zapico M.<sup>6</sup>; Vaccaro M.<sup>7</sup>

Laboratorio de Fisiopatología Molecular, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 4 7</sup>; Schulze Center for Novel Therapeutics, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA<sup>3 5 6</sup>  
alore@ffy.uba.ar

La autofagia es un proceso de degradación de material citoplasmático conservado en la evolución, que sirve como mecanis-

mo de sobrevivencia en células sometidas a ayuno. Se ha sugerido que la autofagia actúa en la progresión y promoción de tumores, sin embargo, los mecanismos que regulan este fenómeno no han sido elucidados. Hemos encontrado que la proteína vacuolar VMP1, mediador clave en la autofagia, se sobreexpresa en células de cáncer pancreático en condiciones de ayuno. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión de vmp1 en la célula tumoral pancreática. Mediante ensayos de actividad de luciferasa determinamos que el factor GLI3, un efector de la ruta Hedgehog, regula la actividad promotora y la expresión del gen vmp1. Realizamos ensayos de coimmunoprecipitación de cromatina y observamos que GLI3 se une al promotor de vmp1. Además por ensayos de coimmunoprecipitación encontramos que la acetiltransferasa p300 forma un complejo con GLI3 y coopera con este factor de transcripción para activar la expresión del gen vmp1. Finalmente identificamos la vía PI3K-AKT como ruta de señalización que modula la actividad de este nuevo complejo transcripcional GLI3-p300. Esta ruta es activada en células de cáncer pancreático promoviendo la actividad transcripcional de vmp1 mediada por GLI3. En conclusión, estos resultados presentan al eje PI3K-AKT-GLI3 como un nuevo mecanismo de regulación de la autofagia mediada por VMP1 e integran este proceso celular a la red de eventos involucrados en la carcinogénesis pancreática.

#### 118. (682) ALTERACIONES EN EL HIPOCAMPO EN LA ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA EXPERIMENTAL

Perazzo J.<sup>1</sup>; Tallis S.<sup>2</sup>; Caltana L.<sup>3</sup>; Aronne M.<sup>4</sup>; Delfante A.<sup>5</sup>; Souto P.<sup>6</sup>; Reinés A.<sup>7</sup>; Brusco A.<sup>8</sup>

Laboratorio de Encefalopatía Hepática, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1,2,5,6</sup>; Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, UBA.<sup>3,4,8</sup>; Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, CONICET-UBA), Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Uba.<sup>7</sup>  
jperazzo@fyb.Uba.ar

La Hipertensión Portal (HP) experimental por estenosis reglada de la vena Porta es un modelo que induce Encefalopatía Hepática Mínima (EHM) cuyas características más importantes son la HP, moderada hiperamonemia y alteraciones mitocondriales del hipocampo establecidos en el día 14 post-estenosis. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los cambios al día 10 y alteraciones conductuales a los días 10 y 14 post-estenosis de la EHM experimental. Se usaron ratas Wistar machos de 250 g de pc, divididas en grupos (n=6): Sham (S), con operación simulada y EHM con estenosis portal reglada. Los grupos S y EHM día 10 se sacrificaron para estudiar en hipocampo los siguientes parámetros por inmunohistoquímica: proteína glial fibrilar ácida (GFAP), específica para astrocitos (A), proteína S100β localizada en citoplasma de A, Nestina (N) localizada en A, pericitos y células endoteliales (ECs), Proteína asociada a microtúbulos (MAP-2) y a neurofilamentos 200 KD, como marcadores dendríticos, *Lycopersicum esculentum* (tomato lectin) para la microglia y un marcador neurona específico (Neu N). El tripheniltetrazolium (TTC) se lo usó como colorante marcador de áreas de hipoxia y el Factor Inducible por Hipoxia 1α (HIF-1α) fue evaluado por western blot y por inmunohistoquímica. Los resultados a día 10 fueron que GFAP se incrementó significativamente, ECs, N y TTC estuvieron significativamente presentes en hipocampo mientras que no lo fueron en corteza prefrontal. El test de escape fue significativo al día 14 pero no al 10. Teniendo en cuenta resultados previos como la alteración en la cadena respiratoria con astrogliosis y angiogénesis, podemos concluir que entre los cambios más precoces y relevantes en el hipocampo en la EHM experimental se registraron marcadores positivos de hipoxia.

#### 119. (216) PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA DE MICROÓRGANOS HEPÁTICOS (MOHS) DE RATA EN LAS SOLUCIONES VIASANO Y BG35 (BES-GLUCONATO-PEG). ESTUDIO DEL METABOLISMO DE AMONIO DURANTE SU REOXIGENACIÓN EN UN SISTEMA NORMOTÉRMICO VS UN MODELO DE HÍGADO BIOARTIFICIAL (HBA).

Pizarro M.<sup>1</sup>; Mediavilla M.<sup>2</sup>; Scandizzi A.<sup>3</sup>; Rodríguez J.<sup>4</sup>; Miszczuk G.<sup>5</sup>; Bellarosa C.<sup>6</sup>; Tiribelli C.<sup>7</sup>; Mamprin M.<sup>8</sup>  
Centro Binacional de Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC)<sup>1,2,3,4,5,8</sup>; Centro Studi Fegato, University of Trieste, Italy<sup>6,7</sup>;  
Farmacología Facultad de Ciencias Bioq y Farm. UNR<sup>8</sup>  
<mdolorespizarro@hotmail.com>

Los MOHS constituyen un componente biológico atractivo para ser aplicado al HBA por presentar todos los tipos celulares hepáticos. Para ello, deben detoxificar el amonio acumulado en el plasma de pacientes con falla hepática. Para disponer de MOHS en cantidad, calidad y tiempo es importante desarrollar técnicas para su preservación hipotérmica. **Objetivo:** Analizar el metabolismo de amonio en MOHS preservados en ViaSpan® y BG35 (desarrollada en nuestro laboratorio) durante su reoxigenación en un sistema normotérmico (SRN, en un baño tipo Dubnoff) y en un modelo de HBA. Se cortaron láminas de hígado de rata (432±36µm; n=10). Se preservaron (48h-0°C) en ViaSpan® (V) y BG35 (B). Los controles (C) fueron cortes frescos. Se evaluaron: detoxificación de amonio, síntesis de urea y expresión de CPSI y OTC en MOHS reoxigenados (Krebs-Henseleit/37°C/2h/95%O<sub>2</sub>; 5%CO<sub>2</sub>/agitación) con una sobrecarga de 1mM NH<sub>4</sub>Cl en el SRN y en un HBA perfundido con sangre de carnero. **Resultados:**

	SRN Detox NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µmol/gtej)		Síntesis urea (µmol/gtej)	
	60	120	60	120
<b>C</b>	5,0±1,6	7,4±1,3	4,9±2,8	7,5±2,6
<b>V</b>	1,9±0,5*	4,3±1,4*	1,8±0,7*	4,4±0,4*
<b>B</b>	3,3±1,4	6,6±3,5	3.1±0,5	5,3±2,0

En el HBA, los MOHS no detoxificaron NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ni sintetizaron urea.

mARN	CPSI SRN		HBA		OTC SRN		HBA	
	60	120	60	120	60	120	60	120
<b>C</b>	0,96±0,11	0,86±0,11	0,84±0,01	0,63±0,02	0,87±0,15	0,82±0,07	0,87±0,21	0,67±0,20
<b>V</b>	0,61±0,13*	0,53±0,15*	0,76±0,05	0,58±0,17	0,60±0,10	0,54±0,07*	0,85±0,10	0,51±0,08
<b>B</b>	0,48±0,14*	0,45±0,14*	0,71±0,20	0,58±0,20	0,64±0,23	0,36±0,10*	0,68±0,03	0,50±0,06

\* dif del control, p<0,05, n=3

**Conclusiones:** En el SRN, si bien los niveles de mRNA de CPSI y OTC disminuyen para ambos grupos con respecto al control, sólo los MOHS preservados en BG35 mantuvieron el nivel de metabolismo de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y urea de los controles. Los MOHS en el HBA no detoxificaron NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ni sintetizaron urea, a pesar de que los niveles de mRNA de las enzimas estudiadas no difirieron de los presentados por los MOHS en el SRN. Esta diferencia podría deberse al diseño utilizado para el HBA.

## REPRODUCCIÓN 2

#### 120. (30) PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES DE ESTRÓGENO DE MEMBRANA EN LA EXPRESIÓN DE LEPTINA PLACENTARIA

Gambino Y.<sup>1</sup>; Calvo J.<sup>2</sup>; Sánchez-Margalet V.<sup>3</sup>; Varone C.<sup>4</sup>

Dpto. Química Biológica FCEN UBA<sup>1,4</sup>; Dpto. Química Biológica FCEN UBA; IBYME, Buenos Aires, Argentina.<sup>2</sup>; Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, España<sup>3</sup>  
yesupao@yahoo.com.ar

La leptina es una citoquina y una hormona placentaria que cumple un papel fundamental en la fisiología materno-fetal, sin embargo aún no se conoce completamente cómo se regula su expresión en placenta. Resultados previos de nuestro grupo de investigación mostraron que el estradiol (E<sub>2</sub>) regula a nivel transcripcional la expresión de leptina en células placentarias. Además, el E<sub>2</sub> activó las vías MAPK y PI3K que están involucradas en dicha expresión, lo cual sugiere que parte de la acción del E<sub>2</sub> estaría mediada por receptores de estrógeno (ESRs) de membrana. El objetivo de este trabajo fue evidenciar la presencia

de ESRs de membrana involucrados en la expresión de leptina placentaria, empleando un análogo impermeable del E<sub>2</sub> (E-BSA). Mediante qRT-PCR y Western blot, se observó que el tratamiento con E-BSA incrementó el nivel de ARNm y de proteína leptina respectivamente en células placentarias ( $p < 0,05$ ). El E-BSA 10 nM produjo la activación de las vías MEK/ERK y Akt en explantos placentarios, así como también la fosforilación de p38-MAPK y JNK en células BeWo. La inhibición farmacológica de estas vías bloqueó el efecto del E-BSA sobre el ARNm de leptina, sugiriendo que estas cascadas de señalización son necesarias para la acción del E-BSA sobre la expresión de leptina placentaria. Por otra parte, los efectos del E-BSA fueron bloqueados por el antiestrógeno ICI 162,780 100 nM, lo cual indicaría que el E-BSA requiere de ESRs para su acción. Western blots de fracciones proteicas obtenidas por centrifugación diferencial, mostraron la presencia de ESR $\alpha$  tanto en el núcleo como en la membrana plasmática de células BeWo ( $n=5$ ). Resultados similares fueron obtenidos por inmunofluorescencia, sugiriendo que el ESR $\alpha$  de membrana podría mediar los efectos no clásicos del E<sub>2</sub>. En conjunto, estos resultados proveen nuevas evidencias acerca de los mecanismos por los cuales el E<sub>2</sub> regula la expresión de la leptina en placenta y reafirman la importancia de la leptina en la fisiología placentaria.

**121. (174) LA REGULACIÓN DE LA LEPTINA POR AMPC INVOLUCRA UN ENTRECruzAMIENTO ENTRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE PKA Y DE MAPK**

Maymó J.<sup>1</sup>; Pérez Pérez A.<sup>2</sup>; Calvo J.<sup>3</sup>; Sánchez Margalet V.<sup>4</sup>; Varone C.<sup>5</sup>

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 5</sup>; Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Universidad de Sevilla, Sevilla, España<sup>2 4</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA; Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina<sup>3</sup>  
julietamaymo@gmail.com

La leptina (LEP), una proteína de 16 kDa producida principalmente por el tejido adiposo, ha sido relacionada inicialmente con el control del balance energético. Sin embargo, se han identificado efectos pleiotrópicos de la leptina en reproducción y embarazo, particularmente en la placenta humana, donde su expresión es altamente regulada. La activación de la vía del AMPc coordina procesos celulares y media la acción de diversas hormonas en la placenta. En el presente estudio, examinamos el efecto del AMPc en la regulación de la expresión de leptina en trofoblastos humanos así como los mecanismos involucrados. Utilizamos como modelo de trabajo las líneas celulares trofoblásticas BeWo y JEG-3 así como explantos de placenta a término. Por Western blot y qRT-PCR, determinamos que AMPc (1-100  $\mu$ M) estimuló la expresión de la leptina en células BeWo y JEG-3. EL AMPc incrementó la actividad del promotor de LEP (4,2 veces), evaluado por ensayos de gen reportero con plásmidos conteniendo el promotor de LEP y el gen luc. Obtuvimos resultados similares con explantos de placenta humana. Analizamos la vía de la PKA y hallamos que la fosforilación de CREB es aumentada significativamente con AMPc. Más aún, la cotransfección con la subunidad catalítica de PKA o con CREB estimuló la actividad del promotor de LEP (42,5 y 58 veces respectivamente). El H89 10  $\mu$ M (inhibidor de PKA) o el SQ22,536 100  $\mu$ M (inhibidor de AC) bloquearon el efecto del AMPc. Investigamos el rol de la vía de la MAPK en el efecto del AMPc en la inducción de leptina. Por WB y ensayos de gen reportero, observamos que el PD98059 50  $\mu$ M (inhibidor de MEK) bloqueó parcialmente la estimulación de leptina por AMPc. El tratamiento con AMPc indujo la fosforilación de ERK 1/2 (2,3 veces) y el PD98059 inhibió la fosforilación de CREB inducida por AMPc. En resumen, demostramos que el AMPc induce la expresión de leptina en placenta y este efecto sería mediado por un entrecruzamiento entre las vías de señalización de PKA y de MAPK.

**122. (167) LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LAS MOLÉCULAS COESTIMULADORAS CD80 Y CD86 MODULAN LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA DURANTE LA REGRESIÓN DEL CUERPO LÚTEO.**

Sander V.<sup>1</sup>; Motta A.<sup>2</sup>

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos; Universidad de Buenos Aires; CONICET<sup>1 2</sup>  
valeriasander@yahoo.com.ar

La regresión (R) del cuerpo lúteo (CL) involucra dos etapas: la R Funcional (RF) y la R Estructural (RE). En este proceso, células en el CL actúan como presentadoras de antígeno, aunque se desconoce su mecanismo. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II), las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y la apoptosis en las células del CL. Se indujo la formación de CLs en ratas prepúberes Wistar por inyección i.p. de 10 UI de eCG y 10 UI de hCG (día 0), caracterizándose por los niveles de progesterona (P) las siguientes etapas en las cuales los animales fueron sacrificados: CL Funcional (CL F: día 5, alta P), CL RF (día 9, baja P) y CL RE (día 14, P basal), ( $n=5$ /grupo y ensayo). En la RF aumentó significativamente el porcentaje de células lúteas CD86+ (RF:  $0,9 \pm 0,1$  vs. F:  $0,29 \pm 0,03$ , %), no se modificaron el de CD80+ (RF:  $4,6 \pm 0,6$  vs. F:  $6,4 \pm 1$ , %) ni MHC II+ (RF:  $4,4 \pm 0,4$  vs. F:  $4 \pm 0,2$ , %), todos cuantificados por citometría de flujo. La expresión génica de CD80 no fue detectable, no varió el ARNm de CD86 (RF:  $0,58 \pm 0,12$  vs. F:  $0,62 \pm 0,12$ , unidades ópticas arbitrarias: uoa) ni de MHC II (RF:  $0,62 \pm 0,09$  vs. F:  $0,70 \pm 0,04$ , uoa), ambos evaluados por RT-PCR, ni el % de células lúteas apoptóticas (RF:  $19 \pm 3$  vs. F:  $14 \pm 4$ , cuantificado por Anexina V-Ioduro de propidio). En la RE aumentó significativamente la expresión génica (RE:  $0,425 \pm 0,004$  vs. F:  $0,160 \pm 0,002$ , uoa) y proteica (RE:  $9,1 \pm 0,6$  vs. F:  $6,4 \pm 1$ , %) de CD80, y la apoptosis (RE:  $24 \pm 3$  vs. F:  $14 \pm 4$ , %), mientras que el ARNm de CD86 no fue detectable. Ni la expresión génica (RE:  $0,66 \pm 0,09$  vs. F:  $0,70 \pm 0,04$  uoa) ni la proteica (RE:  $3,5 \pm 0,2$  vs. F:  $4 \pm 0,2$ , %) de MHCII se modificaron. Concluimos que en la presentación antigénica en la R del CL, las moléculas de MHC II se expresan constitutivamente, mientras que las coestimuladoras muestran una dinámica diferencial, observándose principalmente CD86 en la RF, y CD80 en la RE, esta última asociada a un aumento de la apoptosis celular.

**123. (375) LA ACTIVACIÓN DE ERK1-2 PROMUEVE LA DIFERENCIACIÓN DEL ESTROMA ENDOMETRIAL DURANTE LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**

Vallejo G.<sup>1</sup>; Mestre-Citrinovit A.<sup>2</sup>; GrÜmmer R.<sup>3</sup>; Winterhager E.<sup>4</sup>; SaragÜeta P.<sup>5</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET<sup>1 2 5</sup>; Departamento de Biología Molecular, Universidad Duisburg-Essen<sup>3 4</sup>  
gvallejo@dna.uba.ar

Previamente demostramos que la proliferación progestina-dependiente en células endometriales de rata requiere del receptor de progesterona (RP) y estradiol (RE) beta y de la activación de ERK1-2 y Akt *in vitro*; y que el tratamiento con el antagonista del RP, onapristona (Ona), y/o del RE, faslodex (Fas), reduce la extensión de la decidua *in vivo*. En este trabajo estudiamos la participación del RP y del RE en la activación de ERK1-2, y la implicancia fisiológica de dicha activación, durante la decidualización *in vivo*. La cinética de la activación de ERK1-2 en los sitios de implantación (SI) y en las zonas entre los SI (ESI) muestra que la expresión de ERK1-2 activada aumenta hacia el día 8 pc ( $4 \pm 0,7$  veces de aumento vs 4dpc;  $1,6 \pm 0,04$  veces de aumento vs 6dpc), y se restringe al sitio de implantación (ESI 6dpc:  $0,5 \pm 0,07$  veces de aumento vs SI 6dpc; ESI 8dpc:  $0,5 \pm 0,04$  vs. SI 8 dpc) (western blot). La isoforma de ERK1-2 activada dentro del SI de ratas 8 dpc; y de ratas tratadas con el antagonista del RP onapristona y/o el antagonista del RE faslodex durante los días 6 y 7 pc se localiza exclusivamente en las células estromales indiferenciadas de la zona de unión entre las deciduas mesometrial y antimesometrial (inmunohistoquímica). Este patrón no se modificó en presencia de Ona y/o Fas. Para entender la función de la activación de ERK1-2 en la decidualización, tratamos ratas preñadas con el inhibidor de ERK durante los días 6 y 7 pc y luego observamos la morfología de los SI a los 8dpc y los niveles de RP, RE y ERK1-2 activada. El bloqueo de la activación de ERK1-2 re-

dujo el área de la decidua antesometrial y mesometrial, produciendo la compactación del tejido decidual antesometrial y disminuyó los niveles del RE  $\alpha$ . Estos resultados demuestran por primera vez una función de la activación de ERK1-2 en la diferenciación endometrial promoviendo la extensión de la decidua y sugieren la participación del RE  $\alpha$  en esta vía de señalización.

**124. (573) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE VEGF SOBRE EL DESARROLLO FOLICULAR Y EL SISTEMA ANGIOPOYETINAS/TIE2 EN UN MODELO DE SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO (PCOS) DESARROLLADO EN RATA.**

Abramovich D.<sup>1</sup>; Parborell F.<sup>2</sup>; Tesone M.<sup>3</sup>  
*Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales FCEYN-UBA*<sup>1,3</sup>; *Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET*<sup>2</sup>  
*abramovich@dna.uba.ar*

El VEGFA es el principal factor angiogénico responsable de la proliferación, migración y supervivencia de células endoteliales. La Angiopoyetina 1 (ANGPT1), al unirse al receptor Tie2, recluta células de músculo liso (SMC) estabilizando los vasos sanguíneos. La ANGPT2 actúa como antagonista de Tie2 desestabilizando la vasculatura. El PCOS causa infertilidad y se caracteriza por presentar alteraciones endocrinas, metabólicas y reproductivas. Las pacientes tienen altos niveles de VEGFA en suero debido a su elevada producción ovárica. Objetivo: estudiar el rol de las ANGPTs en la fisiopatología del PCOS y el efecto de la inhibición de VEGFA en el ovario sobre el desarrollo folicular y la expresión de las ANGPTs. Métodos: Ratas prepúberes fueron inyectadas por 15 días con DHEA para inducir PCOS. El grupo control recibió vehículo. Un grupo de ratas PCOS fue inyectado intrabursa, 48h antes del sacrificio con un inhibidor de VEGF, Trap. Se extrajeron los ovarios, uno de los cuales fue procesado para histología, se tiñeron cortes con H/E y se midió la estabilidad vascular por inmunohistoquímica de SMC. Del otro ovario se extrajeron proteínas para Western blot de ANGPTs y Tie2. En el ovario PCOS se observó un aumento de ANGPT1 y Tie2 y una disminución de ANGPT2, ninguno de estos cambios fue revertido con Trap. Se observó un aumento en el % de folículos primarios en las ratas PCOS, revertido por Trap. También disminuyó el % de cuerpos lúteos, en los ovarios PCOS. Trap disminuyó el % de folículos preantrales y el % de quistes, sin cambios en folículos atresicos. No se observaron cambios en la marca para SMC entre los grupos control y PCOS. Sin embargo, Trap disminuyó la expresión de SMC. Conclusión: Cambios en los niveles de ANGPTs y su receptor estarían involucrados, además del VEGFA en la fisiopatología del PCOS. El tratamiento con un inhibidor de VEGF mejora el desarrollo folicular y disminuye la formación de quistes ováricos en un modelo de PCOS desarrollado en rata.

## ONCOLOGIA 2

**125. (43) LA HEMO OXIGENASA 1 (HO-1) MODULA LA ADHESIÓN CELULAR TRAVÉS DE NFKB EN CÁNCER DE PRÓSTATA**

Salles A.<sup>1</sup>; Gueron G.<sup>2</sup>; Elguero B.<sup>3</sup>; Ferrando M.<sup>4</sup>; Coluccio F.<sup>5</sup>; Navone N.<sup>6</sup>; De Siervi A.<sup>7</sup>; Vazquez E.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Apoptosis y Cancer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*<sup>1,2,3,4,7,8</sup>; *Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*<sup>6</sup>; *MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA*<sup>6</sup>  
*asalles@qb.fcen.uba.ar*

La terapia inicial para el cáncer de próstata (PCa) es generalmente la ablación de andrógenos, sin embargo, después de un tiempo, la enfermedad regresa presentándose la etapa de "resistencia a la castración" que resulta en un mayor crecimiento y diseminación tumoral. Evidencias recientes muestran que la sobre-expresión del factor nuclear KB (NFkB) está asociado a un peor pronóstico, pero su contribución exacta a la progresión del PCa aún permanece desconocida. La inflamación aparece como

un factor de riesgo para esta enfermedad neoplásica. Previamente demostramos que la proteína anti-inflamatoria HO-1 inhibe la proliferación, migración e invasión de células de PCa. Además, recientemente se demostró que HO-1 media la expresión de moléculas de adhesión vía NFkB. El objetivo de este trabajo fue investigar el efecto de la sobre-expresión de HO-1 sobre NFkB y sus consecuencias sobre la adhesión en células de PCa sensibles (LNCaP) e insensibles (PC3) a andrógenos. El tratamiento de los cultivos celulares con hemina (70  $\mu$ M, 24h), un fuerte inductor de la expresión de HO-1, provocó una disminución significativa de la actividad del promotor con elementos de respuesta a NFkB (NFkB-Luc) tanto en LNCaP como en PC3 (36.1% y 36.7%,  $p < 0.05$ , respectivamente). Por técnicas de inmunofluorescencia comprobamos la acumulación de NFkB en citoplasma. Además, la inducción de HO-1 aumentó la adhesión celular sobre colágeno en PC3 (90%,  $p < 0.05$ ). Mas aún, mediante un gene-array de genes involucrados en inflamación y angiogénesis, identificamos a COL4A3 (colágeno, tipo IV, alfa 3) como molécula de adhesión blanco, cuya expresión fue modulada por inducción farmacológica de HO-1 en las líneas de PCa. Estos resultados implican por primera vez a NFkB como mediador de los efectos celulares observados por sobre-expresión de HO-1, impidiendo así la diseminación de estas líneas metastáticas, y emergiendo como blanco potencial para la terapia contra la resistencia a la castración en PCa.

**126. (222) MUERTE CELULAR POR TERAPIA FOTODINÁMICA BASADA EN ALA EN CULTIVOS BI Y TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN.**

Teijo J.<sup>1</sup>; Diez B.<sup>2</sup>; Batlle A.<sup>3</sup>; Fukuda H.<sup>4</sup>  
*Centro de Investigación sobre Porfirinas y Porfirinas, Dto Química Biológica FCEN UBA*<sup>1,2,4</sup>; *Centro de Investigación sobre Porfirinas y Porfirinas*<sup>3</sup>  
*julieta\_teijo@yahoo.com.ar*

El ácido 5-aminolevulínico (ALA) induce la acumulación de porfirinas fotoactivas que al iluminarse producen especies reactivas de oxígeno llevando a la muerte celular, base de la Terapia Fotodinámica del cáncer (TFD). Los esferoides multicelulares representan un modelo *in vitro* 3D útil para el estudio de terapias antitumorales independientemente de la vasculatura. Se reporta la puesta a punto de las condiciones para el cultivo de esferoides en la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón humano y la respuesta de síntesis de porfirinas y viabilidad post-TFD en las conformaciones 2D y 3D del cultivo. Las células sembradas a una densidad de  $5 \times 10^4$  céls/ml de MEM+5% SFB, sobre agar 3%-RPMI (1:1) forman esferoides al cabo de 7 días, (promedio:  $1866 \pm 195$  céls). Se incubó con distintas concentraciones de ALA durante diferentes tiempos: en la monocapa se llegó a un plateau en la síntesis de porfirinas con ALA 0,5mM y en esferoides con ALA 1mM. A plazos cortos (3h) se observó un aumento de la síntesis de porfirinas en función del tiempo de incubación similar para ambos tipos de cultivo, pero a tiempos largos (16h) la cinética de síntesis en la monocapa ( $0,41 \pm 0,01$  pg porf./cél) es más rápida que en los esferoides ( $0,28 \pm 0,10$  pg porf./cél). Las células incubadas 3h con ALA 1mM se irradiaron con un banco de 2 tubos fluorescentes por distintos tiempos. Luego de 1h se analizó la viabilidad celular (MTT) y la muerte celular (naranja de acridina-bromuro de etidio). En esferoides la dosis lumínica que produce un 50% de muerte celular ( $DL_{50}$ ) mostró un ligero corrimiento (2 min) y una mayor supervivencia ( $31,9 \pm 8,7\%$ ) respecto de la monocapa ( $9,3 \pm 0,8\%$ ) para una irradiación de 20 min. Los resultados permiten inferir que si bien la síntesis de porfirinas en los esferoides es del mismo orden que en la monocapa, la accesibilidad de la luz a las células del interior del esferoide es un factor limitante para la efectividad de la terapia en este modelo de conformación 3D propia de los tumores.

**127. (406) INDUCCIÓN DE ESTRÉS NITROSATIVO POR ARSENIATO EN CÉLULAS HUMANAS DE CÁNCER MAMARIO**

Soria E.<sup>1</sup>; Díaz Luján C.<sup>2</sup>; Eynard A.<sup>3</sup>; Bongiovanni G.<sup>4</sup>  
*UNC; CONICET*<sup>1</sup>; *UNC*<sup>2</sup>; *UNC; CONICET*<sup>3</sup>; *CONICET*<sup>4</sup>  
*elioandres@yahoo.es*

Se ha propuesto que compuestos trivalentes derivados del arsénico podrían ser utilizados en el tratamiento de neoplasias hematológicas y sólidas, como el cáncer de mama. Dado que un metabolito común de éstos es el arsenito, el objetivo de este trabajo fue determinar el posible mecanismo de acción del mismo. Se trataron las líneas humanas MCF-7 y ZR-75-1 (adenocarcinoma mamario) con arsenito de sodio (200 µM, As) por 2 h y luego 2 h adicionales sin tratamiento para evaluar su recuperación, comparándose los resultados con controles sin tratar (C;  $p < 0,05$ ). Además, se calculó la correlación entre parámetros de estrés y muerte celular por el coeficiente de Spearman (CS). As indujo la síntesis de L-citrulina en ambas líneas:  $177,8 \pm 24,6$  (ZR-75-1) y  $329,2 \pm 29,0$  (MCF-7) comparados con C (100%), mientras que sólo en MCF-7 se observaron aún valores significativamente altos de nitritos (productos finales de la vía nitrosativa) tras la recuperación ( $129,3 \pm 6,5\%$ ). El incremento de L-citrulina (indicador de formación de óxido nítrico) y la inhibición de  $\alpha$ -glutamilttransferasa (indicador de la vía del glutatión) se asociaron con muerte celular en MCF-7 (CS=0,94 y CS=-0,83, respectivamente) y en ZR-75-1 (CS=0,60 y CS=-0,66, respectivamente). Este estrés de tipo nitrosativo afectó negativamente la capacidad reductora del citoplasma (CRC) tras la recuperación (MCF-7 CS=-0,60 y ZR-75-1 CS=-0,54), con MCF-7 mostrando un 60,64% de CRC respecto de ZR-75-1 bajo dicho tratamiento. De acuerdo a lo presentado, arsenito sódico tendría actividad citotóxica por inducción de estrés nitrosativo con compromiso de la defensa antioxidante en las líneas tumorales ZR-75-1 y MCF-7, siendo estas últimas más sensibles a dicho efecto deletéreo.

**128. (55) GALECTINA-8 ENDÓGENA COMO MODULADOR DE LA ANGIOGÉNESIS.**

Cárdenas Delgado V.<sup>1</sup>; Nugnes L.<sup>2</sup>; Compagno D.<sup>3</sup>; Rabinovich G.<sup>4</sup>; Wolfenstein-todel C.<sup>5</sup>; Elola M.<sup>6</sup>  
 Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas<sup>1</sup>; Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas-CONICET.<sup>2 5 6</sup>; Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.<sup>3</sup>; Laboratorio de Inmunopatología. Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET.<sup>4</sup>  
 vmanuel\_cd@yahoo.com.ar

Las galectinas son una familia de lectinas animales que comparten la especificidad de unión por  $\beta$ -galactósidos. Varios miembros de esta familia controlan procesos vinculados a la progresión del cáncer tales como la transformación celular y la metástasis. Habiendo previamente establecido el rol de galectina-8 (Gal-8) como agente promotor del desarrollo de vasos sanguíneos, nuestro interés se centró en: 1-Determinar el perfil de expresión de galectinas con demostrada actividad pro-angiogénica (Gal-1, -3 y -8) en la línea de células endoteliales BAEC. 2-Efectuar el silenciamiento de Gal-8 en células BAEC mediante la técnica de RNA de interferencia (siRNA). 3-Estudiar el fenotipo resultante del silenciamiento de Gal-8 endógena en células BAEC en cuanto a la angiogénesis *in vitro*. Los resultados del Western Blot demostraron la presencia de Gal-1 (14,5 kDa), Gal-3 (29 kDa) y 3 isoformas de Gal-8 (34, 36 y 38 kDa) en los extractos celulares. Los estudios de citometría de flujo confirmaron la presencia de Gal-3 y Gal-8 tanto en el compartimiento citoplasmático de las células BAEC como en su membrana. En contraste, Gal-1 se detectó solamente en el citoplasma. La inmunofluorescencia de las células BAEC permeabilizadas demostró la expresión de Gal-8 en el núcleo y en el citoplasma. Asimismo, Gal-1 y Gal-3 exhibieron un patrón de tinción similar al de Gal-8. Con respecto al estudio de funcionalidad *in vitro*, las células BAEC transfectadas con un siRNA específico para Gal-8 bovina y cultivadas sobre matriz de gel experimentaron una reducción significativa en la longitud de los túbulos capilares (Control= $100 \pm 15\%$  vs. Gal-8-siRNA<sub>48h</sub>= $33 \pm 7\%$ ,  $p < 0,01$ ) a las 48 hs post-transfección. Este hallazgo destaca la contribución de Gal-8 endógena al proceso de formación de túbulos capilares *in vitro*. En resumen, nuestros resultados revelan que las células endoteliales BAEC expresan un conjunto de galectinas pro-angiogénicas donde Gal-8 parece desempeñar un rol importante, previamente ignorado.

**129. (555) ROL DE P300 EN LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA MAMARIO**

Fermento M.<sup>1</sup>; Buschiazzi M.<sup>2</sup>; Andrés N.<sup>3</sup>; Gandini N.<sup>4</sup>; Curino A.<sup>5</sup>; Facchinetti M.<sup>6</sup>  
 Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca CONICET CCT Bahía Blanca<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 efermento@criba.edu.ar

Previamente hemos demostrado una fuerte expresión e inusual localización citoplasmática de el co-factor transcripcional p300 en tumores mamarios humanos. Por lo tanto, los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la correlación entre la expresión citoplasmática de p300 y parámetros clínico-patológicos del paciente y evaluar su acción en la progresión tumoral. Para ello, se estudió la expresión de p300 mediante inmunohistoquímica en 70 carcinomas mamarios humanos. El p300 fue detectado exclusivamente en núcleo en las regiones histológicamente normales adyacentes al tumor mientras que en la zona tumoral se observó expresión citoplasmática en el 70% de los tumores ( $p < 0,0001$ ). El estudio de supervivencia mostró una mayor sobrevida de pacientes cuyos tumores presentaban localización citoplasmática (LogRank test,  $p < 0,0001$ ). La expresión citoplasmática de p300 se asoció significativamente con el T (TNM), observándose una disminución del T con el aumento de la expresión citoplasmática ( $p < 0,05$ ). Inhibidores selectivos de p300 indujeron una disminución en la cantidad de células tanto en la línea LM3 como en cultivos primarios de tumores de un modelo animal ( $p < 0,05$ ). Se observó por western-blot que la inhibición de p300 aumentaba los niveles de p21, manteniendo inalterados los niveles de ciclina D y E. En conclusión, los resultados obtenidos en biopsias humanas muestran que la localización de p300 en los tumores es mayormente citoplasmática y que esta inusual localización se asocia a una mejor sobrevida de los pacientes. Por otro lado, los tratamientos *in vitro* demuestran que inhibidores del p300 inducen una disminución en la proliferación/supervivencia celular en parte a través de un aumento de los niveles de p21. En conjunto, los resultados sugieren que el p300 podría estar favoreciendo la proliferación celular en carcinomas mamarios y que su inhibición ya sea farmacológica o por localización subcelular alterada podría estar ejerciendo efectos antitumorales.

**130. (604) RELEVANCIA DEL CROMOSOMA 4 EN CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS HORMONO INDEPENDIENTES INDUCIDOS POR PROGESTÁGENOS**

Pampena M.<sup>1</sup>; Lanari C.<sup>2</sup>; Fabris V.<sup>3</sup>  
 IBYME<sup>1 2 3</sup>  
 betinapampena@gmail.com

El carcinoma mamario murino hormono dependiente (HD; C4-HD) inducido por acetato de medroxiprogesterona (MPA) presenta metafases con un número cromosómico diploide (ratón normal  $2n=40$ ) y 4 translocaciones: una de ellas involucrando al cromosoma 4. Las variantes hormono independientes (HI), C4-HI y CC4-3-HI, surgieron a partir del tumor C4-HD, sin tratar con MPA, en eventos independientes. Pasajes tempranos (hasta 10 pasajes *in vivo*) del tumor CC4-3-HI, mostraron el mismo cariotipo que el tumor HD. Por otro lado, pasajes más avanzados del tumor C4-HI (mayores al 50) mostraron un cariotipo diferente al observado en el tumor HD, aunque todas las variantes estudiadas presentaran ganancia de la región próxima al centrómero del cromosoma 4. El objetivo del trabajo fue estudiar la evolución del cariotipo del tumor CC4-3-HI a través de sucesivos pasajes, e investigar la presencia de alteraciones del cromosoma 4 en otras variantes HI surgidas a partir del mismo tumor HD. Se analizaron metafases y núcleos en interfase obtenidos de cultivos primarios de diferentes tumores HI, por técnicas de bandedo G y de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH). Los resultados obtenidos muestran que la variante CC4-3-HI mantiene su número cromosómico en el rango diploide, y las mismas translocaciones después de 70 pasajes *in vivo*. Los resultados de FISH de otras variantes HI (C4-3-HI y C4-4-HI) revelaron una mayoría de células con 4 o más copias de la región cercana al centrómero del cromosoma 4, y con un número cromosómico en el rango triploide. Podemos concluir que

el cariotipo del tumor HD se mantendría a través de los sucesivos pasajes de la hormona independencia. Algunas variantes HI pueden perder las translocaciones del tumor originario con los pasajes, aunque todas las variantes conservan alteraciones en el cromosoma 4. Esto sugiere que dicho cromosoma tendría un papel importante en la progresión de los carcinomas mamarios murinos inducidos por MPA.

**131. (461) EL FACTOR DE CRECIMIENTO INSULINO-SÍMIL TIPO 1 (IGF-1) MODULA EL DESARROLLO DEL FEOCROMOCITOMA (FEO)**

Fernandez M.<sup>1</sup>; Venara M.<sup>2</sup>; Nowicki S.<sup>3</sup>; Alvarez Sedó C.<sup>4</sup>; Barontini M.<sup>5</sup>; Chemes H.<sup>6</sup>; Pennisi P.<sup>7</sup>

Centro de Investigaciones Endocrinológicas Cedio<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

mfernandez@cedie.org.ar

El IGF-1 está involucrado en la tumorigénesis de la glándula adrenal. Previamente demostramos que IGF-1 estimula la proliferación de la línea celular murina de Feo MPC a través de su receptor de tipo 1, y desarrollamos un modelo experimental de Feo inyectando las células MPC en ratones inmunocompetentes. **Objetivo:** Estudiar el rol del IGF-1 en el desarrollo del feocromocitoma *in vitro* e *in vivo*. **Diseño:** Se evaluaron la apoptosis y la formación de colonias en agar blando de las células MPC con y sin estímulo de IGF-1. Se inyectaron sc 1x 10<sup>6</sup> MPC en ratones machos de 8 semanas de edad del grupo control (n=5) y con deficiencia hepática de IGF-1 que tienen el 25% de los niveles circulantes de IGF-1 de un ratón control (fenotipo LID, n=9). Se registraron tiempo de inicio, incidencia y crecimiento tumorales hasta la semana 9 post inóculo. **Resultados:** *In vitro:* El estímulo de IGF-1 fue capaz de inhibir la apoptosis reduciendo significativamente el porcentaje de células positivas para TUNEL/Caspasa-3 (21.3% vs 6.8% / 35.8% vs 10.8% p<0.05, Chi<sup>2</sup>). Además, tanto el número como el tamaño de las colonias en agar blando fue significativamente mayor en presencia de IGF-1 que en condiciones basales (26 vs 11 colonias/cuadrante p<0.001; 287.6 vs 216.8 μm de diámetro, p<0.02, Test T). *In vivo:* El tiempo de aparición de los tumores estuvo retrasado en el grupo LID respecto del control [4.8 (IC95%4.2-5.4) vs 7.0 (IC95%5.7-8.3) semanas, p<0.02 Mann Whitney]. Sólo 4 ratones del grupo LID desarrollaron tumor siendo la incidencia tumoral y las curvas de supervivencia libre de tumor significativamente diferentes respecto del grupo control; (44% vs. 100%, p<0.0001 Chi<sup>2</sup>; p<0.0001 Test de Logrank respectivamente). **Conclusión:** Estos resultados demuestran que IGF-1 estimula *in vitro* la capacidad de supervivencia sin anclaje e inhibe la apoptosis de las células MPC y sugieren fuertemente un efecto *in vivo* del IGF-1 sobre la incidencia y el período de latencia del feocromocitoma experimental.

## NEUROCIENCIAS 2

**132. (120) LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES (MR) ESTÁ AUMENTADA EN EL CEREBRO DE LA RATA ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSA (SHR)**

Pietranera L.<sup>1</sup>; Roig P.<sup>2</sup>; Lima A.<sup>3</sup>; Brocca M.<sup>4</sup>; De Nicola A.<sup>5</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental; Depto. de Bioquímica Humana, Fac. de Medicina. UBA<sup>1 5</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>2 3 4</sup>  
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, menor número de células en el hilio y aumento en la expresión de aromatasa, enzima responsable de la síntesis endógena de estradiol. Asimismo, los animales hipertensos presentan hiperfunción hipotalámica por aumento en la expresión del neuropéptido arginina-vasopresina (AVP) en el núcleo paraventricular (PVN), e hiperrespuesta al tratamiento mineralocorticoide. Los mineralocorticoides poseen numerosos

efectos en el cerebro. Estos incluyen el control de las funciones cardiovasculares, la inducción de apetito salino, interacción con neuropéptidos como AVP y angiotensina II, y el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial. En este sentido, los mineralocorticoides jugarían un rol patogénico en SHR. En este trabajo estudiamos la expresión del receptor para mineralocorticoides (MR) en el hipocampo e hipotálamo de ratas SHR de 16 semanas de vida y de sus controles WKY. Se cuantificó la expresión del ARNm de MR por PCR en tiempo real y por hibridación *in situ* utilizando ribosondas. Las ratas hipertensas mostraron un aumento en la expresión del ARNm de MR en el hipocampo tanto por PCR (WKY: 1,05±0,14; SHR: 1,55±0,13 unidades arbitrarias (u.a.); p<0.05) como por hibridación *in situ* (WKY: 87,95±17,04; SHR: 163,07±22,38 Densidad óptica % (DO%); p<0.05). En el hipotálamo, determinamos la expresión del MR por inmunohistoquímica. El área inmunoreactiva y la intensidad de reacción se encontraron aumentadas en las ratas SHR con respecto a sus controles WKY (WKY: 5919,18±1618,72; SHR: 11500,94±1417,81 μm<sup>2</sup>; p<0.05; WKY: 0,068±0,007; SHR: 0,092±0,002 iligv/área; p<0.01). En conclusión, las ratas SHR presentan hiperexpresión del MR en hipocampo e hipotálamo. Este aumento podría explicar la hiperrespuesta a los mineralocorticoides y estar involucrado en la encefalopatía hipertensiva.

**133. (565) ACTIVIDAD ESTEROIDOGÉNICA NEURONAL DIFERENCIAL INDUCIDA POR PROGESTERONA EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN POR 6-OH-DOPAMINA EN RATAS MACHO.**

Casas S.<sup>1</sup>; Escudero C.<sup>2</sup>; Giuliani F.<sup>3</sup>; Yunes R.<sup>4</sup>; Cabrera R.<sup>5</sup>

Instituto de Investigaciones Biomédicas; Universidad de Mendoza; IMBECU; CONICET<sup>1</sup>; INBIOMED-FCS-UM; IMBECU-CONICET<sup>2 3 5</sup>; INBIOMED-FCS-UM; FCM-UNCuyo; IMBECU-CONICET<sup>4</sup>  
casas\_sebastian@hotmail.com

Los efectos neuroprotectores de progesterona (P) han sido demostrado en diferentes modelos lesionales, tales como de trauma medular y esclerosis lateral amiotrófica. En trabajos previos reportamos comportamental y neuroquímicamente que P ejerce un efecto retardador en la aparición de los signos motores y no motores de neurodegeneración inducida. Los objetivos fueron: 1) Estudiar el efecto de P sobre la actividad enzimática neuroesteroidal de 3 alfa-hidroxiesteroide oxidoreductasa (3 a-HOR) en animales tratados y no tratados con P; 2) Evaluar si allopregnanolona (allo) administrada *in vitro* modifica el patrón de liberación de dopamina (DA) en cortes de cuerpo estriado (CE). Para inducir la enfermedad de parkinson se utilizó el modelo de la 6-OHDA con el que se lesionó la vía nigroestriatal izquierda. Los grupos experimentales fueron: 1) SHAM (G SHAM) 2) Lesionados sin tratamiento (G2) 3) Lesionados y tratados 7 días pos-lesión con P 4 mg/kg/día sc durante 3 días (G3). A las 8 semanas post-lesión, los animales fueron sacrificados y se evaluó la actividad dopaminérgica, por perfusión dinámica en CE, y enzimática de los CE y SN derecha (d) e izquierda (i) en forma individual. Los resultados se expresaron como la media ± SD, comparando CEi vs CED, y se analizaron por "t" Test. Se observaron cambios significativos en la actividad de 3 a-HOR en (G2: 189,8±67,323,9±72,1) y en (G3: 386,7±48,7; 247,5±33,26) (p<0.05), no observándose modificaciones en SHAM. Por otra parte, la administración *in vitro* de allo en cortes de CE modificó diferencialmente la liberación de <sup>3</sup>H-DA de CE entre los diferentes grupos (p<0.05). Concluimos: P presenta un efecto modulador positivo sobre la actividad neuroesteroidogénica estriatal la que persiste hasta la 8ª semana pos lesión, sin observarse cambios en SN. Finalmente el tratamiento con P activaría mecanismos genómicos tendientes a promover neuroprotección a largo plazo, la cual sería mediada no genómicamente por allo.

**134. (653) ANALISIS DEL EFECTO PROTECTOR DE ANGIOTENSINA II SOBRE LA VASCULATURA CEREBRAL DE RATAS NEONATAS EN EL PRECONDICIONAMIENTO HIPOXICO.**

Lopez Aguilera F.<sup>1</sup>; Plateo M.<sup>2</sup>; Seltzer A.<sup>3</sup>

*Sección sobre Desarrollo Perinatal IHEM-CONICET FCM*  
2 3

franciscolopezaguilera@yahoo.com.ar

El Precondicionamiento por hipoxia es un mecanismo neuro-protector endógeno que induce tolerancia a lesiones de mayor gravedad. Nuestro objetivo fue estudiar la participación de los receptores AT1 y AT2 de Angiotensina II en este fenómeno. Crías de ratas WKY fueron distribuidas en tres grupos: Lesionados (L) por hipoxia/isquemia (HI) en el día 8 postnatal, precondicionados (PCon) con 3 sesiones de autohipoxia el día anterior a la injuria y Controles (C), evaluados a las 24 h y 7 días posteriores a la ligadura de la arteria carótida y asfixia breve. Cortes de tejidos y microvasos aislados se analizaron por IF y WB con anticuerpos marcadores de las células endoteliales (Vimentina-Vim), y de los receptores de Angiotensina II (AT1-R y AT2-R). **Resultados:** En los animales L se observó una disminución del número de vasos en ambos hemisferios cerebrales. En los PCon observamos microvasos con características inmaduras y sobre-expresión de los AT<sub>2</sub>-R. En las arteriolas de los animales PCon observamos dilatación de la luz del vaso, aumento de la expresión de los AT<sub>2</sub>-R en la túnica media, y aumento de los AT<sub>1</sub>-R en la túnica externa de la arteria cerebral posterior. En vasos aislados 24 hs después de la lesión disminuyó la expresión de Vim en los animales L, en cambio en los PCon observamos que esta expresión no se modificó. **Conclusiones:** Angiotensina II participaría en el efecto protector del precondicionamiento hipóxico. En el cerebro en desarrollo en la etapa neonatal, este péptido vasoactivo, mediante el balance de la expresión de sus receptores AT1 y AT2 se asocia a la aparición de cambios morfológicos en la vasculatura cerebral necesarios para mejorar la irrigación cerebral y prevenir el daño tisular ocasionado por HI. Trabajo realizado con subsidio ANPCyT, PICT 2006-451.

**135. (693) ALLOPREGNANOLONA EN LA PUBERTAD DE LA RATA HEMBRA: EFECTO SOBRE LA LIBERACIÓN DE GABA HIPOTALÁMICO Y BIOSÍNTESIS DIFERENCIAL.**

Giuliani F.<sup>1</sup>; Escudero C.<sup>2</sup>; García S.<sup>3</sup>; Casas S.<sup>4</sup>; Bazzocchini V.<sup>5</sup>; Yunes R.<sup>6</sup>; Cabrera R.<sup>7</sup>

IMBIO-MED-FCS-UM IMBECU-CONICET<sup>1 2 4 5 7</sup>; IMBIO-MED-FCS-UM IMBECU-CONICET; FCM-UNCuyo<sup>3 6</sup>  
fgiuliani@fcm.uncu.edu.ar

La pubertad en ratas comienza con un aumento en la liberación pulsátil de LHRH, y se hace evidente con la apertura vaginal (AV) hacia los 39d de edad. Este proceso es regulado por factores como GABA y otros neurotransmisores liberados en el hipotálamo medial basal (HMB) y área preóptica anterior (APO), modulados a su vez por neuroesteroides, tales como allopregnanolona (Allo). Previamente demostramos que Allo incrementa la liberación de glutamato en HMB/APO durante el estadio puberal (P) (55d). Además determinamos que la expresión génica de 3á-HOR, enzima que sintetiza Allo, se encuentra aumentada en AV y en P versus ratas prepúberes (PreP) de 30d. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) determinar si allopregnanolona modula la liberación de GABA en HMB/APO de ratas púberes (P), 2) evaluar la actividad enzimática de 3á-HOR en HMB/APO de ratas PreP, AV y P. Metodología: 1) Se usaron HMB/APOs de ratas P a los que se realizó un ensayo de liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA inducida por K<sup>+</sup>, superfundándolos con ya sea buffer KRBG libre de Mg<sup>++</sup> (control) o allopregnanolona 120nM. Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de [<sup>3</sup>H]-GABA y se analizaron por "t" test. 2) HMB/APOs de ratas P, AV y PreP, se homogeneizaron y centrifugaron para separación de las fracciones citoplasmáticas a las que se realizó el ensayo enzimático de 3á-HOR por medición espectrofotométrica de la oxidación de NADPH. Los resultados se expresaron como mUI/mg prot y fueron analizados por ANOVA I y test de Tukey. Resultados: 1) Allo aumenta la liberación inducida de [<sup>3</sup>H]-GABA con respecto al control (P<0,05). 2) La actividad de 3á-HOR aumenta en P con respecto a PreP (P<0,01), sin diferencias entre AV y PreP. Concluimos que Allo modula la liberación de GABA hipotalámico en P, y que los niveles del neuroesteroide estarían incrementados durante este estadio debido a la actividad

aumentada de 3á-HOR por lo que allopregnanolona sería un importante factor regulador durante el desarrollo puberal.

**136. (775) EL FACTOR GLIAL S100B INDUCE CAMBIOS EN LA SOBREVIDA NEURONAL EN UNA FORMA RAGE Y NFKB DEPENDIENTES: IMPLICANCIAS EN LA ISQUEMIA CEREBRAL**

Villarreal A.<sup>1</sup>; Aviles Reyes R.<sup>2</sup>; Angelo M.<sup>3</sup>; Reines A.<sup>4</sup>; Ramos A.<sup>5</sup>;

Instituto de Biología Celular y Neurociencias Profesor Eduardo de Robertis<sup>1 2 3 5</sup>; ININF<sup>4</sup>  
avillarreal.med@gmail.com

La proteína S100B es un componente mayoritario del citoplasma astrogial y se libera en situaciones de injuria cerebral. S100B interactúa con el Receptor para Productos Avanzados de Glicosilación (RAGE) que se expresa durante el desarrollo pero esta ausente en el cerebro adulto. S100B induce sobrevida o muerte celular (en niveles nM o uM respectivamente) y extensión de neuritas en cultivos de neuroblastoma que expresan RAGE. La interacción de RAGE con sus ligandos activa NFκB. Con el objetivo de determinar si este sistema S100B>RAGE>NFκB tiene participación en la muerte/sobrevida neuronal luego de la isquemia cerebral, estudiamos la expresión de RAGE en un modelo de isquemia experimental por desvascularización cortical y luego, en cultivos primarios de neuronas corticales, estudiamos los efectos de la exposición a S100B en neuronas expuestas a excitotoxicidad por glutamato. La lesión isquémica indujo la expresión de RAGE específicamente en neuronas de la penumbra isquémica. La neuronas RAGE+ mostraron núcleos normales o picnoticos, y se detectaron a los días 1, 3, 7 postlesión isquémica. Especialmente a 1DPL, se observó localización nuclear de NFκB en las neuronas RAGE+. La excitotoxicidad por glutamato indujo la sobreexpresión de RAGE en cultivos primarios neuronales y potencio los efectos de inducción de la extensión de dendritas y de muerte o sobrevida neuronal inducidos por dosis uM o nM de S100B. Estos efectos fueron eficientemente bloqueados por anticuerpos neutralizantes anti RAGE. El bloqueo de NFκB con sulfasalazina indujo una masiva muerte neuronal que fue prevenida por S100B, que demostró revertir el bloqueo de NFκB. Concluimos que la activación del sistema S100B>RAGE>NFκB ocurriría luego de la isquemia cerebral. En cultivos neuronales S100B modifica la sobrevida neuronal y la extensión de dendritas en una forma RAGE-dependiente. NFκB sería el mediador de los efectos de S100B en la sobrevida neuronal

## FARMACOLOGÍA 2

**137. (63) MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE H2O2 POR UN EXTRACTO DE LARREA DIVARICATA CAV. EN GLÁNDULAS SUBMAXILARES DE ANIMALES DIABÉTICOS INDUCIDOS CON ESTREPTOZOTOCINA.**

Turner S.<sup>1</sup>; Zettler G.<sup>2</sup>; Filip R.<sup>3</sup>; Anesini C.<sup>4</sup>

IQUIMEFA UBA CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
canesini@yahoo.com.ar

El estrés oxidativo participa en la patogenia y progresión del daño en tejidos bucales durante la diabetes. El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido durante el estrés oxidativo está relacionado con modificaciones en el epitelio bucal humano. Un desbalance de las enzimas antioxidantes se observa en diversos tejidos de animales diabéticos. *L. divaricata* presenta acciones antiproliferativas y antioxidantes. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del extracto acuoso de *L. divaricata* (LAE) (500 µg/ml) y de su compuesto mayoritario ácido nordihidroguayarático (NDGA) (1,5 µg/ml), sobre el nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las glándulas submaxilares de animales diabéticos inducidos por estreptozotocina, en relación con la modulación de las enzimas antioxidantes como peroxidasa (Px) y superóxido dismutasa (SOD). El nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la actividad enzimática se determinó por métodos espectroscópicos. Los resultados se expresaron como la Media ± ESM de tres experimentos realizados por duplicado \* p



<0,05, \*\*p<0.01 diferencias significativas con respecto al control, # p <0,05, ##p< 0.01 diferencias significativas con respecto a diabéticos, de acuerdo con la prueba t de Student. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mM / g glándula): control (C): 4,16 ± 0,29, diabéticos (D): 6,80 ± 0,6 \*; D + LAE: 3,56 ± 0,3 #, D + NDGA: 4,19 ± 0,2 #. Px (U / ml / g glándula): C: 0,0017 ± 0,00012; D: 0,0011 ± 0,0001 \*; D + LAE: 0,0052 ± 0,0005 #, D + NDGA: 0,000825 ± 0,00017 #. SOD (U / ml / g glándula): C: 3,60 ± 0,4; D: 6 ± 0,3\*\*; D + LAE: 1,68 ± 0,1\*\*, D + NDGA: 4,54 ± 0,20#. *Conclusiones:* el nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue elevado en glándulas salivales de animales diabéticos en relación con una baja actividad peroxidasa. LAE fue capaz de modular el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentando la actividad Px y disminuyendo la actividad SOD. NDGA, el compuesto mayoritario, se relacionó con esta acción principalmente modulando la actividad SOD.

**138. (115) ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO DE COMPLEJOS DENDRIMERO-RISPERIDONA PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS GENERALIZADOS DEL DESARROLLO**

Marotta C.<sup>1</sup>; Del Rio Zabala N.<sup>2</sup>; Temprana C.<sup>3</sup>; Alonso S.<sup>4</sup>; Prieto M.<sup>5</sup>;

Universidad Nacional de Quilmes<sup>1 2 3 4 5</sup>  
chmarotta@gmail.com

El autismo es un grave trastorno psicológico de la infancia. Entre las drogas antipsicóticas más utilizadas se encuentra la risperidona (RSP), sin embargo, debido a sus propiedades fisicoquímicas, presenta severos efectos colaterales. Los dendrímeros (D), son polímeros tridimensionales con propiedades únicas: mínima polidispersidad, estructura definida, tamaño en el rango nanométrico, alta solubilidad y posibilidad de liberación controlada. Los D pueden incorporar RSP en el interior de sus bolsillos hidrofóbicos o bien anclarlos a sus grupos superficiales. Como principal objetivo, se plantea utilizar los D PAMAM, apuntando a aumentar la solubilidad en medios acuosos de la RSP, y de esta manera incrementar la droga biodisponible para acceder a su sitio de acción. Se prepararon complejos D-Risp en diferentes condiciones para obtener la máxima incorporación. Se estudió su estabilidad mediante microdiálisis. Se testeó la citotoxicidad de los complejos sobre cultivo celular y hemólisis y cambios morfológicos sobre glóbulos rojos humanos. Se estudió la biodistribución y farmacocinética en ratones balb-c por vía oral y, por último, los cambios comportamentales, ritmos cardíacos y peso corporal en pez cebra. Como resultado se obtuvo la mayor incorporación de Risp a menor polaridad del solvente, pH 7, T. amb y baja fuerza iónica para DG4 y a pH 3 para DG4,5 y resultaron estructuralmente estables (106 h). Por otro lado, los complejos Risp-D no mostraron reducción de la viabilidad celular (3 10<sup>-2</sup> μM D y 5,1 μM Risp), y no se observó ni hemólisis ni cambios morfológicos. En los ensayos *in vivo* se observó comportamiento diferenciado de la droga cuando es administrado en forma de complejos. En el presente trabajo se planteó una formulación novedosa de un sistema de liberación controlada con la droga antipsicótica RSP. Estos complejos presentan un incremento en la biodisponibilidad de la droga para utilizarse como posible tratamiento para Trastornos Generalizado del Desarrollo.

**139. (177) EXPRESIÓN RENAL Y HEPÁTICA DE BILITRANSLOCASA EN RATAS TRATADAS CON CLORURO MERCÚRICO**

Trebucobich M.<sup>1</sup>; Hazelhoff M.<sup>2</sup>; Passamonti S.<sup>3</sup>; Brandoni A.<sup>4</sup>; Torres A.<sup>5</sup>

Farmacología Fac Cs Bioq y Farm Unr<sup>1 2</sup>; Department Of Life Sciences, University of Trieste, Italia<sup>3</sup>; Farmacología Fac Cs Bioq y Farm Unr; CONICET<sup>4 5</sup>  
maratrebucobich@hotmail.com

La Bilitranslocasa (BTL) es una proteína que transporta aniones orgánicos tal como compuestos endógenos y drogas de interés farmacológico. La misma se expresa en membrana basolateral de hígado y de riñón. El mercurio inorgánico es un importante contaminante ambiental. El hecho de que el mismo aún sea utilizado en baterías, lámparas, termómetros, pesticidas y cosméticos, entre

otros, aumenta de forma considerable el riesgo de toxicidad. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la expresión hepática y renal de BTL en ratas expuestas a cloruro mercurico (HgCl<sub>2</sub>). Se trabajó con ratas Wistar hembra adultas tratadas con una dosis única de HgCl<sub>2</sub> (4 mg/kg p.c., i.p.) 18 h antes de los experimentos (grupo T, n=4). Paralelamente se procesó un grupo de ratas control (C, n=4). En estos animales se determinaron los niveles plasmáticos de urea (U) y de las transaminasas AST y ALT. Se evaluó también la histología renal y hepática. La expresión de BTL en homogenados (H) y en membranas plasmáticas (M) de riñón (r) e hígado (h) se analizó mediante Western blotting. Los resultados se expresan como media ± SEM. U (g/L): C = 0.36 ± 0.02, T = 1.87 ± 0.32\*; AST (U/L): C = 13.00 ± 0.98, T = 53.42 ± 6.49\*; ALT (U/L): C = 4.27 ± 0.39, T = 4.80 ± 0.96; BTL Hr (%): C = 100 ± 3, T = 145 ± 3\*; BTL Mr (%): C = 100 ± 6, T = 180 ± 15\*; BTL Hh (%): C = 100 ± 3, T = 99 ± 4; BTL Mh (%): C = 100 ± 3, T (%): 74 ± 3\*; \*p<0.05. Los estudios histológicos corroboraron el daño renal y hepático ocasionado por la dosis empleada de HgCl<sub>2</sub>. El daño hepático produciría una disminución en la expresión de BTL en la membrana plasmática de los hepatocitos. Por el contrario, en el grupo T se observa una mayor expresión de BTL en riñón. Esto se explicaría como una respuesta compensadora a la alteración en el transporte hepático de compuestos mediado por esta proteína, con el objetivo de favorecer la eliminación renal de los mismos.

**140. (385) MECANISMOS DE ACCIÓN Y TOXICIDAD DE NAFTOFURANQUINONAS TRIPANOCIDAS EN FRACCIONES SUBCELULARES DE HÍGADO DE RATA Y CELULAS EL-4.**

Elingold L.<sup>1</sup>; Di Rosso M.<sup>2</sup>; Barreiro Arcos M.<sup>3</sup>; Da Silva Junior E.<sup>4</sup>; Pinto A.<sup>5</sup>; Pinto M.<sup>6</sup>; Cremaschi G.<sup>7</sup>; Dubin M.<sup>8</sup>  
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos<sup>1 2 3 7 8</sup>;  
Núcleo de Pesquisas em produtos Naturais, Universidade federal do Rio de Janeiro, Brasil.<sup>4 5 6</sup>  
mis10jerbos@hotmail.com

Las naftoquinonas son compuestos naturales abundantes en la naturaleza y con diversas actividades biológicas como antimicrobianas, anti-inflamatorias, antitumorales, entre otras. En este trabajo evaluamos algunos mecanismos de acción de tres naftofuranquinonas (NFQ's) con actividad tripanocida (NPPN 3222,3223 y 3226), sobre partículas sub-mitocondriales de hígado de rata y su efecto sobre células de linfoma T murino, EL-4. La adición de estas drogas (50 μM) a una suspensión de partículas en presencia de NADH e inhibidas con cianuro, estimuló la oxidación (medida a 340nm) de este nucleótido, hasta 45 veces. Los tres compuestos estimularon significativamente la producción de anión superóxido, medida por reducción del citocromo c parcialmente acetilado, en forma dependiente de la concentración. La NPPN 3222 incrementó tres veces la producción de anión superóxido respecto a la NPPN 3226, a 10 μM. Ninguna de las NFQ's inhibieron las actividades de los complejos respiratorios I-III o II-III (medidas por reducción del citocromo c a 550nm). Las tres NFQ's inhibieron significativamente la proliferación de células de la línea EL-4, medida por el método de incorporación de timidina tritiada, a partir de 2 mM. Estos resultados indicarían la producción de un ciclo redox por las NFQ's, desviando los electrones desde NADH hacia el metabolismo de las drogas, con producción de ROS (superóxido), sin observarse inhibición de las actividades de los complejos respiratorios. Este mecanismo, podría ser el responsable de la inhibición de la proliferación de las células EL-4.

**141. (380) POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL INDUCIDA POR BRADICININA (BK) MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE METALOPEPTIDASAS EN VENA UMBILICAL HUMANA (VUH)**

Nowak W.<sup>1</sup>; Santin Velazque N.<sup>2</sup>; Kilstein Y.<sup>3</sup>; Rothlin R.<sup>4</sup>  
Tercera Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina  
Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 4</sup>  
wnowak@fmed.uba.ar

*Introducción y Objetivos:* Las cininas son péptidos activos hidrolizados por metalopeptidasas. El objetivo fue evaluar si la

enzima convertidora de angiotensina (ECA) y endopeptidasa neutra (NEP) participan en la inactivación biológica de la bradicinina (BK) en vena umbilical humana (VUH). *Métodos:* Utilizando la técnica de órgano aislado los anillos de VUH, con y sin endotelio (E+, E-), fueron incubados bajo tensión isométrica en solución de Krebs a 37°C, a pH 7.4 y burbujeados con carbógeno. Luego de 2h de incubación se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a BK (agonista selectivo del receptor a cininas B2) en ausencia y presencia, 30 min antes de la CCR, de inhibidores enzimáticos. La presencia de endotelio fue confirmada por estudios histológicos. Resultados: Se observó potenciación de la respuesta a BK en anillos de VUH E- en comparación con anillos de VUH E+ ( $pCE_{50}$  E+:  $9.18 \pm 0.02$ ;  $pCE_{50}$  E-:  $9.46 \pm 0.04$ ,  $p < 0.0001$ ). La aplicación previa de Captopril  $1 \mu M$  (C, inhibidor selectivo de la ECA) o de Fosforamidón  $10 \mu M$  (F, inhibidor selectivo de la NEP) indujo un corrimiento hacia la izquierda de la CCR a BK en VUH E+ ( $pCE_{50}$  control:  $9.18 \pm 0.02$ ; C:  $9.38 \pm 0.03$ ,  $p < 0.01$ ; F:  $9.34 \pm 0.06$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, no se observó potenciación de la respuesta a BK en anillos de VUH E- previamente expuestos a Captopril  $1 \mu M$  o Fosforamidón  $10 \mu M$  en comparación con controles E- ( $pCE_{50}$  control:  $9.46 \pm 0.04$ ; C:  $9.49 \pm 0.05$ ; F:  $9.22 \pm 0.07$ ). La aplicación previa de Omapatrilat  $10 \mu M$  (O, inhibidor selectivo dual de ECA y NEP) y la exposición conjunta a Captopril  $1 \mu M$  y Fosforamidón  $10 \mu M$  indujo una mayor potenciación de la respuesta a BK en comparación con la observada con la aplicación individual de los inhibidores mencionados en VUH E+ (C:  $9.38 \pm 0.03$ , F:  $9.34 \pm 0.06$ , C+F:  $9.67 \pm 0.04$ , O:  $9.79 \pm 0.04$ ,  $p < 0.001$ ). Conclusiones: Estos resultados constituyen una sólida evidencia farmacológica que la ECA y la NEP, localizadas en endotelio, participan de forma sinérgica en la inactivación biológica de BK en VUH.

#### 142. (574) DESARROLLO DE UN MÉTODO POR HPLC PARA DETERMINAR CONCENTRACIONES DE CLOSANTEL EN PLASMA OVINO

Fariás C.<sup>1</sup>; Imperiale F.<sup>2</sup>; Iezzi S.<sup>3</sup>; Sallovitz J.<sup>4</sup>; Lanusse C.<sup>5</sup>

Laboratorio de Farmacología Fac. Cs. Veterinarias UNCPBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
fariascrist@gmail.com

Debido al desarrollo de resistencia a la mayoría de los fármacos antiparasitarios de uso convencional por parte de los principales géneros parasitarios que afectan a ovinos, closantel (CLS) (derivado de las salicilanilidas) se presenta actualmente como una alternativa para el tratamiento de parasitosis internas y algunas ectoparasitosis que afectan a ovinos. A pesar del uso ampliamente difundido de este compuesto, no existe información disponible sobre las características de su distribución sistémica. Por lo tanto, para cuantificar las concentraciones de CLS en plasma ovino fue necesario el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC con detección por fluorescencia. La validación fue basada en la linealidad, porcentaje de recuperación absoluta, exactitud, precisión en los diferentes días de trabajo y límite de cuantificación. La extracción de CLS desde muestras de plasma ovino adicionadas fue realizada empleando una doble extracción líquido-líquida, seguida de una extracción en fase sólida (cartuchos de C18). El procedimiento analítico-metodológico empleado resultó altamente eficiente. La identificación de CLS y CLS demetilado como estándar interno se realizó comparando los tiempos de retención de estándares de optima pureza en la corrida cromatográfica. El análisis de regresión fue lineal y los valores de los coeficientes de correlación obtenidos en las rectas de calibración (rango de 0.1-5  $\mu g/ml$  y 5-80  $\mu g/ml$ ) construidas por el método de regresión lineal fueron superiores a  $r = 0.99$ . El promedio de los porcentajes de recuperación absoluta fue 94% y una precisión inter-día del 8.6% (CV). La exactitud de los procedimientos analíticos mostraron un  $CV \leq 6\%$ . El método analítico desarrollado permitió cuantificar concentraciones de CLS en plasma ovino por encima de 0.1  $\mu g/ml$ . Los resultados obtenidos en la validación aseguran que el método de extracción y cuantificación por HPLC es analíticamente adecuado para cuantificar concentraciones de CLS en plasma ovino.

#### 143. (590) EL PARACETAMOL (P) INHIBE EL TRANSPORTE IN VITRO DE RODAMINA 123 MEDIADO POR LA P-GP COPROTEÍNA (P-GP) INTESTINAL.

Novak A.<sup>1</sup>; Delli Carpini G.<sup>2</sup>; Luquita M.<sup>3</sup>; Rubio M.<sup>4</sup>; Mottino A.<sup>5</sup>; Ghanem C.<sup>6</sup>

Cátedra de Fisiopatología. FFYB. UBA<sup>1 2</sup>; Instituto de Fisiología Experimental. CONICET-UNR<sup>3 5</sup>; Instituto de Investigaciones Farmacológicas. CONICET-UBA<sup>4</sup>; Cátedra de Fisiopatología. FFYB. UBA; Instituto de Investigaciones Farmacológicas. CONICET-UBA<sup>6</sup>  
cghanem@ffyb.uba.ar

Muchos sustratos de la P-gp modulan la expresión y/o actividad del transportador, sea actuando como inductores o inhibidores, afectando así su propia biodisponibilidad. *Objetivo:* Evaluar si el P inhibe el transporte in vitro del sustrato modelo de P-gp, rodamina 123 (Ro), en intestino de rata y si los inhibidores modelo de P-gp afectan el transporte de P, como una forma indirecta de evaluar si P es sustrato de P-gp. *Materiales y Métodos:* Se utilizaron los últimos 10 cm de intestino delgado de ratas Wistar macho adultas (anexos a la válvula ileocecal). Se prepararon sacos evertidos (10 cm), se llenaron con distintas concentraciones de Ro (9, 18 y 36  $\mu M$ , lado seroso) y se incubaron en buffer KH (lado mucoso) con o sin agregado de P 100  $\mu M$ . Se tomaron muestras del lado mucoso a los 40 min. En otro set de animales, los sacos se llenaron con P (100  $\mu M$ ) y su eflujo se estudió en presencia o ausencia de dos inhibidores de P-gp (verapamilo y Psc 833; 100 y 10  $\mu M$ , respectivamente). *Resultados:* El eflujo de Ro (nmol/g de tejido) fue  $0.34 \pm 0.16$ ,  $0.63 \pm 0.32$  y  $1.74 \pm 0.54$  para concentraciones de Ro de 9, 18 y 36  $\mu M$ , respectivamente. En presencia de P el eflujo de Ro disminuyó a  $0.12 \pm 0.05$ ,  $0.26 \pm 0.11$  y  $0.89 \pm 0.27$  ( $p < 0.05$   $n=5$ ) para las mismas concentraciones de Ro. Cuando se estudió el eflujo de P en presencia o ausencia de verapamilo o Psc 833, no se registraron diferencias significativas. *Conclusión:* La actividad de P-gp in vitro es inhibida por la presencia de P, aunque la ausencia de transporte de P por la P-gp sugeriría un tipo de inhibición no asociada a competición por sustrato. Esta inhibición puede implicar alteraciones en la biodisponibilidad de drogas, sustratos de P-gp, que se co-administran oralmente con P.

#### 144. (665) DETERMINACIÓN DEL PERIODO DE RETIRADA DE LA AMOXICILINA EN LECHE DE CABRA

Ambros L.<sup>1</sup>; Tarragona L.<sup>2</sup>; Kreil V.<sup>3</sup>; Monfrinotti A.<sup>4</sup>; Brynkier J.<sup>5</sup>; Veksler Hess J.<sup>6</sup>

Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA<sup>1 2 3 4</sup>; Clínica de Rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA<sup>5</sup>; Producción de Ovinos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA<sup>6</sup>  
ambros@fvvet.uba.ar

La presencia de residuos de sustancias antimicrobianas en la leche puede ocasionar problemas en la salud pública y en la industria láctea. La amoxicilina es un antimicrobiano de uso frecuente en cabras para el tratamiento de infecciones sistémicas. El objetivo de este trabajo fue determinar la cantidad de ordeñes necesarios para que las concentraciones de amoxicilina en leche caigan por debajo de límite máximo permitido (LMR) tras la administración de una dosis intramuscular de la droga formulada con sal soluble y de depósito. Se utilizaron 6 cabras, clínicamente sanas, 25-30 días después del parto (peso:  $39.9 \pm 6.14$  kg). Los animales recibieron una dosis intramuscular de 15 mg/kg de amoxicilina soluble (Amoxidal<sup>®</sup>, Laboratorio Roemmers). Tras un período de wash-out de 15 días, recibieron una dosis por vía intramuscular de 15 mg/kg de una formulación de depósito de la misma droga (Clamoxyl I.a.<sup>®</sup>, Laboratorio Pfizer). La droga fue administrada una vez finalizado el ordeño. Se tomaron muestras de leche cada 12 horas, ordeñando en forma completa cada glándula mamaria. Una alícuota de leche se conservó en heladera (4°C) hasta su procesamiento (48-72 horas luego de la obtención). La presencia de residuos se determinó mediante test microbiológico Deltotest<sup>®</sup>, el cual utiliza *Bacillus stearothermophilus*. El límite de cuantificación fue de 50 ppb. Se detectaron concentraciones de amoxicilina superiores a 50ppb hasta 8 y 12 ordeños después de

la administración de la formulación soluble y de depósito, respectivamente. No se detectaron falsos negativos. Si bien no hay un LMR establecido para la amoxicilina en leche de cabra, se utiliza, como para la mayoría de los antimicrobianos, el mismo que para bovinos, con esta consideración, este trabajo demuestra que luego de la utilización de amoxicilina en cabras el período de retirada de leche de la droga es de 8 y 12 ordeños si se la utiliza con una formulación soluble o de depósito, respectivamente.

**145. (805) EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON EFAVIRENZ DISMINUYE SU PROPIA ABSORCIÓN INTESTINAL Y SU DISTRIBUCIÓN AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL AL MODIFICAR LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE EFLUJO BCRP**

Peroni R.<sup>1</sup>; Hotch C.<sup>2</sup>; Di Gennaro S.<sup>3</sup>; Chiappeta D.<sup>4</sup>; Rubio M.<sup>5</sup>; Sosnik A.<sup>6</sup>; Bramuglia G.<sup>7</sup>  
 ININFA, CONICET-UBA<sup>1,3,5</sup>; Farmacología, Fac Fcia y Bioq, UBA<sup>2,7</sup>; Farmacotecnia, Fac de Fcia y Bioq, UBA<sup>4,6</sup>  
 rperoni@ffyub.uba.ar

El efavirenz (EFV) es un anti-VIH que reduce la carga viral en el sistema nervioso central. Previamente, demostramos que el tratamiento oral crónico con este fármaco aumenta la expresión del transportador de eflujo BCRP en linfocitos, en intestino delgado y en la barrera hemato-encefálica (BHE) y que a su vez EFV es sustrato del transportador. El objetivo de este trabajo fue analizar si la sobreexpresión de BCRP afecta el pasaje de EFV a través del intestino y de la BHE. Ratas macho Sprague-Dawley recibieron 20 mg/kg de EFV o de su vehículo (Pluronic F127 10%) p.o. una vez al día durante 5 días. Los ensayos se realizaron el último día de administración ó 24 hs después. La permeabilidad intestinal se midió en sacos de íleon evertidos. El pasaje a través de la BHE de una dosis extra de EFV 20 mg/kg i.v. se evaluó por microdialisis en el hipocampo. El EFV se cuantificó por HPLC-UV y la expresión de BCRP por Western Blot. El eflujo de EFV (1 mM) en el íleon disminuyó drásticamente en las ratas tratadas con EFV (96±3 % y 90±2%, respectivamente; p<0.001, n=3) al quinto día, mientras que la reducción fue mucho menos marcada 24 hs después (26±3% y 15±2%, respectivamente; p<0.05, n=3). Además, el área bajo la curva de EFV disminuyó significativamente en el sistema nervioso central (44±5%, p<0.01, n=5) mientras que aumentó en plasma (47±6%, p<0.05, n=5) en las ratas tratadas crónicamente con el antirretroviral al quinto día. Sin embargo no se encontraron modificaciones con respecto a los controles cuando los ensayos se realizaron un día después. Notoriamente, la expresión de BCRP observada al quinto día disminuyó significativamente luego de 24 hs tanto en íleon (42±5%; p<0.05) como en BHE (75±7%; p<0.01). Nuestros resultados sugieren que el tratamiento crónico con EFV, al modificar reversiblemente la abundancia de BCRP, altera su propia biodisponibilidad oral y distribución al sistema nervioso central, contribuyendo a las variaciones en su eficacia terapéutica.

**146. (703) CARACTERIZACIÓN DE LA ABSORCIÓN PERCUTÁNEA IN VITRO DE LACTONAS MACROCÍCLICAS (DORAMECTINA Y MOXIDECTIN) EN BOVINOS: CORRELACIÓN IN VIVO-IN VITRO**

Sallovitz J.<sup>1</sup>; Nejamkin P.<sup>2</sup>; Imperiale F.<sup>3</sup>; Virkel G.<sup>4</sup>; Lifschitz A.<sup>5</sup>; Lanusse C.<sup>6</sup>  
 Laboratorio de Farmacología Dpto de Fisiopatología. Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA; CICIPBA<sup>1,2</sup>; Laboratorio de Farmacología Dpto. de Fisiopatología Facultad de Ciencias Veterinarias UNCPBA; CONICET<sup>3,4,5,6</sup>  
 juan@vet.unicen.edu.ar

El uso tópico de drogas ha recibido una gran aceptación a nivel mundial, debido a su facilidad de administración y mínimas molestias para los animales tratados. Cualquier droga aplicada sobre la piel tiene la potencialidad de ser absorbida tanto local como sistémicamente. Sin embargo, existen factores inherentes al animal tratado, la composición de la formulación y la droga misma que pueden determinar diferencias en el proceso de absorción percutánea. Estos factores han determinado la necesidad de un método *in vitro* que sea rápido, sencillo y económico para predecir

la absorción *in vivo*. Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar la absorción *in vitro* de dos antiparasitarios del grupo de las lactonas macrocíclicas, moxidectin (MXD) y doramectina (DRM) y correlacionar dichos resultados con estudios cinéticos *in vivo*. Se utilizaron las mismas formulaciones comerciales para ambas fases (*in vivo* e *in vitro*). Los estudios *in vitro* se realizaron utilizando cámaras de difusión de Franz. El estrato córneo de la piel bovina fue escindido mediante el uso de un dermatómero, obteniendo capas de 500 µm. Se tomaron muestras de medio receptor hasta las 72 h y las concentraciones se determinaron por HPLC. DRM presentó valores de T<sub>lag</sub>, flujo y coeficiente de permeación mayores que MXD, siendo estos parámetros 5,29 (P<0,001), 2,93 (P<0,05) y 2,93 (P<0,05) veces mayores, respectivamente. Los porcentajes permeados acumulados *in vitro* se correlacionaron con las fracciones absorbidas (Wagner-Nelson), ABC parciales y ABC<sub>0-t</sub> como porcentaje del ABC<sub>0-inf</sub> post-administración *in vivo*. Los valores de r para DRM variaron entre 0,9745 y 0,9766, mientras que para MXD estuvieron entre 0,8846 y 0,9907. En conclusión, la metodología *in vitro* aquí informada es un técnica sencilla y rápida que puede ser utilizada para determinar la absorción en el screening de formulaciones tópicas antes de sus ensayos *in vivo* en bovinos.

**147. (628) ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL INHIBIDOR DE PROTEASAS MPI**

Lazza C.<sup>1</sup>; Araújo E Silva A.<sup>2</sup>; López L.<sup>3</sup>; Lopes M.<sup>4</sup>; Salas C.<sup>5</sup>  
 Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales<sup>1,3</sup>; Laboratório de Biología Molecular de Produtos Naturais e Laboratório de Substâncias Antitumorais. Instituto de Ciências Biológicas, Universidad Federal de Minas Gerais<sup>2,4,5</sup>  
 lazzacmartin@yahoo.com.ar

Una regulación precisa de la actividad proteolítica tanto espacial como temporalmente es esencial para la fisiología humana, es por esto que muchas proteasas se han convertido en importantes dianas biomédicas. Los inhibidores de proteasas (IPs) de plantas son estructuras peptídicas pequeñas que generalmente se encuentran en alta concentración en tejidos de almacenamiento. La actividad de los inhibidores obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima y representan una herramienta terapéutica valiosa, habiendo probado su utilidad no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos. Un inhibidor de tripsina y quimotripsina (Mpl) de origen vegetal fue aislado a partir de semillas de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid., empleando una estrategia de purificación que comienza con una precipitación acetónica y es seguida por cromatografía de exclusión molecular, de intercambio aniónico y RP-HPLC. El análisis por espectrometría de masas (MALDI TOF) muestra que está compuesto por varias isoformas, la forma molecular mayoritaria presenta una masa de 6650 Da y posee al menos 5 puentes disulfuro estabilizando su estructura, la secuencia N-terminal no mostró homología con inhibidores de proteasas aislados hasta el momento. Se realizaron ensayos para detectar la actividad citotóxica del inhibidor utilizando el método de reducción de la sal de tetrazolio. Los ensayos de citotoxicidad con Mpl (10<sup>-11</sup>- 10<sup>-8</sup> M) utilizando un panel compuesto de cuatro líneas celulares (B16F1, A549, CHO y BHK) mostraron que la mayor actividad citotóxica ocurrió en células CHO, seguido de BHK y A549, siendo que las células B16F1 resultaron ser las menos afectadas por Mpl

**148. (473) RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE PRESCRIPTORES MÉDICOS Y EL CONTROL DE PACIENTES DIABÉTICOS AMBULATORIOS DE UN HOSPITAL PÚBLICO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE.**

Quaglia N.<sup>1</sup>; Odetto C.<sup>2</sup>; Cuis N.<sup>3</sup>; Nuñez M.<sup>4</sup>; Marzi M.<sup>5</sup>  
 Área Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Unr.<sup>1,2,5</sup>; Área Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.<sup>3</sup>; Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina. UBA.<sup>4</sup>  
 norabeatrizquaglia@yahoo.com.ar

La diabetes mellitus II es una patología de alta prevalencia que ocasiona un gasto importante al sistema de salud. En nuestras investigaciones previas hemos encontrado que la adherencia a los fármacos hipoglucemiantes orales (HO) en los pacientes del Hospital Provincial del Centenario de la ciudad de Rosario, estimada como tasa de posesión (TP), ha sido insuficiente respecto de las tasas esperables; el control glicémico en este grupo poblacional también ha sido muy deficitario. El objetivo de este trabajo fue valorar el número de prescriptores médicos intervinientes y su posible relación con el control de la enfermedad. Se llevó a cabo un estudio observacional de corte transversal. Se relevó toda la información contenida en las prescripciones que dieron lugar a la dispensación de HO desde la Oficina de Farmacia a los pacientes diabéticos ambulatorios durante el año 2008. Se obtuvieron los datos del control de glicemia para estos pacientes a partir de la base de datos del Laboratorio Central. Se consideraron sólo aquellos pacientes que presentaron una TP para cualquiera de los HO utilizados mayor a 0,5. Para el análisis estadístico se usó el programa EpiInfo 3.2.2. En el análisis inferencial se consideró significativo  $p < 0,05$ . Resultados ( $n=130$ ): prescriptores/paciente (media $\pm$ SEM):  $3,12 \pm 0,18$ ; el 43,8% (IC 95%: 35,2-52,8%) de los pacientes presentó uno o dos prescriptores ( $P_{1-2}$ ) y el 56,2% (IC 95%: 47,2-64,8%) presentó de 3 a 11 ( $P_{3+}$ ). El mayor número de prescriptores  $P_{3+}$  se asoció significativamente con pacientes con diagnóstico de HTA (OR = 2,61;  $p=0,01$ ) y, aunque sin significancia estadística, con valores de glicemia  $>120$  mg% (OR=2,18;  $p=0,09$ ). Restringir la prescripción de HO a los médicos responsables de la atención de la diabetes podría contribuir a un mejor control de la enfermedad y sus complicaciones. Es importante coordinar los esfuerzos de las distintas especialidades médicas para evitar la dispersión en el control médico de la patología de base.

**149. (487) BENCIDAMINA INHIBE LA SULFOXIDACIÓN ENANTIOSELECTIVA DEL ANTIHELMÍNTICO ALBENDAZOLE A NIVEL HEPÁTICO EN OVINOS.**

Virkel G.<sup>1</sup>; Maté L.<sup>2</sup>; Lifschitz A.<sup>3</sup>; Ballent M.<sup>4</sup>; Sallovit J.<sup>5</sup>; Fariás C.<sup>6</sup>; Lanusse C.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Farmacología FCV UNCPBA CONICET*<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; *Laboratorio de Farmacología FCV UNCPBA CPBA*<sup>5</sup>  
 gvirkel@vet.unicen.edu.ar

El antihelmíntico albendazole (ABZ) experimenta un intenso metabolismo hepático en rumiantes. Los sistemas enzimáticos citocromo P450 (CYP) y flavin-monooxigenasa (FMO) participan en la S-oxidación de este fármaco, originando un metabolito sulfóxido (ABZSO) más polar y menos activo. La interferencia de ambas vías metabólicas podría ser una herramienta útil para retardar el metabolismo y la eliminación de ABZ. La bencidamina (BCDM) es una droga con propiedades analgésicas y antiinflamatorias, sustrato del sistema FMO. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto inhibitorio de BCDM sobre la biotransformación de ABZ. Se incubaron microsomas hepáticos ovinos con ABZ (100  $\mu$ M) en ausencia (incUBAiones control) y en presencia de BCDM (12.5-1000  $\mu$ M). Se cuantificó la formación de ABZSO (HPLC fase reversa) y la de sus dos enantiómeros (-) ABZSO y (+) ABZSO (HPLC quiral). Se compararon las CI50 de BCDM y del sustrato/inhibidor clásico de FMO metimazole (MTZ). Utilizando un "pool" de microsomas se observó inhibición de la actividad específica FMO-dependiente (S-oxidación de MTZ) en presencia de BCDM a 750  $\mu$ M (Clint=53.2 mL/min\*mmg) en comparación con el control (Clint=95 mL/min\*mg). La CI50 de BCDM para la formación de ABZSO fue significativamente mayor ( $48 \pm 5$   $\mu$ M,  $p=0.0004$ ) que la obtenida en presencia de MTZ ( $18 \pm 4$   $\mu$ M). Esto indica que BCDM es un inhibidor metabólico 2.67 veces más débil que MTZ. La CI50 de BCDM para la producción del enantiómero (+) ABZSO (reacción catalizada principalmente por FMO) fue  $39 \pm 2$   $\mu$ M, resultando un 97 % menor ( $p=0.038$ ) a la observada para la formación CYP-dependiente de (-) ABZSO ( $290 \pm 141$   $\mu$ M). Se corrobora así la mayor eficacia de BCDM para inhibir la S-oxidación de ABZ vía FMO. BCDM fue 2.44 veces más débil ( $p < 0.0001$ ) que MTZ para inhibir la formación de (+) ABZSO. Estos resultados contribuyen a la búsqueda de herramientas farmacológicas para mejorar la disponibilidad y la eficacia antiparasitaria de ABZ en ovinos.

lógicas para mejorar la disponibilidad y la eficacia antiparasitaria de ABZ en ovinos.

**150. (490) FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL DE VANCOMICINA EN NEONATOS**

Porta A.<sup>1</sup>; Bernabeu E.<sup>2</sup>; Travaglianti M.<sup>3</sup>; Castro G.<sup>4</sup>; Licciardone N.<sup>5</sup>; Guido Cáceres P.<sup>6</sup>; Niselman V.<sup>7</sup>; Schaiquevich P.<sup>8</sup>  
*FFyB, UBA; ICI, UNGS*<sup>1</sup>; *Área de Farmacia, Hospital de Pediatría JP Garrahan*<sup>2 3 6</sup>; *Servicio de Neonatología, Hospital de Pediatría JP Garrahan*<sup>4</sup>; *Laboratorio, Hospital de Pediatría JP Garrahan*<sup>5</sup>; *Cátedra de Matemática, FFyB, UBA*<sup>7</sup>; *CONICET; Unidad de Farmacocinética, Hospital de Pediatría JP Garrahan*<sup>8</sup>  
 hugporta@yahoo.com.ar

La farmacocinética poblacional tiene como objetivo la caracterización de la farmacocinética y el ajuste posológico individualizado y óptimo en la población particular. Para ello se elaboran modelos matemáticos que seleccionan un conjunto de co-variables explicativas que se relacionan con los parámetros farmacocinéticos individuales y permiten finalmente, adecuar el régimen de administración según las necesidades individuales del paciente. Este trabajo tiene como objetivo desarrollar un modelo farmacocinético poblacional de vancomicina en neonatos para contribuir a la mejora en la dosificación de pacientes. Para ello se creó una base de datos de pacientes neonatos tratados con vancomicina que consta de 612 dosajes de niveles de vancomicina en el pico y el valle, luego de una infusión de 1 hora correspondientes a 207 pacientes a partir de registros del Servicio de Neonatología del Hospital JP Garrahan. El análisis de covariables incluye: variables antropométricas (peso; sexo; peso al nacer; edad postnatal, gestacional y postgestacional; estatura; perímetro craneal), bioquímicas (concentración de creatinina, bilirrubina, uremia, hematócrito), clínicas (patologías, apgar) y medicación concomitante. La población analizada consta de una edad gestacional de 34 semanas (23-41); creatinina sérica: 0.49 mg/dl (0.13-5.24) [0.13-5.24], mediana: 0.49 mg/dl). El análisis preliminar del modelo básico en una subpoblación de 50 pacientes se obtuvo un clearance de 145 ml/h (SE=14.4) y un volumen de distribución de 1.8 litros (SE:0.23) con coeficientes de variación interindividual del 66 y del 52 %, respectivamente. Dada la alta variabilidad observada, se realizará un análisis de las covariables que expliquen dicha variabilidad para optimizar la terapéutica de los pacientes.

**151. (560) EFECTO DEL AYUNO PRE-TRATAMIENTO EN LA DISPOSICIÓN PLASMÁTICA DE ALBENDAZOLE EN GALLINAS**

Bistoletti M.<sup>1</sup>; Moreno Torrejon L.<sup>2</sup>; Riva O.<sup>3</sup>; Alvarez L.<sup>4</sup>; Lanusse C.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil; CONICET*<sup>1 4 5</sup>; *Laboratorio de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil*; *CONICET*<sup>2</sup>; *Estación experimental INTA Balcarce, Argentina*<sup>3</sup>  
 bistoletti@vet.unicen.edu.ar

Albendazole (ABZ) es un antihelmíntico benzimidazole ampliamente utilizado en medicina veterinaria. A pesar de que su uso no está aprobado en avicultura, se utiliza para el control de endoparásitos en aves reproductoras. El ayuno pre-tratamiento, es una práctica recomendada en rumiantes para incrementar la biodisponibilidad de este fármaco. Sin embargo, no existen datos sobre la cinética plasmática de ABZ en aves y el efecto que sobre esta pueda tener el ayuno de los animales previo al tratamiento. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del ayuno en la cinética plasmática de ABZ y sus metabolitos, albendazole sulfóxido (ABZSO) y albendazole sulfona (ABZSO<sub>2</sub>), tras su administración oral en gallinas. Doce (12) gallinas *Plymouth Rock* fueron divididas en dos grupos ( $n=6$ ), Grupo Ayuno, los animales fueron sometidos a un ayuno pre-tratamiento de 12 horas, Grupo Control, los animales fueron alimentados *ad libitum*. Todos los animales fueron tratados con una dosis única de ABZ (10 mg/kg)

por vía oral. Muestras de sangre fueron tomadas hasta las 48 horas post-tratamiento. Las concentraciones de ABZ/metabolitos en plasma fueron cuantificadas por HPLC. En ambos grupos se cuantificó en plasma ABZ, ABZSO y ABZSO<sub>2</sub>. Los valores de Cmax para ABZSO y ABZSO<sub>2</sub> en el Grupo Ayuno ( $1.42 \pm 0.27$  y  $0.42 \pm 0.10$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente) fueron similares ( $P > 0.05$ ) a los observados en el Grupo Control ( $1.43 \pm 0.40$  y  $0.47 \pm 0.08$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivamente). Similares resultados fueron observados en el ABC, donde para ABZSO se obtuvieron valores de  $10.7 \pm 2.31$   $\mu\text{g.h/ml}$  (Grupo Ayuno) y  $11.9 \pm 3.63$   $\mu\text{g.h/ml}$  (Grupo Control). En conclusión, un período de ayuno de 12 h previo al tratamiento, no modifica la cinética plasmática de ABZ/metabolitos tras su administración oral en gallinas.

## METABOLISMO Y NUTRICION 2

### 152. (52) LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO ALFA-LIPOICO REVIERTE EN FORMA PARCIAL LAS ALTERACIONES METABÓLICAS QUE PRESENTAN LAS RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA.

*Reyes Toso C.<sup>1</sup>; Ricci C.<sup>2</sup>; Lapresa S.<sup>3</sup>; Reyes-toso M.<sup>4</sup>; Vigliante P.<sup>5</sup>; Linares L.<sup>6</sup>*

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>  
2 3 4 5 6*

*creyestoso@intramed.net*

Las ratas alimentadas con una dieta rica en fructosa desarrollan un cuadro hipertensivo que se acompaña de alteraciones metabólicas en las que se destacan la dislipidemia y la resistencia insulínica. Este cuadro guarda semejanza con el síndrome metabólico que se observa en el ser humano. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados se ha sugerido que las especies reactivas del oxígeno podrían desempeñar un papel importante. En este trabajo se han estudiado los efectos de la administración prolongada (20 semanas) por vía oral, del ácido alfa-lipoico -AL- de conocido efecto antioxidante, sobre la presión arterial sistólica -PAS- y diversas variables metabólicas. Las ratas se dividieron en dos grupos ( $n=16$  c/u): a) dieta estándar -DE-, b) DE + fructosa al 10% (F10%), y en subgrupos: 1- sin AL, -C- ó F10%; 2- con AL 50 mg/día, -C-AL- ó F10%-AL-. Se controlaron: la PAS, glucemia, prueba de tolerancia oral a la glucosa -PTOG-, triglicéridos -TG-, colesterol total -CT-, insulinemia -Ins- y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico -TBARS- tanto en plasma como en homogenatos de corazón e hígado. La administración de F10% aumentó en forma significativa -ANOVA- la PAS ( $P < 0.001$ ), los TG ( $P < 0.001$ ), el CT ( $P < 0.01$ ), los TBARS ( $P < 0.001$ ), la Ins ( $P < 0.001$ ) y alteró la PTOG ( $P < 0.001$ ). Los TBARS en corazón e hígado también aumentaron significativamente -Test "t" Student ( $P < 0.01$  y  $0.001$ ). La administración de AL en las ratas con F10% en la dieta, revirtió el incremento de los TBARS y del CT ( $P > 0.05$  vs C y C-AL), y disminuyó el aumento de la PAS y de los TG (one way ANOVA  $P < 0.01$ ). La PTOG y la Ins no experimentaron modificaciones significativas con respecto al grupo que sólo recibió F10%. Estos resultados muestran que el AL administrado crónicamente es capaz de contrarrestar parcialmente algunas de las alteraciones que presentan las ratas que reciben una dieta con F10%. Se postula que al menos en parte dicho efecto estaría vinculado a su acción anti-oxidante

### 153. (59) EFECTOS DEL FENOFIBRATO SOBRE PARÁMETROS METABÓLICOS Y PROSTANOIDES VASCULARES EN EL SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL EN RATAS

*Borrioni J.<sup>1</sup>; Carranza A.<sup>2</sup>; Peredo H.<sup>3</sup>; Donoso A.<sup>4</sup>; Boudou S.<sup>5</sup>; Puyó A.<sup>6</sup>*

*Facultad de Farmacia y Bioquímica<sup>1</sup>; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), CONICET<sup>2</sup>; Cátedra de Farmacotecnia I, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA), CONICET<sup>3</sup>; Cátedra de Anatomía e Histología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Morfología JJ Naón, Facultad de Medicina (UBA)<sup>4</sup>; Instituto de Morfología JJ Naón, Facultad de Medicina (UBA)<sup>5</sup>  
jennifer\_solange@yahoo.com.ar*

El receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR)á, perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares activados por ligando, regula la expresión de enzimas de oxidación de ácidos grasos. Sus ligandos, los fibratos, se utilizan para el tratamiento de la hipertrigliceridemia. La sobrecarga de fructosa (F) provoca en la rata hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina e hipertensión arterial, un cuadro comparable al síndrome metabólico humano. Previamente encontramos modificaciones en la producción vascular de prostanooides (PR) en este modelo. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del tratamiento con fenofibrato (FB) sobre parámetros metabólicos y la producción de PR en aorta y lecho mesentérico (LM) en animales con sobrecarga oral de F. Se utilizaron 4 grupos de ratas Sprague-Dawley macho: C ( $n=6$ ), dieta normal; F ( $n=6$ ), F al 10% P/V para beber; C-FB ( $n=5$ ), FB 30 mg/kg/día; y F-FB ( $n=5$ ), ambos tratamientos. A las 9 semanas los animales se sacrificaron y las aortas y los LM se incubaron y los PR liberados se midieron por HPLC. La F incrementó la trigliceridemia (mg/dl,  $231 \pm 28$  vs. C:  $50 \pm 3$ ,  $p < 0.005$ ); cuyos niveles bajaron con FB ( $104 \pm 6$  vs. F,  $p < 0.001$ ); la glucemia no se modificó (mg/dl, F:  $94 \pm 4$ ; C:  $78 \pm 17$ ; C-FB:  $80 \pm 20$ ; F-FB:  $146 \pm 21$ , NS). Se detectaron prostaglandinas (PG) F<sub>2</sub>α y E<sub>2</sub>, así como PG 6-cetoF<sub>2</sub>α, tromboxano (TX) B<sub>2</sub>, metabolitos de prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y TXA<sub>2</sub>. F disminuyó los PR vasodilatadores PGI<sub>2</sub> en aorta (ng PR/mg tejido, F:  $74 \pm 12$  vs. C:  $192 \pm 20$ ,  $p < 0.001$ ) y PGE<sub>2</sub> en LM (F:  $28 \pm 8$  vs. C:  $93 \pm 12$ ,  $p < 0.001$ ). El FB previno estas alteraciones: PGI<sub>2</sub> (F-FB:  $143 \pm 23$  vs. F,  $p < 0.05$ ); PGE<sub>2</sub> (F-FB:  $102 \pm 9$  vs. F,  $p < 0.01$ ). No se modificó la liberación de los PR vasoconstrictores PGF<sub>2</sub>α y TXA<sub>2</sub>. Se concluye que el tratamiento con FB, además de su conocido efecto beneficioso sobre el nivel de triglicéridos plasmáticos, previene el desbalance en la producción vascular de PR causado por el síndrome metabólico experimental por sobrecarga de fructosa en la rata.

### 154. (61) LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINA E JUNTO CON ÁCIDO ALFA-LIPOICO REVIERTE EL INCREMENTO DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA Y ALGUNAS ALTERACIONES METABÓLICAS QUE PRESENTAN LAS RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA.

*Linares L.<sup>1</sup>; Wallinger M.<sup>2</sup>; Planells F.<sup>3</sup>; Reyes-toso M.<sup>4</sup>; Balzer R.<sup>5</sup>; Rodríguez R.<sup>6</sup>; Reyes Toso C.<sup>7</sup>*

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina UBA<sup>1</sup>  
2 3 4 5 7; Cátedra de Fisiología y Biofísica Facultad de Medicina USAL<sup>6</sup>  
lauramlinares@yahoo.com.ar*

Una dieta rica en fructosa desarrolla en las ratas un cuadro con hipertensión arterial sistólica, dislipidemia, intolerancia a los carbohidratos y resistencia insulínica que guarda similitudes con el síndrome metabólico que se observa en el hombre. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados se considera que el estrés oxidativo podría jugar un papel importante. En este trabajo se han estudiado los efectos de la administración prolongada (20 semanas) por vía oral, de vitamina E -VE- en forma simultánea con ácido alfa-lipoico -AL- (ambos con efecto anti-oxidante), sobre la presión arterial sistólica -PAS- y diversas variables metabólicas. Las ratas se dividieron en dos grupos ( $n=16$  c/u): a) dieta estándar -DE-, b) DE + fructosa al 10% (F10%), y en subgrupos: 1- sin VE+AL, -C- ó F10%; 2- con VE+AL 50 mg/día, -C-VE+AL- ó F10%-VE+AL. Se controlaron: la PAS, glucemia, prueba de tolerancia oral a la glucosa -PTOG-, triglicéridos -TG-, colesterol total -CT- y las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico -TBARS- tanto en plasma como en homogenatos de corazón e hígado. La administración de F10% aumentó en forma significativa -ANOVA- la PAS ( $P < 0.001$ ), los TG ( $P < 0.001$ ), el CT ( $P < 0.01$ ), los TBARS ( $P < 0.001$ ) y alteró la PTOG ( $P < 0.001$ ). Los TBARS en corazón e hígado también aumentaron significativamente -Test "t" Student ( $P < 0.01$  y  $0.001$ ). La administración de VE+AL con F10% en la dieta, revirtió el incremento de la PAS, los TBARS y del CT ( $P > 0.05$  vs C y C-VE+AL), y disminuyó el aumento de los TG y de la glucemia durante la PTOG (one way ANOVA  $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ ). Estos resultados muestran que la administración crónica simultánea de VE+AL es capaz de contrarrestar el incremento de la PAS y algunas de las alteraciones metabólicas que presentan

las ratas que reciben una dieta con F10%, en mayor grado que el AL sin VE. Este efecto estaría vinculado, al menos en parte, a la regeneración de la VE y al aumento de los niveles de glutatión intracelular que induce el AL

**155. (239) CONSUMO DE UNA DIETA RICA EN SACAROSA (DRS) DURANTE LA PREÑEZ, LACTANCIA Y/O POST LACTANCIA: EFECTO SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO E HIDROCARBONADO EN SU DESCENDENCIA.**

D. Alessandro M.<sup>1</sup>; Lombardo Y.<sup>2</sup>; Oliva M.<sup>3</sup>; Selenscig D.<sup>4</sup>; Chicco A.<sup>5</sup>

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición<sup>1 2 3 4 5</sup>  
medaless@fbc.unl.edu.ar

Un ambiente nutricional adverso en etapas tempranas de la vida, incluyendo alimentación materna durante la preñez (P) y la lactancia (L), incrementa la posibilidad de aparición de enfermedades relacionadas al Síndrome Metabólico de la vida adulta. El objetivo del trabajo fue analizar en ratas crías macho si la exposición a una DRS durante la gestación, lactancia y/o post lactancia (100 días de vida) modifica el metabolismo lipídico e hidrocarbonado. *Diseño del estudio:* Al día 1 de gestación, las madres (M) se dividieron en cuatro grupos, dos de ellos recibieron durante la P y L, dieta control (MC) y los otros dos una DRS (63% p/p) (MS). A partir del destete las crías macho de MC recibieron dieta control (MC-CC) o DRS (MC-CS) hasta los 100 días de vida. Por su parte, las crías de MS recibieron al destete dieta control (MS-CC) o DRS (MS-CS) por el mismo tiempo. Se analizó los niveles de triglicéridos (TG) y glucosa plasmáticos, el contenido de TG hepático, el test de sobrecarga grasa endovenoso (K<sub>2</sub>%), la velocidad de secreción de TG (VSTG) y el test de tolerancia endovenoso a la glucosa (TTEG).

**Resultados:**

	TG PLASMATG mM	HIGADO VSTG µmol/g Tej. 100gxmin	VSTG Húm nmoles/ K <sub>2</sub> %
MC-CC	0,53 ± 0,04 <sup>c</sup>	7,64 ± 0,58 <sup>b</sup>	168,98 ± 14,24 <sup>b</sup>
MC-CS	1,77 ± 0,14 <sup>a</sup>	18,51 ± 0,73 <sup>a</sup>	230,09 ± 20,70 <sup>a</sup>
MS-CC	1,15 ± 0,09 <sup>b</sup>	9,15 ± 0,33 <sup>b</sup>	265,75 ± 15,21 <sup>a</sup>
MS-CS	1,63 ± 0,19 <sup>ab</sup>	14,92 ± 1,90 <sup>a</sup>	139,72 ± 26,70 <sup>b</sup>

X ± SEM, n=6. Valores que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes (p<0,05). El TTEG mostró una respuesta alterada en los lotes MC-CS, MS-CS, MS-CC vs MC-CC (p<0,05). Similar comportamiento fue observado en las glucemias. Nuestro estudio indica que el consumo de una DRS por la madre durante la P y L induce alteraciones en el metabolismo hidrocarbonado y lipídico de sus crías, aún cuando las crías fueron alimentadas con DC luego del destete.

**156. (280) IMPORTANCIA DE LA COMPOSICIÓN DE LA DIETA SOBRE TRIGLICÉRIDOS, COLESTEROL TOTAL, HDL Y OXIDACIÓN DE LÍPIDOS. ESTUDIO PRELIMINAR.**

Perris P.<sup>1</sup>; Fernandez I.<sup>2</sup>; Pellegrino N.<sup>3</sup>; Giacomino M.<sup>4</sup>; Insani M.<sup>5</sup>; Mambrin M.<sup>6</sup>; Felio M.<sup>7</sup>; Slobodianik N.<sup>8</sup>

Cátedra de Nutrición, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.<sup>1 2 6 7 8</sup>; Cátedra de Bromatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>3 4</sup>; Instituto de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, INTA-CASTELAR<sup>5</sup>  
pperris@ffyb.uba.ar

Se ha demostrado la importancia de los desequilibrios nutricionales en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Se estudia el efecto de dietas con alto contenido en grasa, sobre triglicéridos, colesterol sérico, HDL y parámetros de estrés oxidativo en músculo cardíaco, en ratas en período de crecimiento activo. Ratas Wistar (n=24) al destete fueron divididas en 3 grupos y alimentadas durante 10 días con: dieta al 50% de grasa aportada por manteca y manteca de cacao (S); dieta al 50% de grasa

aportada por aceites de oliva y soja (M) y dieta isocalórica (C). Todas las dietas al 20% de proteína y completas en el resto de los nutrientes. Se determinó el perfil de ácidos grasos de las dietas por cromatografía gaseosa. Al finalizar, las ratas fueron sacrificadas y sobre suero se determinó la concentración de triglicéridos (TG, mg/dL); colesterol total (CT, mg/dL) y HDL (mg/dl). Se extrajo el corazón y se determinó la oxidación de lípidos por el método de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Sustances mg Malón -dialdehído- MA/gr de tejido).

Resultados a partir de los cromatogramas (% área):

	Dieta S	Dieta M	Dieta C
Palmitico	27.79	16.66	10.51
Oleico	23.74	53.10	22.78
Linoleico	2.61	19.06	53.31
Linolenico	0.38	1.27	5.92
Relación ω3/ω6	1/8.7	1/15	1/9

Los resultados (Media±DE) fueron:

	Grupo S	Grupo M	Grupo C
TG	191.9±66.5*	98.1±49.7	94.1±37.7
CT	83.8±10.9	78.2±10.5	81.1±14.8
HDL	32.9±11	36.8±9.0	32.9±9.5
TBARS	0.35±0.10	0.36±0.11	0.26±0.08

\* (p<0.01)

Se observa aumento estadísticamente significativo en la concentración de los TG del grupo S, con respecto a C y M. No se encontraron diferencias en el resto de los parámetros. Estos hallazgos confirman resultados de otros autores que señalan que el consumo de dietas con alta proporción de grasas saturadas provoca aumento en la concentración de los triglicéridos séricos. Este aumento se observa aunque la relación ω3/ω6 se encuentra dentro de rangos adecuados. Esto resultados remarcan la incidencia de la alimentación sobre enfermedades crónicas. Financiado por UBA (B074)

**157 (413) RELACIÓN ENTRE EVENTOS DE VIDA Y NIVELES DE CORTISOL PLASMÁTICO CON SÍNDROME METABÓLICO EN VARONES ADULTOS.**

Fabre B.<sup>1</sup>; Grosman H.<sup>2</sup>; Nolzaco C.<sup>3</sup>; Fernandez Machulsky N.<sup>4</sup>; Mazza O.<sup>5</sup>; Gidron Y.<sup>6</sup>; Berg G.<sup>7</sup>

Hospital de Clínicas, FFYB. UBA<sup>1</sup>; Departamento de Bioquímica Clínica. FFYB. UBA<sup>2 4</sup>; Servicio de Urología. Hospital de Clínicas. UBA<sup>3 5</sup>; Free University of Brussels, Belgium<sup>6</sup>; Departamento de Bioquímica Clínica. FFYB. UBA<sup>7</sup>  
brfabre2000@yahoo.com.ar

El estrés psicosocial crónico y el bajo nivel socioeconómico se asocian con el incremento en el riesgo de obesidad abdominal (OA) y síndrome metabólico (SM). Estas asociaciones han sido especialmente observadas en humanos. Si bien existen evidencias del papel del eje hipotálamo-hipofiso-adrenal y del sistema nervioso en el desarrollo de OA y SM, el mecanismo preciso subyacente a la asociación estrés-SM es aún controversial. Más aun, es posible que las hormonas del estrés moderen esta relación. Objetivo: evaluar la asociación entre eventos de vida (EV) y cortisol, principal hormona del estrés, con el SM en hombres. Se estudiaron 148 hombres (57±6 años), seleccionados al azar en un rastreo poblacional, quienes completaron una encuesta de EV (Holmes-Rahe) en referencia a los últimos 5 años. En suero se midió cortisol, perfil lipídico-lipoproteico y glucosa. Se evaluaron parámetros biométricos. La población se dividió en con y sin SM (n=56 y n=92, respectivamente) según ATP-III. Los varones con SM reportaron mayor cantidad de EV que aquellos sin SM (p<0.05). Los eventos relacionados con factores económico-financieros, relacionaron directamente con TG/colesterol-HDL (r=0.15, p<0.05), marcador secundario de insulino-resistencia. Cuando se

dividió la población en aquellos con bajo (<14 µg/dl) ó alto nivel de cortisol ( $\leq 14\mu\text{g/dl}$ ), según la media poblacional, solo los varones con altos niveles de cortisol presentaron EV significativamente relacionados con SM ( $p<0.009$ ), independientemente de la edad y el índice de masa corporal ( $F(1,58) = 6.643, p = .013$ ). Los eventos de vida se relacionaron con SM, pero el cortisol parecería aumentar esta interrelación. El cortisol moderaría el posible efecto del estrés psicosocial sobre el SM.

**158. (424) COMPARACIÓN DE DOS MODELOS DE SÍNDROME METABÓLICO POR CONSUMO CRÓNICO DE FRUCTOSA EN RATAS**

Wallinger M.<sup>1</sup>; Linares L.<sup>2</sup>; Planells F.<sup>3</sup>; Balzer R.<sup>4</sup>; Vazquez M.<sup>5</sup>; Ricci C.<sup>6</sup>; Reyes-toso C.<sup>7</sup>

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>  
2 3 4 5 6 7

mwallinger@fmed.uba.ar

El consumo crónico de fructosa en las ratas produce síndrome metabólico con aumento de la presión arterial, alteración de la PTOG, hiperinsulinemia, y dislipemia. La administración de fructosa puede realizarse por medio de 2 modelos: en el agua de bebida o en la dieta. Nuestro objetivo fue determinar si existen diferencias entre ambos modelos. Para ello, se dividió a las ratas en tres grupos experimentales: control (C), recibió una dieta estándar y agua; fructosa en el agua (F10), recibió una dieta estándar y agua con fructosa al 10%; y fructosa en la dieta (F60), recibió una dieta con 60% de fructosa y agua. Se controló periódicamente el consumo de dieta y de líquido, y se midió la PTOG, la insulinemia, los lípidos plasmáticos y la presión arterial sistólica. El análisis de los resultados se realizó mediante un ANOVA. Al comparar cada uno de los modelos con el grupo control (F vs C) se encontró que, si bien en ambos casos se comprueba el desarrollo de síndrome metabólico, existen diferencias: 1- hipertensión: se observa en la primer semana en el grupo F60 ( $p < 0.001$ ) y recién en la octava (de similar magnitud), en el grupo F10 ( $p < 0.001$ ). 2- hiperinsulinemia se manifiesta tanto en la semana 6 como en la 14 para ambos modelos (F10 vs C, y F60 vs C  $p < 0.001$ ), con diferencias significativas en ambos tiempos entre los grupos F60 y F10 ( $p < 0.05$ ). 3- dislipemia: se afectan tanto la trigliceridemia como la colesterolemia en ambos grupos, en los mismos tiempos estudiados. 4- PTOG: para el grupo F10 se afecta a los 30 y 60 minutos a las 12 semanas y a los 15, 30 y 60 minutos a las 18 semanas. En cambio, en el modelo F60 se alteran todos los tiempos de la PTOG tanto en la semana 12 como en la 18 de la experiencia. Se puede concluir que ambos modelos producen síndrome metabólico ya que la causa del mismo sería la cronicidad del consumo de fructosa, pero que cuando se administra en altas dosis (F60) las alteraciones aparecen antes y/o con mayor intensidad.

**159. (632) ESTUDIO MOLECULAR DE LOS EFECTOS DE SOJA SOBRE TRIGLICÉRIDOS EN HÍGADO DE RATAS AL ADMINISTRAR DIETA HIPERCALÓRICA**

Razzeto G.<sup>1</sup>; Lucero López R.<sup>2</sup>; Escudero N.<sup>3</sup>; Giménez M.<sup>4</sup>  
Universidad Nacional de San Luis IMIBIO-SL-CONICET<sup>1</sup>  
2 3 4

grazzet@unsl.edu.ar

Estudios preliminares en nuestro laboratorio muestran que la harina de soja protege al hígado de rata de las alteraciones bioquímicas y morfológicas provocadas por dietas hipercalóricas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión génica de las principales enzimas involucradas en el metabolismo de triglicéridos en ratas alimentadas con dietas hipercalóricas elaboradas con distintas fuentes proteicas (soja/caseína). Los animales fueron divididos en dos grupos de 8 individuos cada uno: uno control con dieta AIN-93M y otro problema con dieta AIN-93M hipercalórica (34,15% 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. Los niveles de transcritos de acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), glicerol-3-fosfato-acil-transferasa (GPAT) y carnitin- palmitoil transferasa (CPT) fueron estimados en hígado mediante RT-PCR, empleando primers específicos. En el grupo HS en relación a HC, la expresión de FAS, GPAT y CPT mostró tendencia a disminuir en un 19,51%, 16,17% y 12,19% respectivamente. En el grupo HS respecto a CS, estos genes exhibieron down-regulation significativa ( $P<0,05$ ). ACC no presentó cambios estadísticamente significativos. La soja en presencia de una dieta hipercalórica disminuye la expresión de las enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos y también la expresión de CPT que interviene en los primeros pasos que inducen a la beta oxidación. Estos efectos son probablemente debido a alteraciones en la absorción intestinal por la presencia de la proteína y los compuestos bioactivos de la soja.

**160. (658) IMPACTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON POLIDEXTROSA SOBRE EL ESTADO MINERAL DEL FÉMUR DE RATAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS.**

Weisstaub A.<sup>1</sup>; Zuleta á.<sup>2</sup>; Abdala V.<sup>3</sup>; Gonzalez Chaves M.<sup>4</sup>; Orzuza R.<sup>5</sup>; Zeni S.<sup>6</sup>

Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Hospital de Clínicas, Sección Osteopatías Médicas.<sup>1</sup>; Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.<sup>2,3</sup>; Hospital de Clínicas, Sección Osteopatías Médicas.<sup>4 5 6</sup>  
arweiss@ffybu.uba.ar

*Introducción:* Los oligosacáridos no digeribles son fermentados por la flora colónica, provocando la disminución del pH intestinal y aumento de solubilidad y absorción de minerales. La disminución de estrógenos en la menopausia provoca pérdida del calcio del fémur, lo que podría prevenirse incorporando estos compuestos en la dieta que aumenten su biodisponibilidad. *Objetivo:* determinar el impacto de una dieta suplementada con polidextrosa sobre el estado mineral óseo del fémur en un modelo animal. *Materiales y métodos:* ratas adultas Wistar fueron ovariectomizadas bilateralmente. Desde To se alimentaron 60 días (Tf) con las siguientes dietas *ad libitum*: control AIN 1993 (DCF), fructooligosacáridos al 10%(DFOS), polidextrosa al 5%(DPDX). Entre To y Tf se determinaron los cambios en la densidad mineral en fémur (DMOf) y a Tf se midieron las características óseas en fémur derecho (peso, cenizas, materia orgánica y contenido de Ca y P). *Resultados:* DMOf (mg/cm<sup>2</sup>) fue mayor en DPDX y DFOS respecto DCF (54,3±14,6 vs 47,2 ±11,1 vs 21,5±16,8;  $p=0.0025$ ). DPDX presentó menor peso del fémur que DFOS y DCF (mg)(535,7±54,4 vs 691,5±97,0 vs 672,6±23,7;  $p=0.0031$ ) pero mayor contenido de cenizas (mg%)(64,8±1,8 vs 47,8±10,0 vs 44,1±2,5;  $p<0.0001$ ). El contenido de materia orgánica de DPDX fue menor que DFOS y DCF (mg%)(35,2±1,8 vs 57,2±1,5 vs 55,9±2,4;  $p < 0.0001$ ). La relación cenizas/materia orgánica fue mayor para DPDX que para DFOS y DCF (mg/mg)(1,85±0,14 vs 0,82±0,48 vs 0,79±0,07;  $p=0.0008$ ). El contenido de Ca fue mayor en DPDX que DFOS y DCF (mg%)(22,5±1,2 vs 17,7±2,2 vs 15,4±4,1;  $p=0.0024$ ), mientras que el de P fue sólo mayor para DPDX con respecto a DCF (mg%) (10,2±1,2 vs 9,2±1,0 vs 7,6±1,8;  $p=0.0339$ ). La relación Ca/P no presentó diferencias entre DPDX, DFOS y DCF (2,24±0,24 vs 2,04±0,22 vs 2,00±0,12). **Conclusiones:** el aumento de DMOf y contenido de Ca en el fémur de PDX indicaría un efecto positivo sobre la biodisponibilidad del calcio en la dieta.

UBACYT 20020090200037

**161. (673) EFECTO DEL CONSUMO DE DOS FUENTES DE AGMI SOBRE LA MASA OSEA Y PARAMETROS HISTOMORFOMETRICOS.**

Alsina E.<sup>1</sup>; Juiz N.<sup>2</sup>; Ferrerira Monteiro A.<sup>3</sup>; Gamba A.<sup>4</sup>; Lanata E.<sup>5</sup>; Zeni S.<sup>6</sup>; Macri E.<sup>7</sup>; Rodriguez P.<sup>8</sup>; Friedman S.<sup>9</sup>  
Cátedra de Bioquímica. Facultad de Odontología.UBA<sup>1 2</sup>  
3 4 5 6 7 8 9

alsinaestefania@yahoo.com.ar

En estudios previos demostramos la asociación entre el consumo de AGMI (ácidos grasos monoinsaturados) y la reducción de

la masa ósea en individuos con hipercolesterolemia. Sin embargo, no se sabe aún si esta relación es tan determinante en individuos sanos. **Objetivo:** Evaluar en ratas sanas, el efecto de los AGMI provenientes del aceite de oliva (AO) o aceite de girasol alto oleico (AGAO) sobre el contenido y densidad mineral óseas (CMO y DMO) y la histomorfometría estática de la tibia. Ratas Wistar macho (n=24) de 21±2d se dividieron en 3 grupos (C=control, AO y AGAO). Por 8 semanas, C recibió dieta AIN-97G, y AO y AGAO, una de las 2 fuentes de AGMI al 13% p/p + aceite de soja al 7%. A T8 se evaluó el peso corporal, col-T(mg/dL), CMO (g) y DMO (g/cm<sup>2</sup>) totales (DXA, Lunar DPX) y por histomorfometría de tibia se midió volumen óseo/volumen total (VO/VT), volumen adiposo/volumen total (Vad/VT). Resultados (media ± DE, p>0.05). A T8, P corporal > en C, 328.8 ±20.5 vs AO: 262.4±7.7 y AGAO: 265.5±18.2 g, p<0.01; CMO/P, C: 0.017±0.003, AO: 0.016±0.002, AGAO: 0.017±0.002, p>0.05; DMO g/cm<sup>2</sup> C: 0.276±0.009, AO: 0.257±0.003, AGAO: 0.252±0.005, p>0.05; VO/VT, AO: 31.5±4.6 >C:24.5±5.7>AGAO: 18.9 ±5.8 p>0.01; Vad/VT % AO <0.01. El mayor VO/VT en AO sumado a la arquitectura trabecular y al UBACyT O-008 y O-015.

**162. (676) INFLUENCIA DEL CONSUMO DE ACEITES VEGETALES SOBRE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 EPA Y DHA**

Suarez C.<sup>1</sup>; Pellegrino N.<sup>2</sup>; Zago V.<sup>3</sup>; Giacomino M.<sup>4</sup>; Ramos C.<sup>5</sup>; Schreier L.<sup>6</sup>; Friedman S.<sup>7</sup>; Macri E.<sup>8</sup>;  
Cátedra Bioquímica General y Bucal, Facultad Odontología UBA<sup>1,5,7,8</sup>; Cátedra de Bromatología. FFYB. UBA.<sup>2,4</sup>; Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas-infibioc. FFYB. UBA.<sup>3,6</sup> crissuarez007@yahoo.com.ar

Los ácidos grasos (AG) poliinsaturados EPA (eicosapentaenoico) y DHA (docosahexaenoico) son fundamentales durante el crecimiento para el desarrollo del sistema nervioso y visual, síntesis de prostanoides y prevención de ECV. Estos AG dietarios se obtienen directamente del pescado o bien a partir de un precursor, el ácido alfa-linolénico (ALA presente en vegetales). Sin embargo, actualmente es discutida la eficiencia de la conversión de ALA en EPA o DHA. **Objetivo:** investigar los niveles de lípidos y AG plasmáticos resultantes del consumo de dietas con diferente concentración de ALA. Sesenta ratas Wistar macho al destete fueron divididas en 6 grupos, según 2 variables: fuente (aceites de: maíz=M, pobre en ALA; soja=S, moderado en ALA y lino=L, rico en ALA) y concentración de grasa dietaria (7 o 20g %). Se determinaron los AG de las dietas (método GC) y se administraron ad libitum durante 4 semanas. A t=final se midió en plasma: porcentaje de AG (en pool, gr/100gr de lípidos); colesterol (COL), triglicéridos (TG) y COL-HDL (mg/dL). Estadístico UNIANOVA-SNK (p<0.05). Resultados (% , media±DE): Tanto al 7% como al 20%, el grupo L manifestó niveles considerables de EPA en plasma (4.1 y 2.3 vs 0% en S y M). Al contrario, S y M, mostraron niveles altos de ácido araquidónico (omega-6) 17 y 14% con dietas al 7 y 20% de grasa respectivamente. S y L además presentaron los mayores valores de DHA (3,9 y 3,6 %). COL (mg/dL): según fuente, L (76.1±9.3) fue igual a S (81.6±11.5) y < M (91.7±11.8) (p<0.001). COL-HDL: L (52.1±9.4) < M (58.9±12.1) y S (60.7±11.2) (p<0.05). TG: difirieron por concentración, mostrando los valores más bajos al 20% (p<0.001). **Conclusión:** Este estudio demuestra la conversión endógena de ALA en EPA y DHA cuando se aportan cantidades significativas en la dieta. Esto acredita el uso de aceite de lino para aumentar los niveles plasmáticos de AG omega-3 como fuente de lípidos de origen vegetal alternativa al pescado. UBACyT O-008.

**163. (679) EL ACEITE GIRASOL ALTO OLEICO ¿ES RECOMENDABLE EN LA HIPERCOLESTEROLEMIA NUTRICIONAL?**

Macri E.<sup>1</sup>; Zago V.<sup>2</sup>; Juiz N.<sup>3</sup>; Alsina E.<sup>4</sup>; Casavalle P.<sup>5</sup>; Suarez C.<sup>6</sup>; Scherier L.<sup>7</sup>; Rodriguez P.<sup>8</sup>; Friedman S.<sup>9</sup>  
Cátedra de Bioquímica. Facultad de Odontología. Uba<sup>1,3,4,5</sup> <sup>6,8,9</sup>; Lab Lípidos y Lipoproteínas-INFIBIOC. Fac Farmacia y Bioquímica. Uba.<sup>2,7</sup> vanesamacri@gmail.com

La dieta mediterránea rica en AGMI (ácidos grasos monoinsaturados), a base de aceite de oliva, se asocia a una baja incidencia de ECV. Esto llevó a generalizar el efecto de los AGMI y a sobreestimarlos cuando se trata de reemplazar la grasa saturada. **Objetivo:** Evaluar en ratas con hipercolesterolemia (HC), el efecto de los AGMI provenientes del aceite de oliva (AO) o aceite de girasol alto oleico (AGAO) sobre el perfil lipídico-lipoproteico y la distribución de la grasa corporal. Ratas Wistar macho (n=24) de 21±2d se dividieron en 3 grupos (C=control y E=experimental). C recibió dieta AIN-93G por 8 semanas, mientras que E consumió por 3 semanas (T3) una dieta aterogénica (DA= grasa saturada+colesterol) y luego por 5 semanas más (T8), reemplazaron a la grasa saturada por una dieta rica en aceite de oliva (AO) o aceite de girasol alto oleico (AGAO). A T3 se determinó col-T, y a T8, triglicéridos (TG), col-T, col noHDL, índice hepatosomático (IH), % grasa corporal total, % grasa epididimal y % perirrenal. Resultados (media±DE,p>0.05). A T3 se observó hipercolesterolemia en los grupos AO y AGAO (p<0.001). A T8, TG: C: 36.71±10.0 < AO: 62.39±7.34 y AGAO:63.84±7.79 mg/dL p<0.01; col-T, C: 63.6 ± 10.9 y AO: 68.4 ± 6.3 < AGAO: 202.7 ± 30.3 mg/dL, p<0.0001; col-noHDL, C: 21.8 ± 7.6 y AO: 24.4 ± 4.4 < AGAO: 172.1 ± 26.0, mg/dL p<0.001; IH en g%, C: 3.00 ± 0.29 < AO: 5.93 ± 0.46 y AGAO: 5.84 ± 0.62, p<0.01; % grasa-T, C: 10.3 ± 0.6 < AO: 14.4 ± 1.7 y AGAO: 14.2± 0.89 p<0.01; % grasa epididimal, C: 1.01±0.12 y AO: 1.09±0.33 < AGAO:1.33±0.43, p<0.01; %grasa perirrenal, C: 0.91 ± 0.18 < AO:1.23±0.36 y AGAO: 1.11 ± 0.56, p<0.01. El perfil lipídico lipoproteico y el contenido de grasa visceral por el consumo de dietas ricas en AGAO se asocian a factores de riesgo de ECV. UBACyT O-008 y O-015.

**FISIOLOGIA 1 Y NEFROLOGIA 1**

**164. (51) EFECTOS DEL AMILORIDE SOBRE LA CAPTACION DE AGUA EN ANFIBIOS COMO MODELO DE BALANCE HIDROSALINO**

Iurman M.<sup>1</sup>; Muzio R.<sup>2</sup>  
Laboratorio de Biología del Comportamiento, IBYME-CONICET<sup>1,2</sup> marianaiurman@yahoo.com.ar

La diversidad de ambientes que habitan los anfibios, así como la baja resistencia de su piel a la pérdida de agua, los convierten en un modelo adecuado para la investigación de mecanismos osmorreguladores. A fin de prevenir la deshidratación, los anfibios han desarrollado diferentes adaptaciones que les permite mantener el equilibrio hidrosalino. La rehidratación a través de la piel disminuye cuando se bloquean los canales de sodio sensibles a amiloride. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos del amiloride sobre la recaptación de agua *in vivo* en el sapo común, *Rhinella arenarum*, en diferentes estados de hidratación y con dos soluciones externas de NaCl. Exp. 1: se usaron 36 sapos, divididos en 6 grupos: G100 y G100-Amiloride (ambos al 100% del peso estándar, PS); G90 y G90-Amiloride (al 90% del PS); G80 y G80-Amiloride (al 80% del PS). Todos los grupos fueron colocados 180 minutos en un recipiente con 150ml de: i) NaCl 115mM, o ii) NaCl 115mM + Amiloride 0,5mM. Los animales fueron pesados cada 15 minutos. Los resultados indican que la recaptación de agua aumenta con la deshidratación. Además, amiloride disminuye significativamente la recaptación de agua al 100% y 90% de hidratación, mientras que a 80% no hay diferencias. Así, el efecto de amiloride sobre la recaptación de agua depende del estado inicial de hidratación de los animales. Exp. 2: se usaron 36 animales divididos en los mismos 6 grupos y se siguió el protocolo antes descripto, excepto variando la concentración de NaCl a 300mM NaCl (solución levemente hipertónica con respecto al plasma de los sapos, donde no ganan ni pierden peso). Los resultados indican que los únicos grupos que poseen diferencias significativas son G100 y G80-Amiloride. Estos resultados sugieren que no habría efecto del amiloride cuando se coloca a los animales agudamente en una solución levemente hiperosmótica. Resta aún estudiar el mecanismo por el cual amiloride no tiene efecto a una mayor deshidratación (80% del PS).



**165. (150) EFECTO DE LA HIPOXIA HIPOBÁRICA CRÓNICA SOBRE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN CORTEZA CEREBRAL E HIPOCAMPO DE RATA.**

La Padula P.<sup>1</sup>; Costa L.<sup>2</sup>; Czerniczyniec A.<sup>3</sup>; Lores Arnaiz S.<sup>4</sup>; Bustamante J.<sup>5</sup>

*Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2</sup>; Laboratorio de Radicales Libres en Biología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>3 4 5</sup>*

*pablolapa@hotmail.com*

En trabajos previos encontramos que un aumento de la NOS mitocondrial participaría en la aclimatización del miocardio a la hipoxia hipobárica a través del efecto del NO sobre la función mitocondrial. Teniendo en cuenta que el cerebro es particularmente sensible a la deficiencia de oxígeno, el presente trabajo tuvo por objeto el estudio de la hipoxia sobre la función mitocondrial en la corteza cerebral y el hipocampo. Ratas Wistar fueron sometidas a una altura simulada de 5000 m (53,8 kPa = 404 mmHg) en una cámara de hipopresión (H), mientras que el mismo número de animales permanecieron como controles (C) a presión atmosférica ambiental (101,3 kPa = 760 mmHg). Al cabo de un mes, las ratas se sacrificaron y se aisló la fracción mitocondrial de corteza e hipocampo. El consumo de oxígeno, determinado con un respirómetro de alta resolución, fue en hipocampo (natg/min. mg proteína): C  $10.3 \pm 0.1$  y H  $5.5 \pm 0.5$  en estado 4 ( $p < 0.05$ ), y C  $27 \pm 3$  y H  $16 \pm 1$  en estado 3 ( $p < 0.05$ ), manteniéndose un adecuado control respiratorio. En corteza no se observaron cambios significativos. El potencial transmembrana mitocondrial, evaluado por citometría de flujo (sonda potenciométrica DiOC6), y la producción mitocondrial de peróxido de hidrógeno, medida por el método espectrofluorométrico (escopoletina-HRP), no mostraron diferencias significativas en los tejidos estudiados. La expresión de NOS se analizó por el método de Western blot, observándose un aumento significativo en la fracción mitocondrial H en el hipocampo. Los resultados sugieren que este aumento podría estar relacionado con la disminución en el consumo de oxígeno observado en este tejido. La función mitocondrial y su regulación por NO, formaría parte central en los mecanismos reguladores y vías de señalización inducidos por niveles bajos de oxígeno durante la hipoxia crónica.

**166. (291) REGULACIÓN HORMONAL DE LA EXPRESIÓN DE NHERF1 EN EL COLON NORMAL DE RATA**

Cuello Carrión F.<sup>1</sup>; Troncoso M.<sup>2</sup>; Guiñazu E.<sup>3</sup>; Valdez S.<sup>4</sup>; Fanelli M.<sup>5</sup>; Ciocca D.<sup>6</sup>; Kreimann E.<sup>7</sup>

*Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo IMBECU CCTMENDOZA CONICET<sup>1 2 3 5 6</sup>; Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo IMBECU CCTMENDOZA CONICET; Instituto de Ciencias Básicas Uncuyo Mendoza<sup>4</sup>; Comisión Nacional de Energía Atómica Cnea Buenos Aires<sup>7</sup>*

*dcuello@mendoza-CONICET.gob.ar*

En líneas celulares de cáncer de mama, el gen del factor regulador del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  tipo 1 (NHERF1) está regulado a nivel transcripcional por los estrógenos. Los niveles de expresión de la proteína se correlacionan con la presencia de receptores de estrógenos y el efecto es bloqueado por anti-estrógenos. Sin embargo, hay información limitada respecto a la regulación de NHERF1 por estrógenos en el tejido epitelial del colon. Además, la proteína NHERF1 tiene un rol importante en el mantenimiento de la ultraestructura del intestino. Las ratas con deficiencia de NHERF1 mostraron defectos en las microvellosidades intestinales, y también alteraciones moleculares en las proteínas de las membranas celulares del borde en cepillo. Estudiamos comparativamente la expresión de NHERF1 en colon normal y útero de ratas Wistar vírgenes (N=30) durante el ciclo estral, para entender la regulación por estrógenos de los niveles de expresión y la localización celular de NHERF1 en condiciones fisiológicas. Para realizar este estudio se emplearon técnicas inmunohistoquímicas, western blot y radioinmunoanálisis. Encontramos que la expresión de NHERF1 en colon de rata durante el ciclo estral es modificado

por los niveles de estrógenos: la máxima expresión de NHERF1 fue observada durante las etapas proestro y estro, y los niveles disminuyeron significativamente en el diestro 1 ( $p < 0.0071$ ). En el útero de rata, NHERF1 se expresó en la región apical del epitelio luminal y en las glándulas en todas las fases del ciclo estral y fue independiente del grado de proliferación. Nuestros resultados mostraron que la expresión de NHERF1 en el colon es regulada por los estrógenos durante el ciclo estral de la rata.

**167. (292) CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENTRE LA PMCA Y EL CITOESQUELETO DE ACTINA**

De La Fuente M.<sup>1</sup>; Rossi J.<sup>2</sup>; Ferreira Gomes M.<sup>3</sup>; Vanagas L.<sup>4</sup>; Dalghi M.<sup>5</sup>; Mangialavori I.<sup>6</sup>

*IQUIFIB<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*

*candelariadelafuente@yahoo.com*

Hemos demostrado que la actina monomérica (G) incrementa la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA). La actina filamentosa (F) inhibe la actividad (Vanagas y col., 2007, de la Fuente y col., 2010). La activación por actina G es 5 veces mayor que el control en ausencia de actina. La inhibición con actina F progresa hasta anular la actividad. La relación actina/PMCA también es importante: la  $K_{0.5}$  para la relación actina G/PMCA fue de  $135.2 \pm 9.68$  y la  $K_{0.5}$  para actina F/PMCA de  $37.23 \pm 8.3$ . Mediante cosedimentación mostramos que la actina F se uniría específicamente a la PMCA (de la Fuente y col., 2010). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción conformacional entre actina y PMCA, como también corroborar la unión de otras variantes de actina. Para ello utilizamos PMCA purificada de eritrocitos humanos, actina de músculo esquelético y actina no muscular. El cambio conformacional se determinó mediante el reactivo fotoactivable [<sup>125</sup>I]TID-PC/16. Esta sonda permite seguir cambios de la región transmembrana de PMCA (Mangialavori y col., 2009, 2010) y caracterizar los conformeros inducidos por los moduladores. Los ensayos de cosedimentación mostraron que la isoforma no muscular de actina F se uniría específicamente a PMCA como ocurre con la variante muscular. Se marcó la PMCA con [<sup>125</sup>I]TID-PC/16 en presencia de actina G, actina F y en presencia de los activadores ácido fosfatídico y calmodulina y se determinó la incorporación específica del reactivo. Los resultados muestran que actina-G lleva a la PMCA al conformero E<sub>1</sub>A en forma similar a los obtenidos con los activadores y a medida que la actina polimeriza la lleva al conformero E<sub>1</sub>I en forma semejante al que se obtiene con  $\text{Ca}^{2+}$  solo. La actina F revierte el efecto de calmodulina y parcialmente el de ácido fosfatídico. Estos resultados son consistentes con que actina G llevaría a PMCA a una conformación activada y a medida que polimeriza a una conformación inactiva de la bomba. Con subsidios de ANPCYT, CONICET y UBA.

**168. (311) MODIFICACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA LÍPIDO: PROTEÍNA CON EL ESTADO DE ACTIVACIÓN EN DIFERENTES ISOFORMAS DEL TRANSPORTADOR DE  $\text{Ca}^{2+}$  DE MEMBRANA PLASMÁTICA.**

Mangialavori I.<sup>1</sup>; Corradi G.<sup>2</sup>; De La Fuente M.<sup>3</sup>; Rinaldi D.<sup>4</sup>; Adamo H.<sup>5</sup>; Rossi J.<sup>6</sup>

*Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas IQUIFIB<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*

*icmangialavori@yahoo.com.ar*

La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática (PMCA) transporta  $\text{Ca}^{2+}$  contra el gradiente electroquímico a partir de la hidrólisis de ATP. Se han identificado varias isoformas tejido específicas. La isoforma 4b es mayoritaria en eritrocitos humanos y la 2b se encuentra especialmente en tejido nervioso. La PMCA es regulada a través de un mecanismo de autoinhibición. El principal modulador de la PMCA es la calmodulina (CaM) y su unión a la bomba aumenta la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa concomitante con el cambio conformacional (desde E<sub>1</sub>I hacia E<sub>1</sub>A). El mecanismo de autoinhibición de la forma 4b es más eficiente que el de la isoforma 2b, por lo que la isoforma 2b muestra mayor actividad en ausencia de CaM y mayor sensibilidad a la activación por CaM que la iso-

forma 4b. En este trabajo comparamos el número de lípidos en estrecho contacto con la región transmembrana (anulares) de las isoformas h4b y r2b de la PMCA sobre-expresadas y purificada de *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello se incorporó un análogo fotoactivable de fosfatidilcolina ( $[^{125}\text{I}]\text{TID-PC}/16$ ) a micelas mixtas de  $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$ -PC en las que se reconstituye la proteína y luego de la fotólisis, se evaluó la incorporación específica del reactivo y se determinó la estequiometría lípido:proteína en diferentes conformaciones de ambas isoformas. La estequiometría lípido-proteína fue: 19 (ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ), 29 (presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y 14 (presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM) y, 18 (ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ), 23 (presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y 17 (presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM) moléculas de lípidos por molécula de proteína para la h4b y la r2b, respectivamente. La titulación del cambio conformacional muestra que la afinidad por CaM es 30 veces mayor en la isoforma r2b. Estos resultados muestran que el número de lípidos anulares varía entre isoformas de la PMCA y depende del estado de activación. Con subsidios de ANPCYT, CONICET y UBA.

**169. (579) EFECTO DE LA RADIACIÓN UV SOBRE SEBOCITOS DE LA GLÁNDULA SEBÁCEA HUMANA. ENZIMAS LIPOGÉNICAS Y MARCADORES DE INFLAMACIÓN.**

Zurvarra F.<sup>1</sup>; Kerner N.<sup>2</sup>; Hagelin K.<sup>3</sup>

Fundación Pablo Cassará<sup>1 2 3</sup>

fzurvarra@fundacioncassara.org.ar

Las observaciones clínicas indican un papel controversial de la radiación solar en el desarrollo del acné. Una exposición crónica a la luz solar causa una hiperplasia en la glándula sebácea de la cara, siendo este además síntoma de fotoenvejecimiento de la piel en humanos. Esto correlaciona con un aumento en la proliferación y el número de sebocitos y con la síntesis de lípidos. Estos hallazgos señalan al UV como posible factor de agravamiento de esta patología cutánea. A su vez se ha descrito que los productos de oxidación de los lípidos del sebo por acción del UV (peróxidos de escualeno, colesterol y triglicéridos) inducirán la producción de mediadores proinflamatorios en queratinocitos así como el daño de la función de barrera de la piel. En conjunto, los efectos del UV tanto sobre la vía inflamatoria como sobre la modulación de las enzimas lipogénicas, son fenómenos involucrados en la etiología del acné. Sobre esta base, estudiamos los efectos de la radiación UVB sobre la lipogénesis en las células de glándula sebácea humana en cultivos primarios de glándulas de folículo piloso y en la línea celular SZ95 de sebocitos faciales. El análisis de la expresión de los genes se realizó luego de la exposición de los cultivos a dosis subletales de UVB mediante el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) y se caracterizó el contenido lipídico mediante coloración con Oil Red O. Los resultados indicaron un incremento en la expresión de moléculas proinflamatorias (IL-1 alfa, IL-1 beta; Cox-2; TNF-alfa) y de las enzimas lipogénicas (FASN, SREBP1c; Escualeno Sintasa) al igual que un incremento en el contenido de lípidos luego del tratamiento con UV-B. En base a estos resultados, los cultivos primarios de glándula sebácea humana constituyen un modelo *in vitro* útil para el análisis de la relación entre los eventos inflamatorios desencadenados por el UV y la función lipogénica de estas células, en relación con el acné.

**170. (806) BETA CICLODEXTRINA Y PERMEABILIDAD AL AGUA DE LA VEJIGA DEL SAPO**

Orce G.<sup>1</sup>; Castillo G.<sup>2</sup>; Rojas C.<sup>3</sup>

Instituto de Fisiología Facultad de Medicina UNT; Departamento de Fisiología y Neurociencia INSIBIO UNT CONICET<sup>1 2 3</sup>

orcegap@yahoo.com

La permeabilidad de las membranas biológicas al agua es crucial para la vida. El colesterol (COL), componente integral de las membranas biológicas, está relacionado con receptores hormonales y otras estructuras importantes en la regulación de esa permeabilidad, y su remoción modifica la matriz lipídica de la membrana. Se estudió los efectos de la exposición de la vejiga del

*Bufo arenarum* a la beta ciclodextrina (BCD), agente secuestrante del COL, sobre el flujo osmótico de agua (Jw), medido por pesada. La BCD en contacto 40 min con la cara basolateral del órgano inhibió significativamente (Inh= 43%,  $P<0.01$ , n= 7) el aumento de Jw debido a exposición de la misma cara a la ocitocina (OT), que permeabiliza la membrana uniéndose a receptores específicos e insertando acuaporinas (AQP) en la membrana apical. Igual exposición de la cara apical a la BCD causó una inhibición aún mayor (Inh = 80%,  $P<0.01$ , n= 9) del efecto de la nistatina (NIS)(que forma canales acuosos uniéndose con el COL de la membrana). Idéntica maniobra no inhibió la respuesta a la OT (n= 8); sólo una exposición apical más prolongada (160 min) logró hacerlo, pero en menor grado (Inh= 16%,  $P<0.05$ , n= 6). El efecto inhibitorio de la BCD basolateral sobre la OT es coherente con la modificación de su receptor, que en otros tejidos ha mostrado ser muy sensible al ambiente lipídico que lo rodea. A su vez, la menor formación de complejos COL-NIS por caída del COL de la membrana apical explicaría la inhibición de la respuesta a la NIS. En ambos casos, se trata de COL de membranas expuestas continuamente al medio, a diferencia de lo que sucede con el COL de las vesículas que contienen las AQP, las que estarían expuestas a la BCD sólo a partir de su fusión con la membrana apical. Es por ello concebible que la modificación de la membrana apical requiera una exposición más prolongada (y mayor extracción de COL) antes de afectar el proceso de fusión y/o exposición de nueva membrana involucrado en la respuesta.

**171. (25) EXCRECIÓN URINARIA Y EXPRESIÓN RENAL DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS 5 (OAT5) EN RATAS CON DAÑO RENAL ASOCIADO A CALCIFICACIÓN DISTROFICA**

Hazelhoff M.<sup>1</sup>; Bulacio R.<sup>2</sup>; Torres A.<sup>3</sup>

Farmacología Fac Cs Bioq y Farm UNR<sup>1 2</sup>; Farmacología Fac Cs Bioq y Farm UNR; CONICET<sup>3</sup> mariaherminiahazelhoff@yahoo.com.ar

Oat5 es un transportador de aniones orgánicos que se expresa exclusivamente en membrana apical de túbulo proximal. En este trabajo se evaluó la excreción urinaria y la expresión renal de Oat5 en un modelo experimental de calcificación distrófica. El mismo se obtuvo administrando a ratas Wistar macho adultas una dosis de Vitamina D<sub>3</sub> (300000 UI/kg, p.c, i.m) 10 días antes del experimento (Grupo T, n=4). Se procesó en forma paralela un grupo control (C, n=4). Se evaluó la excreción urinaria de Oat5 (Oat5or) mediante Western blotting en comparación con parámetros indicativos de daño renal como actividad de fosfatasa alcalina (For) y proteínas totales (Pror) en orina (relacionando estos tres valores con los de creatinina urinaria, creatininemia (Crp), uremia (Up) e histología. Además, se estudió la expresión renal de Oat5 en homogenados totales (H) y en membranas apicales (M) mediante Western blotting e inmunohistoquímica. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM y se analizaron estadísticamente mediante una *t de Student* no apareada ( $*p<0,05$ ). Los estudios histológicos revelaron en los riñones del grupo T alteraciones tubulares y glomerulares. Los resultados de inmunohistoquímica corroboraron los obtenidos por Western blotting.

Oat5or (%)	For (mUI/mg Cr)	Pror (mg/mg Cr)	Crp (mg/L)	Up (g/L)	Oat5 H (%)	Oat5 M (%)
C 100 $\pm$ 5	267 $\pm$ 31	2,05 $\pm$ 0,20	6,21 $\pm$ 0,50	0,48 $\pm$ 0,06	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 2
T 111 $\pm$ 19*	222 $\pm$ 36	1,70 $\pm$ 0,50	6,79 $\pm$ 0,80	0,53 $\pm$ 0,06	154 $\pm$ 5*	111 $\pm$ 3*

El aumento de Oat5or en asociación con el incremento de su abundancia en homogenados, y en menor proporción en membranas en el grupo T, indicaría un incremento en la liberación de la proteína hacia la luz tubular. El aumento de Oat5or se observa en este modelo de calcificación distrófica en asociación con daño histológico del riñón y cuando aún no se presentan modificaciones en los otros parámetros tradicionalmente utilizados para evaluar función renal. Esta última observación sugeriría a Oat5 como posible biomarcador de daño renal.

**172. (237) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN NEONATAL DE BOSENTAN A RATAS HEMBRAS SOBRE LA EXPRESIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DE LA OXÍDO NITRICO SINTASA**

Albertoni Borghese M.<sup>1</sup>; Ortiz M.<sup>2</sup>; Balonga S.<sup>3</sup>; Lavagna A.<sup>4</sup>; Filipuzzi A.<sup>5</sup>; Kapoble G.<sup>6</sup>; Majowicz M.<sup>7</sup>  
*Catedra de Biología Celular y Molecular - Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
 mfalber@ffybu.uba.ar

Bosentan (B) es un antagonista competitivo no selectivo de los receptores de endotelina (ET) que puede administrarse por vía oral y parenteral. Actualmente se usa como herramienta terapéutica en algunas patologías en las que está implicado el sistema de ET. El óxido nítrico (NO) cumple un importante papel en la fisiopatología renal y vascular y posee una estrecha relación con ET, dado que ésta es uno de los principales moduladores de la óxido nítrico sintasa (NOS). El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de NOS I y NOS III en corteza (Co), médula (M) y papila (P) renal de ratas Sprague Dawley hembras de 70 días, fueron tratadas con B por vía oral (20 mg/Kg/día) desde el día 1 al 20 postnatal. Los controles (C) recibieron un volumen equivalente de agua destilada. Se midió la expresión de NOS I y NOS III mediante western blot normalizando con respecto al control. La expresión de NOS III disminuyó en las hembras tratadas con B en Co, M y P (Co: 0,74±0,10\*; M: 0,68±0,01\*; P: 0,74±0,08\*) vs su control (Co: 1,09±0,07; M: 1,08±0,15; P: 1,05±0,07). La expresión de NOS I disminuyó en las hembras tratadas con B sólo en Co (0,76±0,06)\* vs su control (1,15±0,11). Además, en las ratas tratadas con B disminuyó la excreción urinaria de metabolitos del NO (155,9±23,2 mmol/24 hs/100g)\* vs el control (248,9±24,6). En los animales tratados con B no se modificaron el peso corporal, el peso renal ni la diuresis; pero disminuyó la excreción urinaria de Na<sup>+</sup> vs el control (0,355±0,030\* vs 1,015±0,310 mEq/24hs/100g). \*p<0,05 vs C; n=6. La menor expresión de NOS III en Co, M y P y de NOS I en Co de las ratas tratadas con B se traduce en una menor producción de NO y en una menor excreción de Na<sup>+</sup>. Dado que el NO regula el transporte de sodio inhibiendo diferentes transportadores a lo largo del nefrón, el tratamiento con B durante el periodo postnatal alteraría estos mecanismos regulatorios, pudiendo llevar a una mayor retención de sodio en la vida adulta.

**173. (525) EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LA AQP2 Y DE LA ISOFORMA NHE2 DEL INTERCAMBIADOR NA/H EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS RENALES**

Rivarola V.<sup>1</sup>; Dvorkin J.<sup>2</sup>; Flamenco P.<sup>3</sup>; Fernández J.<sup>4</sup>; Ford P.<sup>5</sup>; Capurro C.<sup>6</sup>  
*Laboratorio Biomembrana Departamento Fisiología y Biofísica Facultad Medicina UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
 vrvivarola@yahoo.com

El control del pH intracelular (pH<sub>i</sub>), regulado por los intercambiadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE) y Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (AE), es necesario para una correcta modulación de los procesos de proliferación así como de muerte celular y, por lo tanto, de la homeostasis en el número de células. Por otra parte, nuestros estudios previos en células renales mostraron que la expresión del canal de agua acuaporina 2 (AQP2) induce una aceleración del ciclo celular mediada por un acortamiento del tránsito a través de las fases S y G2 del mismo. Dados los reportes que muestran que la expresión de NHE tiene un efecto similar sobre el ciclo celular, el objetivo de este trabajo fue investigar la posible relación de estos dos fenómenos. Para ello se utilizaron dos líneas celulares de túbulo colector cortical con características bien definidas: WT-RCCD, la cual no expresa AQP2 y AQP2-RCCD, que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical, y se realizaron estudios a nivel funcional (pH<sub>i</sub> y tasa de proliferación) y molecular (western blot). Los resultados muestran que en condiciones control las células que expresan AQP2 poseen aumentada tanto la expresión de NHE2 (WT vs. AQP2 en unidades arbitrarias: 0,09 ± 0,09 vs. 0,39 ± 0,04, p < 0,001, n=5), como su actividad (WT vs. AQP2 ΔpH/Δt, 0,05 ± 0,01 vs. 0,10 ± 0,01, p < 0,05, n=7) resultando en un pH<sub>i</sub> significativamente mas alcalino (WT vs. AQP2 7,43 ± 0,05 vs. 7,60 ± 0,04, p

< 0,05, n=16). Paralelamente la inhibición farmacológica con HOE de la isoforma NHE2 reduce la proliferación solo en las células que expresan AQP2 (AQP2 control vs. HOE, número de células x 10<sup>5</sup>; 11 ± 1 vs 7,6 ± 0,7, p<0,05, n=10). No se observaron cambios en ninguno de estos parámetros para la isoforma NHE1. En conjunto estos resultados sugieren que en presencia de AQP2 existe una modulación diferencial de la isoforma NHE2 lo que sería relevante en la activación de la proliferación.

**174. (588) EFECTO DE LA L-ARGININA SOBRE EL SISTEMA DEL ÓXIDO NÍTRICO Y LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINA-2 EN MEDULA RENAL DE RATAS CON DIABETES EXPERIMENTAL**

Ortiz M.<sup>1</sup>; Albertoni Borghese M.<sup>2</sup>; Balonga S.<sup>3</sup>; Vidal N.<sup>4</sup>; Majowicz M.<sup>5</sup>  
*Catedra de Biología Celular y Molecular - Facultad de Farmacia y Bioquímica-UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
 mortiz@ffybu.uba.ar

Existen resultados contradictorios sobre la producción, biodisponibilidad y actividad del óxido nítrico (NO) renal en la diabetes. Además, existen evidencias que establecen una relación entre el NO y la expresión de acuaporina 2 (AQP2). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la L-arginina (L-arg), sustrato de la óxido nítrico sintasa (NOS), sobre la producción de NO, la actividad de NADPH diaforasa y el patrón de expresión de AQP2 en médula (M) renal de ratas con diabetes experimental. Se utilizaron ratas Wistar machos divididas en 3 grupos: diabéticas (D) por inyección i.p. de estreptozotocina (70mg/kg) durante 4 días; diabéticas tratadas con L-Arg (D+A) administrada en el agua de bebida (620 mg/kg/día) y controles (C), que sólo se inyectaron con buffer citrato. Se determinó: excreción de nitratos y nitritos (NOx), actividad de NADPH diaforasa en diferentes estructuras de M renal y la expresión de AQP2 en homogenatos de M renal por Western Blot, expresando la DO de las bandas como % respecto del control, tomando éste como el 100%. En D+A aumentó significativamente la excreción urinaria de NOx (57,2±13,3 nmoles/24 hs/100g)\* # respecto de C (30,0±4,6) y de D (22,8±13,3). En D disminuyó la actividad de NADPH diaforasa respecto de C (0,142±0,008 vs 0,171±0,003) a nivel de los túbulos colectores (TC) de M, siendo esto revertido en D+A (0,276±0,007)\*\*\*###. La expresión de AQP2 disminuyó en D (65,93±6,01)\* vs C (100,00±1,97); siendo este efecto revertido en D+A (94,88±7,54)#. \* p<0,05 vs C; # p<0,05 vs D; \*\*\* p<0,01 vs C; ### p<0,01 vs D. La administración de L-Arg aumentó la producción sistémica de NO y la actividad de NOS medida como actividad de NADPH diaforasa en los TC de M. El tratamiento con L-Arg revirtió la disminución de la expresión de AQP2 observada en D. Es posible entonces que la disminución de AQP2 observada en la M renal de los animales D se deba, al menos en parte, a la disminución de la producción de NO.

**175. (618) EL NEBIVOLOL EJERCE UN EFECTO PROTECTOR RENAL EN RATAS DIABÉTICAS ZUCKER**

Giani J.<sup>1</sup>; Cao G.<sup>2</sup>; Madalena L.<sup>3</sup>; Pons R.<sup>4</sup>; Muñoz M.<sup>5</sup>; Angerosa M.<sup>6</sup>; Dominici F.<sup>7</sup>; Toblli J.<sup>8</sup>  
*IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 4 5 7</sup>; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina<sup>2 3 6 8</sup>*  
 jorgegiani@hotmail.com

Los â-bloqueantes tradicionales son efectivos para el tratamiento de la hipertensión arterial, aunque su uso en pacientes diabéticos es limitado debido a posibles efectos adversos en el metabolismo de glúcidos y lípidos. Sin embargo, los â-bloqueantes vasodilatadores, como el nebivolol, no están asociados con efectos metabólicos negativos. El objetivo de este estudio fue determinar si el tratamiento crónico (6 meses) con nebivolol es más efectivo que el atenolol para controlar el deterioro funcional y morfológico del riñón en un modelo animal de diabetes mellitus tipo 2. Se utilizaron ratas diabéticas Zucker (ZDF; n=8) macho de 4 meses y ratas Zucker control (LZR). Grupo ZDF sin tratamiento; grupo ZDF con nebivolol (ZDF+N; 10mg/kg.día); grupo ZDF con atenolol (ZDF+AT; 100mg/kg.día); y grupo LZR sin tratamiento. Luego del

tratamiento, los riñones se extrajeron para evaluar las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), la relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) y la actividad de catalasa y superóxido dismutasa (CuZnSOD). La disminución de la presión arterial sistólica (método indirecto) fue similar en ZDF+N y ZDF+AT. El grupo ZDF+N mostró una disminución de la trigliceridemia y la colesterolemia, junto con aumento del clearance de creatinina y disminución de la proteinuria, aunque no se alcanzaron los valores de LZR. En el grupo ZDF+AT no se halló una mejoría de los parámetros anteriormente mencionados. Por microscopía óptica se observó que ZDF+N mostró una mayor reducción de la glomeruloesclerosis y la fibrosis renal que ZDF+AT. Los efectos observados en ZDF+N se asociaron a un menor estrés oxidativo (disminución de TBARS y aumento de la relación GSH/GSSG y de la actividad de catalasa y CuZnSOD), mientras que ZDF y ZDF+AT no mostraron diferencias a este nivel. Concluimos que, a diferencia del atenolol, la mejoría del perfil lipídico y el efecto antioxidante del nebivolol ejercerían un rol protector en el desarrollo de nefropatía diabética.

**176. (636) DIMORFISMO SEXUAL EN LA FUNCIÓN Y ESTADO OXIDATIVO RENAL EN UN MODELO DE OBESIDAD HIPOTALÁMICA INDUCIDO POR GLUTAMATO MONOSÓDICO (GMS).**

Mahieu S.<sup>1</sup>; Azogay V.<sup>2</sup>; Millen N.<sup>3</sup>; Contini M.<sup>4</sup>  
 Facultad Bioquímica y Cs Biológicas.UNL<sup>1 2 3 4</sup>  
 smahieu@fbc.unl.edu.ar

Las ratas tratadas con GMS neonatal presentan obesidad, factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión, aumento en la retención de sodio y daño renal. Se estudiaron aspectos de la función renal y el estado oxidativo en ratas Wistar de ambos sexos. La obesidad hipotalámica fue inducida por la administración postnatal (4 mg/g peso) de GMS: Machos (M) y Hembras (H) GMS. Los grupos controles MC y HC se trataron con S.Fisiol. Los cambios metabólicos (ganancia de peso, índice de Lee (IL), test de tolerancia a la glucosa y a la insulina), función renal (clearance de inulina y PAH, EF%Na y agua y capacidad para concentrar la orina) y el estado oxidativo: Lipoperoxidación (LPO), glutatión (GSH), actividad de glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y catalasa (Cat) fueron estudiados a los 7 meses de edad. El IL confirmó el desarrollo de obesidad, que fue acompañado por intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina en ambos sexos. Solo en MGMS aumentó la incorporación de alimento y agua, sin cambios en la excreción de Na o diuresis. Los parámetros hemodinámicos de la función renal solo se afectaron en MGMS. VFG(ml/min.g.riñón): MC:0,9±0,1;MGMS:0,6±0,05\*HC:0,59±0,08 ;MGMS:0,61±0,03.CIPAH(ml/min.g.riñón): MC:3,9±0,03; MGMS: 3,1±0,12\*; HC: 2,1±0,02; HGMS: 2,2±0,06. No se observaron cambios en EF%Na, H<sub>2</sub>O, ni en la relación U/P en los grupos tratados con GMS respecto a sus controles. Solo MGMS presentaron cambios en su estado oxidativo: reducción del contenido de GSH, con aumento de la actividad de sus enzimas relacionadas (GPx y GR), sin cambios en la LPO ni en la actividad de CAT. La reducción de VFG y CIPAH en MGMS podría estar vinculada en parte a los cambios en el estado oxidativo renal que acompañaría las alteraciones metabólicas observadas. En HGMS, la presencia de estrógenos con su capacidad antioxidativa permitiría explicar la diferencia sexual observada en el efecto prooxidante del GMS sin cambios en la función renal ni en el estado oxidativo a pesar de la presencia del síndrome metabólico.

**177. (792) CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA TUBULAR A STX2 EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN RATAS**

Ochoa F.<sup>1</sup>; Lago N.<sup>2</sup>; Gerhardt E.<sup>3</sup>; Oltra G.<sup>4</sup>; Ibarra C.<sup>5</sup>; Zotta E.<sup>6</sup>  
 Laboratorio de Fisiopatología; Depto Fisiología; Facultad de Medicina, UBA<sup>1 3 4 5 6</sup>; Centro de Patología, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina<sup>2</sup>  
 fochoa@inbox.com

**Introducción:** En la Argentina, el síndrome urémico hemolítico (SUH) constituye la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en los niños. **Objetivos:** El objetivo de nuestro estudio fue analizar la respuesta tubular inmediata bajo el efecto de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) en un modelo experimental de rata con SUH. **Métodos:** Las ratas adultas Sprague-Dawley fueron inyectadas por vía intraperitoneal con sobrenadante de cultivo bacteriano de E-coli recombinante que expresa Stx2. Se realizaron a 48 h posteriores a la inoculación, estudios Funcionales, histológicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular (Western blot). **Resultados:** Los túbulos renales mostraron la pérdida de marcadores epiteliales, E-caderherina y catenina, y un aumento en la expresión el factor transformante de crecimiento beta-1 (TFG-β1). Así mismo detectamos la expresión de α-actina de músculo liso (α-SMA) en el intersticio y fibrosis en las zonas periglomerular. **Conclusión:** Nuestros resultados indican que la respuesta temprana tubular los efectos de Stx2 se relaciona con un cambio inmunofenotipo (IPC) de las células tubulares y la presencia de fibrosis leve en el intersticio.

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 1**

**178. (49) LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SMADS SE MODIFICAN DURANTE LA DIFERENCIACIÓN NEURONAL DE CELULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS.**

Riva D.<sup>1</sup>; García C.<sup>2</sup>; Dimopoulos N.<sup>3</sup>; Scassa M.<sup>4</sup>; Fernández Espinosa D.<sup>5</sup>; Sevelever G.<sup>6</sup>; Heyd V.<sup>7</sup>  
 Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
 diegoarielriva@gmail.com

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa causada por la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas y es quizás uno de los desórdenes más adecuados para utilizar terapia de reemplazo celular. Para tal fin, se requiere de una fuente adecuada de dichas neuronas, como por ejemplo la diferenciación neural (DN) *in vitro* de células madre embrionarias humanas (CMEh) mediante protocolos que reproducen la embriogénesis. Durante la DN temprana existe una coordinación entre la activación y la inhibición de diversas vías de señalización, entre las cuales participan varios miembros de la familia TGF-beta. Durante la DN algunos miembros de esta familia se activan y otros se inhiben. Sin embargo, todos ellos transducen su señal a través de los factores de transcripción Smad. En general, las Smad1/5/8 son activadas por BMP/GDF, mientras que Smad2/3 se activan por TGF-beta/Activina/Nodal. Estos eventos solo son parcialmente conocidos y por ello se desea estudiar el comportamiento de las Smad durante la DN de las CMEh. Para tal fin, utilizamos el protocolo de DN desarrollado por Su-Chun Zhang, sobre la línea de CMEh WA-09. En este contexto, se estudió la expresión de las distintas Smad y de los marcadores de indiferenciación (Oct-4, Nanog) y neuroectodermo (Pax-6, Tuj-1, TH), mediante PCR en tiempo real e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Mientras que los niveles de mARN de Oct-4 descendieron hasta resultar indetectables al día 18; Pax6 aumentó entre 20 y 35 veces a partir del día 18 de DN con respecto al día 0. Tuj-1 y TH aumentaron significativamente a partir del día 23 y 30 respectivamente, resultados que fueron confirmados por IFI. Al analizar las Smad, solo la Smad8 presentó un aumento de 20 a 30 veces en sus niveles de mARN, a partir del día 18 de DN. Asimismo, se observó un aumento del receptor de BMP R1B, que señala a través de Smad1/5/8. Por lo tanto, se plantea un posible rol de la proteína Smad8 dentro de la neurogénesis de CMEh.

**179. (119) LA SEÑALIZACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN COLON SE ENCUENTRA DESENSIBILIZADA EN RATONES TRANSGÉNICOS QUE SOBREENPRESAN GH.**

Gándola Y.<sup>1</sup>; Miquet J.<sup>2</sup>; Díaz M.<sup>3</sup>; Sotelo A.<sup>4</sup>; Turyn D.<sup>5</sup>; González L.<sup>6</sup>  
 Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 gandolayami@hotmail.com

Ratones transgénicos que sobreexpresan GH muestran un incremento de la proliferación celular de la mucosa del intestino delgado y disminución de la apoptosis de las células de colon. Además, se observa una mayor incidencia de hepatocarcinoma a edades avanzadas. En el hígado de estos animales la expresión de moléculas involucradas en la inducción de proliferación celular está aumentada. Sin embargo, la respuesta ante el estímulo agudo con GH o EGF (factor de crecimiento epidérmico) es menor en los ratones transgénicos que en sus hermanos de camada normales. El eje somatotrópico constituido por la GH y el factor símil insulina tipo I (IGF-I) tiene importantes funciones en la regulación de la homeostasis intestinal y en el crecimiento y proliferación de las células epiteliales de colon. Sin embargo, no es clara la importancia de la GH para el desarrollo de cáncer de colon en ratones. El objetivo de este estudio fue analizar como afectan altos niveles circulantes de GH la expresión y activación de proteínas involucradas en la inducción de proliferación celular en colon. Para ello, muestras de intestino de ratones normales y transgénicos se estudiaron histológicamente y por *Western Blot*. A pesar de que los estudios histológicos mostraron un incremento de alteraciones tipo pólipos en el colon de los ratones transgénicos, no se observó un incremento significativo de la expresión o activación basal de EGFR, Src, Akt, Erk1/2 o STAT5. Cuando se analizó la fosforilación inducida por GH y EGF de estas moléculas, se observó que GH no induce la fosforilación de STAT5 en los ratones transgénicos, aunque sí lo hace en los ratones normales, mientras que la fosforilación de Akt inducida por EGF está disminuida en los ratones transgénicos. Mecanismos compensatorios capaces de desensibilizar vías de señalización implicadas en proliferación y supervivencia celular son inducidos ante niveles crónicamente aumentados de la GH.

**180. (185) UN INHIBIDOR DE LA METILACIÓN DEL CANAL ENAC AFECTA LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS BEWO DE TROFOBlasto HUMANO.**

Marino G.<sup>1</sup>; Assef Y.<sup>2</sup>; Kotsias B.<sup>3</sup>

*Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari<sup>1 2 3</sup>*  
 <gabinemar@gmail.com

La línea celular BeWo deriva del trofoblasto humano y es utilizada para la investigación del transporte iónico placentario. Hemos demostrado con técnicas electrofisiológicas y de biología molecular que el Canal Epitelial de Sodio sensible al amiloride (ENaC) se expresa en estas células y es funcional, participando en la migración celular que es estimulada con aldosterona y bloqueada con amiloride. La aldosterona activa en forma rápida al ENaC por medio de la metilación de la subunidad  $\alpha$  mientras que la 3-deaza-adenosina (DZA) actúa inhibiendo esta reacción. Nuestro objetivo es determinar si la metilación del ENaC está involucrada en el proceso de migración celular en células BeWo. Evaluamos la capacidad migratoria celular utilizando el modelo de relleno de la herida (*wound healing*) en monocapas de células BeWo, midiendo el porcentaje cicatrizado a las 6 h. Las células BeWo estimuladas con aldosterona (100 nM, 12 h) y con aldosterona + AMPc (100  $\mu$ M, 30 min) cubren una mayor superficie de las heridas ( $25.3 \pm 4.5$  y  $33.3 \pm 1.4\%$ ) con respecto a las cultivadas sin estímulo hormonal ( $12.8 \pm 3.0\%$ ) o expuestas solo a AMPc ( $10.6 \pm 3.8\%$ ) ( $p < 0.05$ ,  $n=12$ ). Observamos un efecto inhibitorio sobre la cicatrización de la herida, concentración dependiente de DZA, en células tratadas con AMPc + aldosterona:  $33.3 \pm 1.4$ ,  $26.7 \pm 2.2$ ,  $14.7 \pm 3.2$ ,  $11.0 \pm 1.8$  y  $5.1 \pm 0.1\%$ , para concentraciones de DZA de 0, 50, 100, 200 y 300  $\mu$ M, respectivamente ( $n=12$ ). Hemos verificado mediante el ensayo de MTT que el aumento de la velocidad de cicatrización de la herida depende de la migración y no de la proliferación celular, descartando que este proceso pudiese enmascarar la migración. La expresión proteica del ENaC estudiada por medio de Western blot no se modifica con DZA. Nuestros resultados indican que los efectos de la aldosterona sobre la migración celular podrían ser explicados en base a su efecto sobre la metilación del ENaC.

**181. (248) LAS INMUNOFILINAS DE ALTO PM FORMAN COMPLEJOS CON LA SUBUNIDAD CATALÍTICA HTERT DE LA TELOMERASA**

Lagadari M.<sup>1</sup>; Galigniana M.<sup>2</sup>

*IBYME<sup>1</sup>; IBYME; Departamento de Química Biológica de la FCEN-UBA<sup>2</sup>*  
 mlag2@hotmail.com

Las inmunofilinas de alto PM (IMMs) son una familia de proteínas solubles que poseen dominios TPR (*teratricopeptide repeat*) a través del cual se asocian a hsp90. En nuestro laboratorio sostenemos un modelo en el cual las IMMs FKBP51 y FKBP52 participan en la relocalización subcelular y la actividad transcripcional de receptores esteroidales gracias a esta interacción con la chaperona. Ambas IMMs poseen 75% de homología, mostrando FKBP51 propiedades antagónicas con FKBP52. Así, FKBP51 no une dineína, retrasa el retrotransporte de receptores e inhibe su actividad transcripcional. Por trabajos previos sabemos que FKBP51 es un factor antiapoptótico que actúa a nivel mitocondrial y nuclear, y pensamos que jugaría un rol en la progresión y/o supresión tumoral, aunque ello no está claramente definido aún. No obstante, encontramos que FKBP51 está altamente expresada en varios tipos de tumores. La actividad de telomerasa es esencial para la rápida expansión clonal de células tumorales. En su forma inactiva, la subunidad catalítica hTERT se asocia a hsp90, hsp70 y p23, mientras que la forma activa disocia a hsp70. Nos preguntamos si FKBP51 y FKBP52 forman parte de estos complejos, por lo que se analizaron lisados de células HeLa tratados con un buffer de extracción que permite la solubilización de factores unidos a la cromatina. En estas condiciones, fue posible inmunoprecipitar a hTERT y se observó que, además de hsp90, tanto FKBP51 como FKBP52 coimmunoprecipitaron con la enzima. Estudios por microscopía confocal mostraron que hTERT se localiza mayoritariamente en el núcleo, pero también en el citoplasma, lo que concuerda con estudios previos que muestran su distribución ubicua, incluyendo la mitocondria. FKBP51 comparte la misma propiedad, y fue observada colocalizando con hTERT tanto en células en interface como en células en división. Los estudios están enfocados al presente para evidenciar si tal asociación regula la actividad enzimática de telomerasa.

**182. (308) EFECTO DE IL-1 $\beta$  EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN FIBROSIS QUÍSTICA**

Clazure M.<sup>1</sup>; Valdivieso A.<sup>2</sup>; Sánchez F.<sup>3</sup>; Taminelli G.<sup>4</sup>; Pagano E.<sup>5</sup>; Massip Copiz M.<sup>6</sup>; Schulman G.<sup>7</sup>; Teiber M.<sup>8</sup>; Santa Coloma T.<sup>9</sup>

*Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina.<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>*

*mariangeles\_clazure@uca.edu.ar*

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones en el gen CFTR (canal transportador de Cl<sup>-</sup>). Mediante estudios realizados en nuestro laboratorio sabemos que en FQ existe una falla en la actividad del Complejo I mitocondrial (mCx-I). A partir de estos resultados y conociendo la elevada concentración de interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en esputo de pacientes FQ, nos interesó estudiar un posible rol de esta citoquina en la disminución de la actividad del mCx-I. En primer lugar se estudió la expresión del ARNm de IL-1 $\beta$ . Se emplearon dos modelos de FQ: células IB3-1 (mutación DF508 que afecta el transporte de Cl<sup>-</sup>) y S9 (IB3-1 corregidas mediante un vector viral que expresa CFTR wt) y células CaCo2, que expresan CFTR wt y CaCo2 tratadas con dos inhibidores del transporte de Cl<sup>-</sup>, CFTR(inh)-172 y GlyH-101. Se observó un aumento en la expresión del ARNm de la citoquina en las células FQ con respecto a los controles. Por otro lado, se determinó el efecto de IL-1 $\beta$  en la actividad mitocondrial. Se incubaron células IB3-1 y S9 con distintas concentraciones de IL-1 $\alpha$ . Al mismo tiempo, se trataron con un coctel estimulador de la actividad del CFTR. Luego de 24 horas se aislaron mitocondrias y se midió la actividad del mCx-I mediante la técnica de "Blue Native Gels". En ambos casos, al estimular con IL-1 $\beta$  a bajas dosis, se observó una disminución de la actividad del mCx-I de hasta ~60%. Llamativamente, en IB3-1 se observó una recuperación total de la actividad del mCx-I a la concentración de IL-1 $\beta$  más alta (de 5.0 ng/ml, que es inhibitoria de la expresión del ARNm del CFTR). Podemos concluir que

IL-1 $\beta$  modifica la actividad de mCx-I de manera diferente en células normales y en células con la actividad del CFTR afectada. Nuestro objetivo es ahora estudiar el mecanismo involucrado en la regulación de la actividad del mCx-I por IL-1 $\beta$ . Agradecimientos: Subsidiós CONICET(PIP 2009-2011), ANPCYT(PICT-2007,0628) y UCA. Becas CONICET (AGV y MMMC) y ANPCYT(MC).

**183. (336) CARACTERIZACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA DE ANCLAJE DE QUINASA A AKAP350 EN LA BIOGÉNESIS CANALICULAR EN CÉLULAS HEPÁTICAS.**

Mattaloni S.<sup>1</sup>; Ferretti A.<sup>2</sup>; Favre C.<sup>3</sup>; Larocca M.<sup>4</sup>

*Fac. Cs. Bioq. Farm.-UNR, Instituto de Fisiología Experimental-CONICET*<sup>1 2 3 4</sup>

*mattaloni@ifise-conicet.gov.ar*

Los hepatocitos son células epiteliales cuyos polos apicales forman los canaliculos biliares. La proteína-quinasa A (PKA) modula el establecimiento de estas estructuras. AKAP350 es una proteína de anclaje de PKA que tiene un rol fundamental en la nucleación de microtúbulos en el aparato de Golgi y en los centrosomas. Nuestros estudios previos sugirieron que AKAP350 participa en la biogénesis canalicular. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el rol de esta proteína en dicho proceso. Generamos células HepG2 con disminución en la expresión de AKAP350 (A350 KD), o de las proteínas estabilizadoras de microtúbulos derivados del Golgi CLASP1/2 (CLASP KD). Se realizó el análisis morfométrico de imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia con el fin de evaluar los siguientes parámetros: formación de estructuras canaliculares (canaliculos/100 células), nucleación de F-actina canalicular durante la recuperación del tratamiento con citocalasina D (actina canalicular (%)) y localización canalicular de la glicoproteína P (MDR1) en células polarizadas (MDR1 canalicular (%)). En ambos grupos de células se observó un defecto en la formación de canaliculos (C: 14 $\pm$ 2, A350 KD: 11 $\pm$ 1\*; C: 13 $\pm$ 1, CLASP KD: 7 $\pm$ 1\*) y en la nucleación de F-actina canalicular (C: 18 $\pm$ 2, A350 KD: 10 $\pm$ 2\*; C: 21 $\pm$ 2, CLASP KD: 14 $\pm$ 1\*). La localización canalicular de MDR1 sólo se vio alterada en células A350 KD (C: 20 $\pm$ 2, A350 KD: 11 $\pm$ 1\*). \* p<0.05. Estos datos indican que la disminución en la biogénesis canalicular en células A350 KD se acompaña de alteraciones en el citoesqueleto canalicular de actina y en la expresión canalicular de MDR1, y que los microtúbulos derivados del Golgi intervienen en el desarrollo del polo canalicular. Así, nuestros resultados sugieren que, a través del reclutamiento de proteínas que nuclean microtúbulos en el Golgi y proteínas regulatorias, como PKA, la proteína de anclaje AKAP350 integra vías de señalización que modulan la base estructural de la secreción biliar.

**184. (340) PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS MEDIADA POR PROTEÍNA-QUINASA A EN HEPATOCITOS DEPRIVADOS DE GLUCOSA**

Ferretti A.<sup>1</sup>; Mattaloni S.<sup>2</sup>; Ochoa E.<sup>3</sup>; Larocca M.<sup>4</sup>; Favre C.<sup>5</sup>

*Fac. Cs. Bioq. Farm.-UNR, Instituto de Fisiología Experimental-CONICET*<sup>1 2 3 4 5</sup>

*anacecisky@hotmail.com*

El estrés nutricional regula la supervivencia en las células eucariotas y las vías de quinasas implicadas están conservadas, como parte de una respuesta ancestral de regulación de la viabilidad celular ante escasez de sustratos. Hemos demostrado que la privación de glucosa en hepatocitos induce apoptosis por un mecanismo que requiere de la actividad de proteína-quinasa A (PKA) y de la integridad de su anclaje. La ausencia de glucosa promueve estrés oxidativo en células de diversos orígenes. Por otro lado, se conoce que PKA participa en la regulación del metabolismo energético. El objetivo en esta etapa fue analizar si la falta de glucosa produce estrés oxidativo en hepatocitos, si el estrés oxidativo interviene en la activación apoptótica en esas condiciones y si PKA participa en su inducción. Los hepatocitos fueron cultivados de 1 a 6 h en presencia (C) o ausencia de glucosa (G0) y se determinaron los niveles de especies reactivas

del oxígeno (ROS) y la actividad caspasa 3 como indicador de la activación apoptótica. Luego de 2 h de ausencia de glucosa se observó un aumento significativo en los niveles de ROS (G0: 149.5  $\pm$  22.9%; C: 100%), que fue prevenido por la inhibición de la actividad de PKA con H89, así como por la presencia del antioxidante vitamina c (vit c) (G0 + H89: 87.4  $\pm$  23.5%; G0 + vit c: 109.7  $\pm$  26.2%). El aumento de caspasa 3 fue significativo recién luego de 6 h de ausencia de glucosa, lo que fue prevenido por la presencia de vit c (G0: 7.07  $\pm$  0.52\*; C: 5.13  $\pm$  0.50; G0 + vit c: 4.15  $\pm$  0.69 pU/mg). \*p<0.05. Estos resultados indican que la activación de la apoptosis por falta de glucosa en cultivo de hepatocitos es causada por un componente oxidativo que es dependiente de la actividad de PKA. En los distintos grupos se cuantificaron los niveles de RNAm de Sod1 y Cat y los niveles de fosforilación de COX IV, subunidad de la citocromo c oxidasa cuya actividad es modulada por PKA. Estos datos pueden aclarar el rol de PKA en el desbalance de ROS.

**185. (383) INDUCCIÓN DE LA FOSFORILACIÓN EN SER DE STAT1 POR UN PÉPTIDO CÍCLICO ANTITUMORAL DEL INTERFERÓN-ALFA2B: ROL DE P38 MAPK Y PKC DELTA**

Blank V.<sup>1</sup>; Jatib M.<sup>2</sup>; Peña C.<sup>3</sup>; Roguín L.<sup>4</sup>

*IQUIFIB, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*<sup>1 2 3 4</sup>

*vivianablank@yahoo.com.ar*

En la búsqueda de péptidos miméticos del interferón-alfa2b (IFN-a2b), en nuestro laboratorio sintetizamos un péptido químico cíclico (PQC) con actividad antiproliferativa y apoptótica. Dicho péptido activa las quinasas Jak1 y Tyk2, que fosforilan proteínas STAT en residuos de Tyr, y estimula la p38 MAPK. Puesto que ha sido sugerido que p38 y/o la serina quinasa PKC delta podrían ser responsables de la fosforilación en Ser de STAT1 inducida por el IFN-a2b, el propósito del presente trabajo fue: a) investigar si PQC fosforila residuos de Ser de STAT1, b) determinar cuáles son las serina quinasas involucradas en este proceso. Para ello, luego de incubación células WISH (amnios humano) durante distintos tiempos en presencia del péptido, medimos la fosforilación en Ser de STAT1 por ensayos de Western Blot. Los resultados mostraron un aumento en los niveles de fosfo-Ser-STAT1 a los 60 min de incubación (2.1  $\pm$  0.3). Con el fin de evaluar si p38 está relacionada con esta activación, las células se preincubaron con SB203580, un inhibidor específico de p38. En estas condiciones, la fosforilación en Ser de STAT1 se bloqueó completamente. Por otro lado, también comprobamos que PQC aumentó significativamente los niveles de fosforilación de PKC delta a partir de los 30 minutos de incubación (2.4  $\pm$  0.3). Teniendo en cuenta que se ha descrito que, según el tipo celular, PKC delta podría regular la activación de p38, determinamos si PQC induce la fosforilación de p38 luego de preincubación las células con roterina, un inhibidor farmacológico de PKC delta. Observamos que la activación de p38 disminuyó de 1.93  $\pm$  0.45 a 0.95  $\pm$  0.25 luego de 30 minutos de estímulo. En su conjunto, los resultados obtenidos indican que p38 participa en la fosforilación en Ser de STAT1 inducida por el péptido, y sugieren que PKC delta estaría involucrada en la cascada de activación de p38.

**186. (403) REGULACIÓN DE LA TIROSINA QUINASA C-SRC MEDIANTE LA ACTIVIDAD DEL CANAL DE CLORURO CFTR**

Massip Copiz M.<sup>1</sup>; Valdivieso A.<sup>2</sup>; Sanchez F.<sup>3</sup>; Taminelli G.<sup>4</sup>; Pagano E.<sup>5</sup>; Clauzure M.<sup>6</sup>; Schulman G.<sup>7</sup>; Teiber M.<sup>8</sup>; Santa Coloma T.<sup>9</sup>

*Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina (www.uca.edu.ar/pib ; pib@uca.edu.ar).*<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>

*macarena\_massipcopiz@uca.edu.ar*

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el canal de cloruro CFTR. Previamente encontramos que la expresión y activación de c-Src

estaba aumentada en células FQ (J Biol Chem 277:17239, 2002). Otros autores observaron que el epitelio FQ muestra una mayor proliferación que el normal y que las células proliferativas tienen una mayor expresión de receptor de EGF, que activa c-Src. Nuestra hipótesis es que la vía del EGFR podría estar involucrada en la señalización CFTR→c-Src. Los objetivos de este trabajo fueron determinar si en diferentes modelos celulares se puede corroborar un aumento de la actividad de c-Src y determinar un posible rol de la vía EGFR en el mecanismo de transducción de señales CFTR→Src. IncUBando células HT29 (CFTR wt), con los inhibidores del CFTR glibenclamida, CFTR(inh)-172 y GlyH-101, se observó que la actividad de c-Src es mayor en las células con el CFTR inhibido. Debido a posibles efectos inespecíficos de estos inhibidores, se corroboraron los resultados transfectando células CaCo2, que expresan CFTR wt, con 4 ARNs de interferencia. Los ARNi inhibieron la expresión del CFTR en diferente grado. Mediante WB se comprobó que la actividad de c-Src era mayor en las líneas celulares transfectadas que mostraban mayor inhibición del CFTR. Asimismo, se están estudiando los posibles mecanismos involucrados en la señalización CFTR-Src, que incluyen al receptor de EGF (EGFR) y sus ligandos. Se observaron cambios en los niveles de ARN mensajero de EGFR en células CaCo2 (CFTR wt) y CaCo2 tratadas con inhibidores. En conclusión, la inhibición de la actividad o expresión del CFTR produce un incremento en la actividad de c-Src y podría estar involucrada la vía del receptor de EGF en la señalización CFTR→cSrc. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (AGV y MMMC) y ANPCYT (MC).

#### 187. (437) REGULACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE GR POR LAS PROTEÍNAS TPR 14-3-36 Y PP5

Mazaira G.<sup>1</sup>; Monte M.<sup>2</sup>; Erlejman A.<sup>3</sup>; Galigniana M.<sup>4</sup>  
Departamento De Química Biológica FCEN UBA<sup>1 2 3 4</sup> ;  
IBYME<sup>4</sup>  
gmazaira@qb.fcen.uba.ar

GR forma complejos con hsp90, hsp70, p23 y una proteína TPR. Según la secuencia y la orientación espacial de sus  $\alpha$ -hélices antiparalelas de dominios de 34 aa, algunas proteínas TPR se unen a hsp90. Es así como CyP40, PP5, FKBP51 y FKBP52 se asocian a receptores esteroidales. En trabajos previos demostramos que la unión de hormona favorece el recambio de FKBP51 por FKBP52, la que a diferencia de FKBP51, favorece el retro-transporte de GR y su actividad transcripcional. Se ha reportado que 14-3-3 ó retiene a GR en el citoplasma e inhibe su actividad transcripcional. Estudios cristalográficos muestran que 3 de las 9  $\alpha$ -hélices de 14-3-3 superponen su geometría con la de los dominios TPR de PP5. Aquí evaluamos la posible redundancia funcional sobre GR de ambas proteínas. La inmunoprecipitación de GR coadsorbe a hsp90, FKBP52 y PP5, pero también a 14-3-36. En ausencia de esteroide, GFP-GR se excluye del núcleo en proporción significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que en células normales ( $31,5 \pm 4,2\%$ ) al sobreexpresar a 14-3-3s ( $20,2 \pm 3,1\%$ ) o al dominio TPR de PP5 ( $11,3 \pm 2,7\%$ ), siendo la velocidad de importación de GR menor ( $t_{0,5} = 4', 8'$  y  $12'$  respectivamente). En contraste, la sobreexpresión de PP5 muestra una mayor proporción de GR nuclear ( $50,7 \pm 4,6\%$ ) y mayor enlentecimiento del tránsito ( $t_{0,5} = 22'$ ). La velocidad de exportación nuclear también se enlentece, siendo los  $t_{0,5}$  de 13,5 h (control), 4 h (14-3-3), 3,5 h (PP5) y 2 h (TPR). Mientras que TPR inhibe la actividad transcripcional, PP5 y 14-3-3 muestran un perfil bifásico (activación seguida de pérdida de activación o de franca inhibición para el caso de 14-3-3). En resumen, si bien 14-3-3 y PP5 poseen dominios TPR similares y efectos transcripcionales equivalentes, sus acción sobre el transporte de GR es opuesta (14-3-3 favorece la retención citoplasmática y PP5 la nuclear). El dominio TPR aislado es siempre inhibitorio (transcripción y transporte) debido a su eficiencia para en competir con cualquier otro factor TPR.

#### 188. (470) LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD O EXPRESIÓN DEL CANAL CFTR DISMINUYE EL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E INDUCE APOPTOSIS

Teiber M.<sup>1</sup>; Valdivieso A.<sup>2</sup>; Massip Copiz M.<sup>3</sup>; Clauzure M.<sup>4</sup>; Sanchez F.<sup>5</sup>; Schulman G.<sup>6</sup>; Taminelli G.<sup>7</sup>; Pagano E.<sup>8</sup>; Santa Coloma T.<sup>9</sup>

Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina (www.uca.edu.ar/pib ; pib@uca.edu.ar).  
2 3 4 5 6 7 8 9

luzteiber@hotmail.com

La apoptosis, o muerte celular programada, es un mecanismo fisiológico del organismo para eliminar células no deseadas y es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos en renovación continua. El rol de la apoptosis en la patogénesis de la Fibrosis Quística (enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen *CFTR*) es aún un tema controvertido, con resultados en ambos sentidos. El objetivo de este trabajo fue determinar si la actividad del CFTR afecta el potencial de membrana mitocondrial (un marcador temprano de apoptosis) e induce apoptosis o necrosis celular. Con este fin se midió el potencial de membrana mitocondrial por citometría de flujo, utilizando TMRE como marcador del potencial de membrana mitocondrial y anexina-V e ioduro de propidio como marcadores de apoptosis y necrosis, respectivamente. Se utilizaron como modelo celular células HT29 tratadas o no con el inhibidor del CFTR (CFTR Inh172) y células Caco-2 que expresan en forma estable cuatro ARNs de interferencia (y su control). Este último modelo nos permite descartar posibles efectos inespecíficos del inhibidor del CFTR, ya que el CFTR no se encuentra inhibido sino que su expresión y actividad se encuentran disminuidas. En ambos modelos (HT29 y Caco-2), en las células que poseían el CFTR afectado (inhibido o disminuido), se observó una disminución del potencial de membrana mitocondrial y un aumento moderado de la apoptosis, medida como la capacidad de unir anexina-V. Los resultados sugieren que en FQ efectivamente existe un incremento en la proporción de células con apoptosis. Queda por aclarar si la apoptosis surge como consecuencia de la disminución de la actividad del Complejo I mitocondrial que hemos observado en células que poseen afectada la con actividad o expresión del CFTR y el mecanismo involucrado. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (AGV y MMMC), ANPCYT (MC) y UCA (MLT y GLT).

#### 189. (474) ALTERACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO I MITOCONDRIAL EN LA LÍNEA CELULAR CACO-2 CON EXPRESIÓN REDUCIDA DEL CANAL DE CLORURO CFTR MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA

Valdivieso A.<sup>1</sup>; Sánchez F.<sup>2</sup>; Taminelli G.<sup>3</sup>; Pagano E.<sup>4</sup>; Clauzure M.<sup>5</sup>; Massip Copiz M.<sup>6</sup>; Schulman G.<sup>7</sup>; Teiber M.<sup>8</sup>; Santa Coloma T.<sup>9</sup>

Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>

agvaldivieso@gmail.com

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones que producen una reducción en la cantidad de canal de cloruro CFTR en la membrana plasmática. Anteriormente demostramos una reducción en la expresión de la subunidad MTND4 del Complejo I mitocondrial (CI<sub>m</sub>) y observamos una disminución en la actividad de dicho complejo, tanto en células provenientes de pacientes FQ como en células Caco-2 de carcinoma de colon humano tratadas con inhibidores farmacológicos de la actividad del CFTR (glibenclamida y CFTR(inh)-172). Sin embargo, todos los modelos celulares utilizados tienen diversas dificultades. La más importante es quizás la posibilidad de que los resultados estén afectados por una selección clonal inespecífica. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un nuevo modelo utilizando ARN de interferencia (ARNi) en lugar de inhibidores del CFTR para demostrar que la inhibición de la actividad del CI<sub>m</sub> se debe realmente a la disminución del CFTR y no a efectos secundarios de los inhibidores farmacológicos. Se generaron cinco líneas celulares Caco-2, transfectedas con cuatro

plásmidos diferentes que expresan ARNi y con un plásmido control. Se obtuvieron líneas celulares estables mediante selección de la resistencia a puromicina de los plásmidos. La puromicina fue elevada paulatinamente, durante varios pasajes. La reducción de la expresión del CFTR fue verificada por qRT-PCR y por Western blots. Tres de estas líneas celulares con ARNi mostraron una reducción significativa de la expresión del CFTR con respecto al control. Este nuevo modelo de FQ nos permitirá determinar si la disminución en la actividad del Clm observada en otros modelos celulares es dependiente de la actividad del CFTR, descartando posibles efectos inespecíficos de los inhibidores farmacológicos. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANP-CYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (AGV y MMMC) y ANPCYT (MC).

## INMUNOLOGÍA 1

### 190. (411) INCREMENTO DE LOS NIVELES DE ÓXIDO NÍTRICO (ON) Y PÉRDIDA DE LA MINERALIZACIÓN Y LA MASA ÓSEA EN MODELO DE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO

Toledo J.<sup>1</sup>, Mortarino P.<sup>2</sup>; Acosta N.<sup>3</sup>; Abramson D.<sup>4</sup>; Goy D.<sup>5</sup>; Sarrío L.<sup>6</sup>; Largo R.<sup>7</sup>; Herrero-Beaumont G.<sup>8</sup>; Capozza R.<sup>9</sup>; Coountry G.<sup>10</sup>; Feldman S.<sup>11</sup>  
LABOATEM Dto Promoción de la Salud Fac Cs Médicas UNR<sup>1 2 3 4 5 9 10 11</sup>; Fundación Jiménez Díaz-Univ Auton, Madrid, España<sup>7 8</sup>  
pablo2086@hotmail.com

Dado que estudios *in vitro* han asignado al óxido nítrico (ON) el papel de ser mediador de efectos de ciertas citoquinas pro-inflamatorias en la activación de osteoclastos, se investigó si existirían alteraciones de la mineralización y la masa ósea en nuestro modelo experimental de artritis y si existiría relación con posibles incrementos de esta biomolécula frente a la progresión de la patología. Conejos hembras *New Zealand*, (n=20) se dividieron en 2 grupos **AIA** (Se indujo artritis con 2 inmunizaciones sucesivas de OVA (5mg/ml, 1:1 adyuvante Freund) y posterior inmunización intra-articular con solución OVA y **C** (control, recibieron dosis placebo). 100 días post-inducción de artritis, el fenómeno inflamatorio se caracterizó clínicamente mostrando AIA dolor e inflamación peri-articular y se cuantificaron marcadores previamente descriptos: incremento diámetros femoro-tibio-rotuliano: **AIA>C**, p<0.01, hidrartrosis, hiper-intensidad y alteración de los tejidos blandos medidos por Resonancia Magnética: *scors* de I a III en **AIA**, niveles séricos de ON (**AIA>C**, p<0.05) y de anticuerpos anti-proteína citrulinada medidas por IFI (**AIA>C** p<0.01). Estudios anatomopatológicos *post-mortem* de membranas sinoviales mostraron alteraciones en **AIA** (íntima hiperplasiada, alteraciones fibrovasculares del intersticio e infiltrados plasmó-linfocitarios (grado de I a III en **AIA**). Estudios de las tibias por tomografía computada periférica cuantitativa determinaron parámetros de masa (contenido mineral óseo (CMO) total(t) y cortical (c) y área ósea cortical (AC) y de mineralización, densidad mineral ósea volumétrica (vDMO) total (t) y cortical (c) brindaron evidencia de que la patología provocó una reducción de los CMOt y CMOc (p<0.05 y p<0.01) y de las vDMOt y vDMOc (p<0.001 y p<0.05), del AC (p<0.01) respecto de **C**. Se aportan evidencias *in vivo* de que frente al fenómeno inflamatorio aumentan niveles séricos de ON y ocurre decaimiento en la masa y la mineralización ósea.

### 191. (795) INMUNOTOLERANCIA: EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON HIDROLIZADO DE COLÁGENO TIPO II CON Y SIN COLECALCIFEROL (D) SOBRE LA ESTRUCTURA ÓSEA EN CONEJOS CON ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO

Mortarino P.<sup>1</sup>; Zingoni N.<sup>2</sup>; Cabello J.<sup>3</sup>; Stival C.<sup>4</sup>; Simbler D.<sup>5</sup>; Acosta N.<sup>6</sup>; Capozza R.<sup>7</sup>; Coountry G.<sup>8</sup>; Feldman S.<sup>9</sup>  
LABOATEM Dto Promoción de la Salud Fac Cs Médicas UNR<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
pablo2086@hotmail.com

Para evaluar el efecto terapéutico del hidrolizado de colágeno tipo II bovino (HC) simultáneamente o no con pro-vitamina D (D) en la artritis experimental. Para esto se tomaron 40 conejos hembras *New Zealand* de 3 meses se dividieron en 2 grupos: AIA (recibieron dos inmunizaciones sucesivas intradérmicas de emulsión de ovoalbúmina (OVA) (5mg/ml, 1:1 adyuvante Freund) y posterior inmunización intra-articular con solución OVA Y C?? (recibieron dosis placebo). Cada grupo se subdividió en subgrupos (n=5) según recibiesen, post-declaración del fenómeno inflamatorio articular: hidrolizados de colágeno (HC), colecalciferol (D), ambos (HC-D), o dosis placebo, vía oral 90 días. Los fémures obtenidos post-mortem fueron estudiados por tomografía computada periférica cuantitativa (pQCT), determinando parámetros de masa (contenido mineral óseo (CMO) total(t) y cortical (c) y área ósea cortical (AC), de mineralización, densidad mineral ósea volumétrica (vDMO) total (t) y cortical (c) y de diseño (Momento de inercia para flexión y torsión (MI). No hubo diferencias entre los subgrupos del grupo C. Los efectos provocados por la AIA en lo que respecta a la reducción de los parámetros de masa y de mineralización, fueron neutralizados en animales que recibieron tratamiento con HC y HC-D en CMOt (p<0.01 en ambos grupos), CMOc (p<0.01 y p<0.001), vDMOt (p<0.001 en ambos grupos) y vDMOc (p<0.01 y p<0.05), AC (p<0.01 y p<0.05). El grupo AIA-D mostró recuperación en vDMOt (p<0.001) y vDMOc (p<0.001). Los MI no se modificaron en ningún caso. Conclusiones 1) el HC neutraliza la pérdida de masa ósea inducida por la artritis. 2) la vit D sola protege la mineralización pero no evita la pérdida ósea cortical, 3) la vit D adicionada al tratamiento con HC no tiene efecto sinérgico ni aditivo en la protección de la mineralización ni el la neutralización de la pérdida de masa ósea y 4) los tratamientos no alteran el diseño diafisario.

### 192. (72) EL COMPUESTO A (CPDA), UN NOVEDOSO MODULADOR DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR), INHIBE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN (FTS) T-BET Y NF- $\kappa$ B E INDUCE LA ACTIVIDAD DE GATA-3

Antunica Noguero M.<sup>1</sup>; Liberman A.<sup>2</sup>; Ferraz-de-Paula V.<sup>3</sup>; Castro C.<sup>4</sup>; De Bosscher K.<sup>5</sup>; Gerlo S.<sup>6</sup>; Haegeman G.<sup>7</sup>; Perone M.<sup>8</sup>; Arzt E.<sup>9</sup>  
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEN, Uba, IFIByNE-CONICET<sup>1 2 4 8 9</sup>; Neuroimmunomodulation Research Group, FMVZ-USP, San Pablo, Brasil<sup>6</sup>; Laboratory for Eukaryotic Gene Expression and Signal Transduction, Gent, Bélgica<sup>5 6 7</sup>  
mariaantunica@fbmc.fcen.uba.ar

El CpdA es un modulador del GR con propiedades anti-inflamatorias y reducidos efectos secundarios *in vivo*. Sin embargo aún no se conocen los mecanismos moleculares implicados en su acción. Previamente demostramos que CpdA induce la actividad transcripcional de GATA-3 (Th2) vía p38 MAPK favoreciendo la diferenciación de linfocitos Th2. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de CpdA sobre otros FTs, T-bet (Th1) y NF- $\kappa$ B, con el fin de entender su acción a nivel molecular. Estudiamos la regulación de T-bet por CpdA ( $10^{-5}$ M) en el linfoblastoma T EL-4, y de NF- $\kappa$ B en la línea celular macrófaga RAW 264.7. Utilizamos los elementos de respuesta (RE) de estos FTs y los promotores de IFN- $\alpha$  (Th1), TNF- $\alpha$  e IL-6 (regulados por NF- $\kappa$ B) clonados río arriba del gen de la luciferasa. Analizamos la participación del GR usando el antagonista RU38486 (1 $\mu$ M) y sus versiones mutantes de transrepresión, S425G, y transactivación, A458T. Determinamos la secreción de citoquinas por ELISA. Observamos que CpdA inhibe la actividad de T-bet sobre sus RE (57% vs control, p<0.01); este efecto no se observa en presencia del mutante de transrepresión del GR. Además, CpdA inhibe la actividad de este FT sobre el promotor de IFN-y (37% vs control, p<0.01) y su secreción (inhibición total=100% vs LPS, p<0.01). Demostramos también que CpdA inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por LPS (1 $\mu$ g/ml) sobre sus RE (100% vs LPS, p<0.01) y sobre los promotores de TNF- $\alpha$  (100% vs LPS, p<0.01) e IL-6 (100% vs LPS,



$p < 0.01$ ). Además, disminuye la secreción de ambas citoquinas (100% vs LPS,  $p < 0.01$ ). Por lo tanto, CpdA inhibiría el desarrollo de respuestas de tipo Th1, al inhibir la actividad de T-bet y favorecer el desarrollo de respuestas de tipo Th2 (GATA-3). Al mismo tiempo, presentaría un efecto anti-inflamatorio generalizado al inhibir la actividad de NF- $\kappa$ B. Estos resultados indican que CpdA posee potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias mediadas por linfocitos Th1.

**193. (138) REGULACIÓN DE GALECTINA 3, POR GLUCOCORTICOIDES, EN CÉLULAS DEL EPITELIO E INMUNIDAD INNATA BRONQUIOLAR.**

García L.<sup>1</sup>; Sundblad V.<sup>2</sup>; Leimgruber C.<sup>3</sup>; Elia J.<sup>4</sup>; Rabinovich G.<sup>5</sup>; Maldonado C.<sup>6</sup>

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba<sup>1 3 4 6</sup>; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (IBYME-CONICET)<sup>2 5</sup>; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA<sup>6</sup>  
bingarcia@hotmail.com

El epitelio bronquiolar cuenta con diversos mecanismos que regulan la inflamación a fin de reponer la homeostasis. Una célula clave en este proceso es la Célula de Clara (CC) a través de la secreción de proteínas inmunomoduladoras como la proteína de 16 kDa (CC16) y galectina 3 (Gal-3). Dadas las funciones de Gal-3 en los procesos inflamatorios y el rol esencial de los glucocorticoides en la fisiología pulmonar, nuestro objetivo fue evaluar el efecto de dicha hormona en la secreción de Gal-3 y su distribución subcelular en células epiteliales como las CC y de la inmunidad innata como los macrófagos alveolares (MAV). Para ello se obtuvo tejido pulmonar de ratas macho de la cepa Wistar ( $n=6$ ) con distintos niveles de glucocorticoides y que fueron asignados en los siguientes grupos: CONTROL (sham operated), ADX (animales adrenalectomizados que desde el día 7 a 14 reciben inyecciones diarias de vehículo), ADX-GLU (ratas adrenalectomizadas y recuperadas en forma subcutánea con 2mg/kg/día de Dexametasona en días 7 a 14). Los cambios inducidos en los distintos grupos fueron evaluados mediante semicuantificación de inmunomarcaciones de Gal-3 a nivel óptico y electrónico, y de su expresión en homogenato por Western blot (WB). En el grupo ADX se observó una disminución a nivel citoplasmático ( $p < 0.01$  vs control) tanto en CC como en MAV por inmunocitoquímica (ICQ) además de alteraciones tróficas en la morfología de dichas células; coincidiendo con un descenso en la expresión pulmonar total por WB. Estos cambios fueron revertidos en el grupo ADX-GLU con valores mayores a los controles por ICQ, tanto a nivel citoplasmático como nuclear, en CC ( $p < 0.05$  vs control) y MAV ( $p < 0.001$  vs control). Estos resultados sugieren que los glucocorticoides ejercen un control en la expresión de Gal-3, con niveles específicos para cada tipo celular. Dicha regulación, constituiría un posible mecanismo alternativo de la respuesta inmunomoduladora ejercida por glucocorticoides a nivel pulmonar.

**194. (443) COMPARACIÓN DEL TRATAMIENTO DE ARTRITIS REUMATOIDE CON MEDICACIÓN CONVENCIONAL (METROTEXATE Y CORTICOIDES) Y CON HIDROLIZADO DE COLÁGENO EN 20 PACIENTES. EVALUACIÓN CLÍNICA Y DE LABORATORIO.**

Baez A.<sup>1</sup>; Toledo J.<sup>2</sup>; González E.<sup>3</sup>; Gorosito E.<sup>4</sup>; García Tentella B.<sup>5</sup>; Goy D.<sup>6</sup>; Abramson D.<sup>7</sup>; Palazzi J.<sup>8</sup>; Feldman S.<sup>9</sup>; Cointry G.<sup>10</sup>

Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>1 10</sup>; Laboratorio de Biología Osteoarticular y Terapias Emergentes, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>2 3 4 5 6 7 9</sup>; Grupo de Investigaciones en Enfermedades Moleculares e Inmunológicas (GIEMI)<sup>8</sup>  
gcointry@gmail.com

Con el objetivo de comparar el tratamiento convencional de la artritis reumatoidea con ciertas terapias emergentes se seleccionaron 20 pacientes con esta patología según criterios de la American

Rheumatology Association, que habían sido tratados previamente con metotrexate y corticoides durante un período mínimo de dos años sin respuestas positivas. A la mitad de estos pacientes se le suministró hidrolizado de colágeno tipo II (HC) en dosis de 0.5 g por día durante 6 meses y a la otra mitad su tratamiento habitual (MT+C) durante el mismo período. Al finalizar se observó una mejoría clínica significativa respecto del inicio que se reflejó en los indicadores ya validados previamente como el DAS28 y el HAQ20 ( $p < 0.01$  en ambos casos) tanto en el grupo HC como en el MT+C. Los anticuerpos antiproteína citrulinada se redujeron y las interleuquinas 4 y 10 aumentaron significativamente para el grupo HC ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  respectivamente) mientras que el grupo MT+C no presentó diferencias. El resto de las pruebas de laboratorio de rutina, otras citoquinas y los indicadores reumatológicos (PCR, prueba del látex, Rose Ragan, Anti-ADN) no presentaron diferencias significativas respecto del inicio del tratamiento en ninguno de los grupos. Estos resultados sugieren que 1) tanto el tratamiento convencional como el hidrolizado de colágeno fueron efectivos en mejorar clínicamente a los pacientes y que 2) el hidrolizado de colágeno produciría la mejoría a través de la inducción de fenómenos de tolerancia específicos, a diferencia del tratamiento convencional. Estos hallazgos indicarían que el hidrolizado de colágeno podría ser una alternativa válida y económica para el tratamiento de la artritis reumatoide ya que presentaría la misma eficacia que el tratamiento convencional con la ventaja de no presentar efectos secundarios ni colaterales. Se necesitan mayores estudios, con más pacientes y durante períodos de tiempo mayores para confirmar estos hallazgos.

**195. (190) TNF ALFA (TNF-A), INSUFICIENCIA RESPIRATORIA E INSUFICIENCIA RENAL EN PACIENTES CON SEPSIS Y SHOCK SÉPTICO**

Ricarte Bratti J.<sup>1</sup>; Brizuela N.<sup>2</sup>; Montrull H.<sup>3</sup>; Jaime Albarran J.<sup>4</sup>; Colazo A.<sup>5</sup>

CAT FARMACOLOGIA - FCM-UN CORDOBA - Hosp Nacional de Clínicas - Córdoba<sup>1 5</sup>; Cat Farmacología - FCM - UN CORDOBA<sup>2 3</sup>; FCM - UN CORDOBA - Hosp Nacional de Clínicas - cordoba<sup>4</sup>  
jpricarte@yahoo.com.ar

**Introducción:** Sepsis es una infección generalizada. Genera una Respuesta Inflamatoria Sistémica, desbalances en la oxigenación tisular y disfunción orgánica. TNF alfa, IL-1, IL-6 son los principales mediadores inflamatorios implicados. **Objetivos:** Determinar los niveles de TNF alfa en pacientes con Sepsis. Relacionar dichos resultados el desarrollo de insuficiencia respiratoria e insuficiencia renal. **Material y Métodos:** Se obtuvieron muestras de suero de 16 pacientes con criterios de Sepsis, al ingreso de los mismos al nosocomio. Los niveles de TNF alfa se cuantificaron por ELISA. Se siguieron los pacientes durante la internación y ambulatoriamente por un mes. **Resultados:** los pacientes que al ingreso tuvieron  $pO_2$  menor a 60 mmHg (Insuficiencia Respiratoria) tuvieron en promedio 473 pg/ml de TNF alfa en comparación con los pacientes que tuvieron  $pO_2$  entre 60 y 80 mmHg (Hipoxemia) cuya cifra fue de 157 pg/ml. En los pacientes con  $pO_2$  normal (igual o mayor a 80 mmHg) la determinación fue de 90 pg/ml ( $p < 0,05$ ). Los pacientes que ingresaron con fallo renal en promedio tuvieron 592 pg/ml de TNF alfa mientras que en aquellos cuya función renal era conservada fue de 122 pg/ml ( $p < 0,05$ ). **Conclusiones:** Nuestro estudio mostró que el nivel de TNF alfa en pacientes con Sepsis es más alto en aquellos que desarrollaron Insuficiencia Respiratoria e insuficiencia Renal, por lo que cifras elevadas de esta citoquina se acompañan de daño orgánico a distancia, lo que ensombrece el pronóstico de estos pacientes

**196. (450) EFECTO DE DEXAMETASONA Y BUDESONIDE SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO HIALURÓNICO EN UN MODELO DE ASMA MURINA.**

Ernst G.<sup>1</sup>; Lompardía S.<sup>2</sup>; Cordo Russo R.<sup>3</sup>; Modenutti C.<sup>4</sup>; Mascaró M.<sup>5</sup>; Gentilini V.<sup>6</sup>; Venturiello S.<sup>7</sup>; Galíndez F.<sup>8</sup>; Hajos S.<sup>9</sup>

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Inmunología, IDEHU-CONICET-UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7 9</sup>; Hospital de Rehabilitación

*Respiratoria María Ferrer. Servicio de Endoscopia<sup>a</sup>  
glendae@ffy.uba.ar*

El ácido hialurónico (AH), componente de la matriz extracelular, es sintetizado en el pulmón por fibroblastos y neumocitos II. Se ha descrito un aumento de su concentración asociado a enfermedades inflamatorias. Presenta un activo turn-over, regulado por enzimas que lo sintetizan y degradan (Has y Hyal). Trabajos "in vitro" han reportado la modulación de estas enzimas por glucocorticoides. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de los tratamientos con Dexametasona (Dx) y Budesonide (Bd) sobre los niveles AH. Para esto se utilizó un modelo de asma murino inducido por sensibilización de ratones con *Dermatofagoides pteronissinus* (Dp) utilizando como control ratones tratados con solución fisiológica. Se determinó la concentración de AH por ELISA en el lavado broncoalveolar (BAL) encontrando diferencias significativas entre el grupo de ratones sensibilizados respecto del control ( $3.11 \pm 0.25$  vs  $0.96 \pm 0.15$ )  $\mu\text{g/ml}$  de HA ( $p < 0.01$ ). El tratamiento con Dx y Bd de los ratones sensibilizados con Dp disminuyó los niveles de AH ( $0.56 \pm 0.10$  y  $0.87 \pm 0.11$ )  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente ( $p < 0.001$ ). Se determinó la expresión de Has y Hyal en pulmón por RT-PCR encontrando que los ratones sensibilizados con Dp expresaron 63.53, 62.28 y 62.10% más Has1, Has2 y Hyal2 respectivamente, que los ratones control. Los tratamientos con Dx y Bd no mostraron diferencias significativas en la expresión de estos genes. Al analizar la expresión de Akt en extractos de pulmón por Western Blot observamos que la relación pAkt/Akt disminuyó significativamente con el tratamiento con Dx respecto de los controles ( $0.64$  vs  $1$ ,  $p < 0.05$ ). El tratamiento con Bd no fue efectivo. Concluimos que los ratones sensibilizados con Dp presentan un aumento en la expresión de los genes que regulan el turn-over de AH, hecho que estaría relacionado con mayores niveles de AH en el BAL. El tratamiento con Dx y Bd disminuyen significativamente la concentración de AH, sin embargo los mecanismos que modulan este efecto aún no están claros.

## TRANSDUCCION DE SEÑALES 2

### 197. (659) ACTIVACIÓN RÁPIDA Y TRANSITORIA DE MAPKS COMO MEDIADOR DEL EFECTO DE LA PROGESTINA R5020 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR Y LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE ENDOMETRIO HUMANO

*La Greca A.<sup>1</sup>; Vallejo G.<sup>2</sup>; Ballaré C.<sup>3</sup>; Beato M.<sup>4</sup>; Sara-güeta P.<sup>5</sup>  
Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 5</sup>; Centre de Regulació Genòmica, Barcelona, España<sup>3 4</sup>  
lagreca@dna.uba.ar*

En los últimos años se han propuesto mecanismos que involucran la activación de cascadas de señalización citoplasmáticas en respuesta a progesterona en diferentes tejidos. Con el objetivo de caracterizar estos mecanismos y la respuesta tejido específico al Receptor de Progesterona (RP) en endometrio, estudiamos la conexión entre la proliferación celular, la expresión génica, la activación de las vías de señalización citoplasmáticas, ERK1-2 y Akt, y su regulación por estradiol (E2) y progesterona (Pg) en la línea celular de cáncer de endometrio humano, Ishikawa. El tratamiento con E2 por 48hs aumentó el número de células, mientras que los tratamientos con R5020 o R5020 y E2 no los modificaron significativamente. Sin embargo, R5020 aumentó el número de células BrdU positivas del 23 al 71% al cabo de 18 hs de tratamiento, mientras que E2 aumentó del 20 al 60% a las 36hs de estimulación. R5020 y E2 en combinación inhibieron el efecto proliferativo de E2. La presencia de los antagonistas ICI y RU486 inhibió los efectos de E2 o E2 y R5020, respectivamente. Se evaluó la expresión de RP y pS2 -genes blanco del receptor de E2- y de Mig-6 y Dusp1 -genes blanco del receptor de Pg- a las 6hs de tratamiento con E2, R5020 o R5020 y E2, y comparó con la expresión obtenida en la línea celular de cáncer de mama, T47D. RP y pS2 resultaron positivamente regulados por E2, y Mig-6 y Dusp1 por R5020 respectivamente. Los niveles de las formas

activas de las quinasas citoplasmáticas ERK1-2 y Akt se midieron mediante western blot. pERK1-2 aumentó a los 5min decayendo hacia los 10min de tratamiento con R5020. El tratamiento con RU486 y el inhibidor de la vía de las MAPK, PD 98059, inhibió dicho aumento. No se registraron cambios en la forma activa de Akt. Los resultados sugieren que Pg podría actuar como estímulo proliferativo en esta línea celular y que la rápida y transitoria activación de ERK1-2, pero no así la de Akt, regula la expresión génica de Mig-6 y Dusp1 mediada por el RP.

### 198. (670) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA MEDIADA POR GALECTINA-1

*Romaniuk M.<sup>1</sup>; Lapponi M.<sup>2</sup>; Etulain J.<sup>3</sup>; Malaver E.<sup>4</sup>; Negrotto S.<sup>5</sup>; Rabinovich G.<sup>6</sup>; Schattner M.<sup>7</sup>  
Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5 7</sup>; IBYME CONICET<sup>6</sup>  
albertinar@gmail.com*

Galectina-1 (Gal-1) es una lectina presente en varios tipos celulares que se une a glicanos de membrana de las células o de la matriz extracelular capaz de ejercer un rol relevante en la regulación de la respuesta inmune, cáncer e inflamación. Previamente demostramos que además, la Gal-1 soluble induce diversas respuestas de activación plaquetaria tales como agregación, liberación del contenido de los gránulos y formación de agregados mixtos plaqueta-leucocito. En este trabajo, analizamos los mecanismos moleculares involucrados en la activación plaquetaria mediada por Gal-1. Los resultados obtenidos demuestran que Gal-1 promueve la movilización intracelular de calcio ( $25 \pm 4\%$  cels. pos., citometría de flujo,  $n=3$ ), estimula la generación de  $\text{TXB}_2$  (ELISA) ( $C: 1500 \pm 100$  pg/ml; Gal-1 60ug/ml:  $9000 \pm 320$  pg/ml,  $n=3$ ) e induce la fosforilación de las quinasas ERK y p38, así como también la activación de la kinasa Akt (western blot). Por otro lado, utilizando Gal-1 inmovilizada determinamos mediante microscopía confocal y ensayos de adhesión que esta lectina, en forma similar al fibrinógeno o colágeno, induce la adhesión de las plaquetas así como también la polimerización de actina o *spreading*. Estudios realizados utilizando inhibidores específicos indican que las quinasas Src, PKC y PI3K tendrían un rol clave en la adhesión de plaquetas a Gal-1, mientras que la vía de MAPK no participaría en este fenómeno.

### 199. (580) EFECTOS LOCALES DEL BLOQUEO DEL SISTEMA NOTCH POR UN INHIBIDOR DE GAMMA SECRETASA (DAPT) EN LA FUNCIÓN DEL CUERPO LÚTEO DE RATAS PREÑADAS

*Hernández F.<sup>1</sup>; Irusta G.<sup>2</sup>; Tesone M.<sup>3</sup>  
Instituto de Biología y Medicina Experimental- IBYME-CONICET; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Fce-yn-UBA<sup>1 3</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental-IBYME-CONICET<sup>2</sup>  
hernandez@dna.uba.ar*

La vía de señalización de Notch incluye una familia de receptores transmembrana (Notch1-4) que interactúan con ligandos específicos (familia Delta-like, Jagged1 y Jagged2) desempeñando un papel fundamental en la proliferación, crecimiento, diferenciación y apoptosis en tejidos embrionarios y adultos. Cuando el ligando se une a su receptor Notch, el dominio de transmembrana es procesado proteolíticamente por el complejo gamma secretasa, liberando al dominio intracelular que se transloca al núcleo y regula la expresión de factores de transcripción. En trabajos previos hemos demostrado que los receptores Notch1, 4 y el ligando Dll4 se expresan en el cuerpo lúteo (CL) de ratas preñadas y la administración de prostaglandina F2 $\alpha$  disminuye los niveles de los ARNm y la expresión proteica. Nuestra hipótesis es que el sistema Notch regula en forma directa la función luteal durante la preñez en la rata. Se utilizaron ratas inyectadas intrabursa con el inhibidor de Notch DAPT (10 mg/ovario) o su vehículo (Control) en el inicio de la regresión luteal (19 días de preñez) y se sacrificaron a las 24 hs. Se evaluó la función luteal midiendo los niveles de progesterona sérica (P4) por RIA, se aislaron los

CLs por microdissección para medir proteínas pro y anti apoptóticas por Western. Además se estudió la localización de caspasa 3 mediante IHC. La inyección intrabursa con DAPT disminuyó los niveles de P4 ( $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ). Se observó un aumento en los niveles del fragmento activo de caspasa 3 medido por Western en el grupo DAPT comparado al grupo control ( $P < 0.05$ ,  $n = 5$ ) y sus células luteales mostraron marca nuclear más intensa para dicha caspasa. El tratamiento aumentó los niveles luteales de la proteína proapoptótica BAX y disminuyó los niveles de la proteína antiapoptótica BCL2, siendo la relación entre estas dos proteínas significativamente elevada en el grupo DAPT. Conclusión: Estos resultados sugieren que el sistema Notch tiene una función de supervivencia en el CL de rata preñada.

## 200. (597) ERK EN MITOCONDRIAS: ACTIVACIÓN TRICOMPARTIMENTAL EN CÉLULAS LP07

Alippe Y.<sup>1</sup>; Elguero E.<sup>2</sup>; Pérez H.<sup>3</sup>; Carreras M.<sup>4</sup>; Poderoso J.<sup>5</sup>

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3</sup>; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires; CONICET<sup>4 5</sup>  
yaelalippe@gmail.com

Previamente demostramos que la oxidación de MAPKs en mitocondria determina la interacción diferencial con sus activadores, provocando activación redox selectiva de las vías de señalización celular; ERK2 es fosforilada por MEK1/2 en Tyr185 y Thr183, y la translocación al núcleo depende de su pasaje previo por mitocondria. La hipótesis general es que la activación de ERK2 es regulada espacial y temporalmente por fosforilación secuencial de sus sitios de activación en los compartimientos citosólico y mitocondrial. El objetivo es observar la redistribución subcelular y fosforilación secuencial de ERK2 en condiciones proliferativas ( $H_2O_2$  1  $\mu M$ ) y antiproliferativas ( $H_2O_2$  50  $\mu M$ ) en células LP07. Mediante anticuerpos contra las distintas formas fosforiladas de ERK se observó que con  $H_2O_2$  1  $\mu M$ , pY-ERK se incrementó 60% en citosol (15 min) y luego disminuyó a niveles control, mientras que en mitocondrias aumentó 50% (5 min) y permaneció constante. El tratamiento con  $H_2O_2$  50  $\mu M$  disminuyó los niveles citosólicos de pY-ERK, en consonancia con un incremento leve y sostenido en mitocondria. Se observó poca variación de pT-ERK en citosol con 1  $\mu M$ , y un pico en mitocondria a los 30 min (8 veces el control) que luego revirtió; con 50  $\mu M$  pT-ERK en mitocondria aumentó 10 veces (5 min) cayendo luego 50% (30 min), mientras que hubo poca variación citosólica. Por mutagénesis dirigida se generaron variantes no fosforilables de ERK2 en Tyr (Y185A) o Thr (T183A) y se analizó su distribución con 1  $\mu M$  de  $H_2O_2$ . T183A se acumuló en citosol, con pico a los 15 min (+25%) al tiempo que cayó en mitocondria (-50%), mientras que Y185A permaneció invariable en citosol y aumentó tardíamente en mitocondria (+10%, 30 min). Estos resultados apoyan un modelo tri-compartimental de activación de ERK2, donde la entrada a mitocondria depende de la fosforilación citosólica en Tyr185, mientras que la fosforilación en Thr183 en la organela y posterior translocación al núcleo obedece al estado redox

## 201. (798) ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA PROLIFERACIÓN DEPENDIENTE DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA DE CÉLULAS ESTROMALES DE ENDOMETRIO.

Tarifa Reischle I.<sup>1</sup>; Vallejo G.<sup>2</sup>; Mestre-citrinovit A.<sup>3</sup>; Beato M.<sup>4</sup>; Saragüeta P.<sup>5</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 3 5</sup>; Centre de Regulació Genòmica, Barcelona, España.<sup>4</sup>  
seus\_tarifa@hotmail.com

Previamente demostramos que la progestina R5020<sup>10M</sup> induce la proliferación de las células estromales endometriales de rata U111 mediante el receptor clásico de progesterona (RP) y describimos el patrón global de expresión génica temprano asociado. El objetivo de este trabajo fue identificar, entre los genes con las funciones remodelamiento de cromatina y factores de transcripción sobrerrepresentados en este perfil global, a los mediadores de la

proliferación dependiente de RP y sus genes diana. Se estudió la expresión de los factores de transcripción Crebbp y Usf1; y de sus genes diana Ciclina E, y CDC2 y Ciclina B1, respectivamente, durante 0 (T0), 45 min, 2, 6, 12, 24 y 48 hs de tratamiento con vehículo o R5020<sup>10M</sup> mediante PCR a punto final y qPCR. Observamos que: a) Crebbp se induce a los 45 min (1,3 $\pm$ 0,1 veces de aumento vs vehículo). b) Ciclina E se induce gradualmente desde 45min hasta 12 hs (1,6 $\pm$ 0,1 veces de aumento vs vehículo). c) Usf1 presenta una inducción gradual desde 45 min hasta 12 hs (1,9 $\pm$ 0,5 veces de aumento vs vehículo). d) Ciclina B1 muestra un pico de inducción a los 45 min (1,9 $\pm$ 0,3 veces de aumento vs vehículo), y luego uno a las 12 hs (1,5 $\pm$ 0,1 veces de aumento vs vehículo). e) CDC2 se induce rápida y transitoriamente a los 45 min (4 $\pm$ 1,5 veces de aumento vs vehículo) y posteriormente a las 12 hs (1,7 $\pm$ 0,3 veces de aumento vs vehículo). El tratamiento con el antagonista del receptor de progesterona RU486 a las 12 hs bloqueó el efecto de la progestina R5020 sobre los niveles de mensajero de los factores de transcripción y los genes blanco ensayados. Nuestros resultados sugieren que la proliferación progestina dependiente mediada por el RP en las células estromales de endometrio U111 puede deberse en parte a la acción de los factores de transcripción de regulación temprana sobre moduladores del ciclo celular.

## 202. (546) EXPRESIÓN DE CSDC2 DURANTE LA DECIDUALIZACIÓN IN VITRO E IN VIVO.

Mestre Citrinovitz A.1; Vallejo G.2; Saragüeta P.3

IBYME 1 2 3

mestre@dna.uba.ar

La transdiferenciación de células estromales a células deciduales tiene lugar fisiológicamente bajo el efecto de estrógeno y progesterona, y es la base del desarrollo de la decidua en el sitio de implantación del blastocisto. En trabajos anteriores hemos definido el patrón global de expresión génica asociado a la transdiferenciación decidual en la línea celular estromal normal derivada de útero de rata U111. Estos estudios muestran a Cold Shock Domain C2 (Csdc2) como el gen más sobre-regulado (70 veces con respecto a células sin decidualizar) durante la diferenciación. El objetivo de este trabajo es estudiar la decidualización *in vitro* inducida por estrógeno y progesterona o 10% de suero libre de hormonas (DCC-FCS), relacionar la decidualización *in vivo* con el modelo *in vitro* y caracterizar la expresión de Csdc2 en ambos modelos. Para comprobar la diferenciación de las células U111 tratadas con progesterona (P) y estradiol (E) durante el cultivo, se midieron los niveles de ARNm de Desmina, marcador de decidualización tardío y Csdc2 durante 6 días de cultivo. Experimentos preliminares mostraron mayor expresión de mensajero de Csdc2 y Desmina solamente en las células tratadas durante 6 días con E (2,4 veces vs T0) y con P+E (2,80 veces vs T0). Los ensayos de inmunoblot, mostraron una expresión basal de Desmina y Csdc2 sin variaciones entre los distintos tratamientos durante los 6 días analizados. Además, se compararon los niveles de ambas proteínas con los obtenidos de muestras de útero de rata no preñada y con 4, 6 y 8 días de preñez (dpc). Ambos genes tuvieron una cinética de expresión *in vivo* en aumento desde el día 0 al día 8dpc (Desmina 3.29; Csdc2 2.35 veces respecto a NP). Estos resultados muestran una correlación entre los niveles de Csdc2 *in vitro* e *in vivo* y permiten utilizar el sistema *in vitro* para estudiar el papel de Csdc2 durante la decidualización.

## ENDOCRINOLOGIA 2

### 203. (219) ROL DEL ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN LAS PRIMERAS ETAPAS DEL PROCESO DE REGENERACIÓN HEPÁTICA EN EL ESTADO DIABÉTICO

Ingarano P.<sup>1</sup>; Ronco T.<sup>2</sup>; Francés D.<sup>3</sup>; Monti J.<sup>4</sup>; Ceballos P.<sup>5</sup>; Galleano M.<sup>6</sup>; Pisani G.<sup>7</sup>; Carrillo C.<sup>8</sup>; Carnovale C.<sup>9</sup>  
Instituto de Fisiología Experimental - IFISE<sup>1 2 3 4 5 7 8 9</sup>;  
Programa de Radicales Libres - PRALIB<sup>6</sup>  
paolaingar@gmail.com

En estudios previos demostramos que, un aumento del NO en hígado de ratas post-hepatectomía parcial (Hp), disminuía el índice de proliferación (IP). Por otro lado, observamos un aumento del NO en el hígado de ratas diabéticas. Diferentes estudios sugieren que en el estado diabético existe una respuesta regenerativa deficiente. Nos propusimos evaluar si una disminución del NO en el hígado de ratas diabéticas podría mejorar el índice de proliferación. Ratas Wistar macho adultas se separaron en 2 grupos: control (HP, n=30) y diabéticas (HP-D, n=24) con estreptozotocina (SZ), 60 mg/kg PC intraperitoneal (ip). Ratas de todos los grupos fueron tratadas con un inhibidor selectivo de la enzima óxido nítrico sintasa inducible, aminoguanidina (AG), 130 mg/Kg PC (3 inyecciones (ip) 3 días previos a la cirugía). 30 días posteriores a la inyección de SZ o vehículo, 15 ratas de cada grupo fueron sometidas a una Hp del 70% y estudiadas a la hora post-cirugía. Otro grupo de ratas (n=15) fue estudiado a las 24 horas post cirugía para el análisis del antígeno de proliferación celular (PCNA). Glicemia (mmol/l): HP:6,4±0,3; HP-D:25,7±3,1\*; PC(g): HP:438±7; HP-D:296±6\*; (\*p<0,05 vs.C). AG no modificó estos parámetros. Sham vs Sham+AG no tienen diferencia estadísticamente significativa. NO hepático (EPR) disminuyó significativamente (p<0,05) en HP+AG (-56%) y HP-D+AG (-39%), mientras que aumentó (254%) en HP-D vs. HP. El PCNA disminuyó significativamente (p<0,05) a las 24 hs en todos los grupos vs HP (HP+AG:-7%; HP-D: -11%; HP-D+AG: -13). La disminución del NO hepático en ratas tratadas con AG disminuyó el IP en los grupos HP y HP+D. Sugerimos que la cantidad de NO generada post-Hp es la adecuada para un eficiente proceso regenerativo mientras que valores muy superiores como los hallados en el estado diabético, así como los significativamente disminuidos, hallados en los grupos tratados con AG, van en desmedro del proceso de regeneración hepática.

**204. (398) EFECTO DEL ESTRÉS EN LA EVOLUCIÓN DE LA DIABETES Y EN LA RESPUESTA INMUNE EN ANIMALES DE LAS CEPAS BALB/C Y C57BL/6.**

Rubinstein M.<sup>1</sup>; Albarracín R.<sup>2</sup>; Genaro A.<sup>3</sup>; Wald M.<sup>4</sup>  
 CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
 roxirubin@yahoo.com.ar

Se ha sugerido la existencia de un paralelismo entre el estado diabético y la inmunosupresión. Sin embargo no todos los pacientes presentan la misma evolución. A su vez, el estrés tiene un significativo reconocimiento en el desarrollo y la evolución de la diabetes. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del estrés crónico moderado (CMS) en la evolución de la diabetes y la respuesta inmune considerando la participación del condicionamiento genético. Se utilizaron dos cepas de ratones: BALB/c y C57BL/6 (c57). Se indujo la diabetes tipo I experimental y luego los animales fueron sometidos a un modelo de CMS (DIAB + CMS). Los resultados mostraron una disminución en la sobrevida y un aumento en la glucemia (Glu) en los animales DIAB + CMS de la cepa BALB/c (Glu, rango: DIAB + CMS: 171-358, diabéticos: 126-248 mg/dl; p<0,0001). Para los animales de la cepa c57 solo se observó un aumento en la glucemia sin cambios en la sobrevida (Glu, rango: DIAB + CMS: 192-506, diabéticos: 190-350 mg/dl; p<0,01). Se observó una disminución de la proliferación de linfocitos T (LT) y B (LB) en animales BALB/c DIAB + CMS a las 2, 4 y 16 semanas (s) de CMS (% del control: LT: 2s: 49±2,3; 4s: 59,4±3,9; 16s: 61±4,3; p<0,01. LB: 2s: 75,8±6,8; 4s: 49,8±2,5; 16s: 51±4,7; p<0,01). En los ratones c57 DIAB + CMS, la proliferación de LT disminuyó a las 2 y 4 semanas de exposición a CMS recuperándose a valores similares al control a las 16 semanas de CMS (% del control: LT: 2s: 64,2±3,4; 4s: 70,2±6,2; 16s: 105±9,6; p<0,05). La inhibición de la proliferación se correlaciona con un aumento del estrés oxidativo. No se observaron cambios en la proliferación de LB. Los resultados obtenidos sugieren que la exposición al CMS agrava la evolución de la diabetes en ambas cepas de ratones, afectando la respuesta inmune solo en la cepa BALB/c, avalando que la base genética podría condicionar la evolución de los pacientes con diabetes frente a un proceso infeccioso.

**205. (421) ROL DEL RADICAL HIDROXILO (•OH) EN EL BALANCE PROLIFERACIÓN CELULAR/APOPTOSIS EN LOS PRIMEROS ESTADIOS DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA POST-HEPATECTOMÍA PARCIAL (HP) EN RATAS DIABÉTICAS**

Francés D.<sup>1</sup>; Ronco M.<sup>2</sup>; Monti J.<sup>3</sup>; Ingaramo P.<sup>4</sup>; Pisani G.<sup>5</sup>; Lugano M.<sup>6</sup>; Parody J.<sup>7</sup>; Pellegrino J.<sup>8</sup>; Carrillo M.<sup>9</sup>; Carnovale C.<sup>10</sup>  
 Instituto de Fisiología Experimental - IFISE<sup>1 2 3 4 7 8 9 10</sup>;  
 Área Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR)<sup>5 6</sup>  
 frances@ifise-CONICET.gov.ar

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico caracterizado por la hiperglicemia y por la insuficiencia de la acción de la insulina. La mortalidad post-HP es mayor en pacientes diabéticos. Se sugiere que la deficiencia de insulina sería la responsable de una respuesta regenerativa deficiente. Además, los radicales libres derivados de la hiperglicemia median complicaciones en el estado diabético. Analizamos en el hígado el rol del •OH en el balance proliferación/apoptosis en la primera hora de la regeneración hepática post-HP (HP1 hora) y su impacto en el perfil proliferativo a las 24hs. Ratas Wistar macho adultas fueron separadas en: Control (C), Diabéticas inducidas por Estreptozotocina (STZ) (D) (STZ 60mg/kg, i.p.). Quince días post-STZ, el grupo D fue tratado con: insulina (D+I) (3 veces al día, s.c, 15 días); Desferoxamina (D+D) (100mg/kg, i.p., 15 días) o Tempol (D+T) (20mg/kg, i.v., 15 días) (n=6 c/u). En el día 30 se sometió a todos los grupos a una HP del 70%. A la hora post-HP, el grupo D mostró un aumento significativo en hígado de: •OH (45%) (relación 2,3-DHBA/salicilato por HPLC), relación mitocondrial Bax/Bcl-x<sub>L</sub> (190%), citocromo c (cit c) citosólico (80%) (determinadas por Western blot), y actividad caspasa-3 (35%) comparado con el C-HP1 hora. El tratamiento de D con inhibidores de •OH atenuaron ese aumento (D+DES=-55%, D+TEMP=-40%) y previnieron apoptosis por reducción de Bax/Bcl-x<sub>L</sub> y cit c citosólico. La insulina disminuyó •OH (-50%) así como la relación Bax/Bcl-x<sub>L</sub> y la liberación de cit c, atenuando la apoptosis. También se estimó el nivel de proliferación 24hs post-HP (PCNA, %). El grupo D mostró una disminución significativa (23,1±0,1) con respecto a C=26,1±0,3 mientras que los tratamientos aumentaron significativamente este parámetro (D+I=26,6±0,6; D+D=24,4±0,3; D+T=25,9±0,2). El •OH derivado de la hiperglicemia contribuye al desbalance en el proceso de proliferación/apoptosis hepática post-HP encontrado en el estado diabético.

**206. (495) LA ACTIVIDAD DE LA NADPH OXIDASA MODULA LOS CAMBIOS DE LA SECRECIÓN DE INSULINA INDUCIDA POR DIETA RICA EN FRUCTOSA.**

Román C.<sup>1</sup>; Flores L.<sup>2</sup>; Maiztegui B.<sup>3</sup>; Del Zotto H.<sup>4</sup>; Gagliardino J.<sup>5</sup>; Raschia M.<sup>6</sup>; Rebolledo O.<sup>7</sup>; Borelli M.<sup>8</sup>  
 Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada -CENEXA-UNLP-CCT La Plata-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
 lisiroman@hotmail.com

La dieta rica en fructosa (DRF) induce estrés oxidativo (EO), insulinoresistencia, tolerancia a la glucosa alterada y disminución de la masa de células B. No es claro el rol de la NADPH oxidasa insular (NOXi) en la patogenia de estos cambios. *Objetivo:* evaluar el rol de la NOXi en los cambios mencionados. *Métodos:* alimentamos ratas Wistar macho adultas por 21 días con dieta comercial estándar sin (C) o con 10% de fructosa en agua de bebida (F) y ambos grupos tratados con un bloqueante de NOX (apocinina [A] 0,15mmol/día; CA y FA). Determinamos: en suero: Glucosa (G), Insulina (I) y Triglicéridos (TG); en islotas aisladas: secreción de I, actividad de NOXi y niveles de enzimas antioxidantes (Western Blot [WB] y RT-PCR-tiempo real). *Resultados:* (p<0,05 \*vsC y #vsF) El peso corporal y la G fueron comparables en todos los grupos. En las ratas F aumentaron TG (C 1,18±0,06; F 1,93±0,09g/L) e I (C 0,76±0,03; F 1,13±0,05\* ng/mL). La A previno dichos aumentos mostrando valores similares a los obtenidos en C. Los islotes F secretaron más insulina que los C y los FA frente a G16,7mM (C 2,4±0,2; F 3,9±0,5\*; FA 3,0±0,3ng/isl/h). Lo mismo ocurrió con

la actividad de NOXi (U arb/75 isl) con G 3,3mM: C 100,0±3,2; F 165,6±24,8\*; FA 105,7±9,6# y con G 16,7mM: C 105,7±7,1; F 151,2±10,4\* y FA 109,3±10,7#. El agregado de DPI 10 µM al medio de incubación disminuyó la actividad de NOXi (p<0,05). En F aumentó el ARNm de NOXi (gp91PHOX 81% y p22PHOX 28%). A su vez, los ARNm de Superóxido dismutasa 1 (SOD1) y Glutación Reductasa disminuyeron (14 y 13%) y aumentaron los de SOD2 (25%) y Catalasa (71%); la proteína de las 4 enzimas fue menor. **Conclusión:** El aumento paralelo de la actividad de NOXi y de los indicadores endocrino-metabólicos junto con su corrección con A indican que NOXi participa en la disfunción endocrino metabólica inducida por DRF; la prevención de esa disfunción por A sugiere también su utilidad potencial para prevenir situaciones clínicas asociadas a dietas no saludables.

**207. (621) EFECTOS EX-VIVO DE INSULINOSENSIBILIZANTES SOBRE LA CALCIFICACIÓN VASCULAR INDUCIDA POR PRODUCTOS DE GLICACIÓN AVANZADA (AGE)**

Molinuevo M.<sup>1</sup>; McCarthy A.<sup>2</sup>; Sedlinsky C.<sup>3</sup>; Schurman L.<sup>4</sup>; Cortizo A.<sup>5</sup>

Grupo de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Dpto Cs Biológicas, Fac Cs Exactas, Universidad Nacional de La Plata<sup>1 2 3 4 5</sup>  
silvinamolinuevo@yahoo.com.ar

En pacientes con Diabetes mellitus tipo 2, la acumulación de AGE contribuye al desarrollo de complicaciones crónicas macro- y microangiopáticas. La calcificación de la tónica media arterial en estos pacientes es un predictor de morbi-mortalidad asociada a eventos cardiovasculares adversos. Se ha demostrado que los AGE aumentan la calcificación vascular por interacción con su receptor RAGE. Por otro lado, insulinosensibilizantes como la rosiglitazona y la metformina disminuyen la expresión de RAGE, pudiendo así bloquear diferentes efectos deletéreos causados por los AGE. En este trabajo evaluamos el efecto del tratamiento oral con metformina, rosiglitazona o su combinación sobre la calcificación vascular inducida por AGE, empleando un modelo de calcificación ex-vivo de células de músculo liso de aorta (CMLA). Para ello, cuatro grupos de ratas Sprague-Dawley machos adultos recibieron: Control sin tratamiento (C); Metformina 100 mg/kg/día (M); Rosiglitazona 4mg/kg/día (R); o Rosiglitazona + Metformina (RM), durante 15 días. Las CMLA se aislaron de las aortas, y se cultivaron 7 días en un medio de diferenciación conteniendo ácido ascórbico y b-glicerofosfato, en presencia de albúmina sérica bovina control (ASB) o glicada (ASB-AGE), luego de lo cual se evaluó la producción de colágeno tipo 1 (Col1) y mineralización de la matriz extracelular. En el grupo de CMLA control, 100ug/ml ASB-AGE estimuló tanto Col1 (131±7% vs. ASB, p<0.001) como la mineralización (125±7% vs. ASB, p<0.05). Por el contrario, para los grupos M, R y RM los niveles de Col1 y de mineralización fueron consistentemente menores que para el grupo control. Además dentro de cada grupo no se observaron diferencias entre las células incubadas con ASB y ASB-AGE. Estos resultados muestran que el tratamiento oral de ratas con metformina y/o rosiglitazona, disminuye el potencial de las CMLA para secretar y calcificar matriz extracelular, particularmente frente a un exceso de AGE.

## NEUROFARMACOLOGIA 1

**208. (711) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN HCNP EN LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON DEPRESIÓN MAYOR ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO EFECTIVO.**

Bassi S.<sup>1</sup>; Faccioli J.<sup>2</sup>; Finkelsztain C.<sup>3</sup>; Argibay P.<sup>4</sup>

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental-Hospital Italiano<sup>1 4</sup>; Departamento de Psicopatología - Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>2 3</sup>  
sabrinnac.bassi@hospitalitaliano.org.ar

Varios estudios clínicos avalan una relación entre una neurogénesis alterada y los síntomas depresivos. Es más, una disminución

en la neurogénesis se encuentra involucrada en los mecanismos patológicos de la depresión. Se han encontrado correlaciones entre los niveles de moléculas relacionadas con la neuromodulación en el hipocampo con respecto a la sangre periférica. Trabajos recientes sugieren que factores colinérgicos son reguladores de la neurogénesis y participan en los mecanismos moleculares de la depresión como por ejemplo el Péptido Neuroestimulante Colinérgico Hipocampal (del inglés HCNP) el cual se encuentra involucrado en la síntesis de Acetilcolina. Se ha demostrado que la proteína precursora de HCNP se encuentra disminuida en el hipocampo de rata luego de la exposición a estrés. Hipótesis: se podrían detectar alteraciones del sistema nervioso central en linfocitos de sangre periférica. Objetivo: estudiar la expresión del gen HCNP en linfocitos de sangre periférica antes y después del tratamiento y compararlo con los niveles en controles sanos. Se incluyeron pacientes del departamento de Psiquiatría del Hospital Italiano de Buenos Aires. Los pacientes (n=12) fueron diagnosticados usando el criterio del DSM-IV para depresión mayor y se encontraban sin tratamiento antidepressivo (día 0). Estos fueron medicados con venlafaxina durante 42 días (día 42). Los controles (n=16) se aparearon por edad y sexo. Utilizamos la técnica de real time PCR para estudiar la expresión del ARNm de HCNP en linfocitos de sangre periférica. Se consideró estadísticamente significativo p<0.05. Encontramos una disminución de la expresión del gen HCNP en los pacientes día 0 con respecto a los controles (p<0.05) sin encontrarse cambios luego del tratamiento (día 42). Los resultados obtenidos podrían explicarse como una alteración en los mecanismos de expresión del gen en el hipocampo que se estarían evidenciando a nivel periférico en los pacientes depresivos.

**209. (713) EL BLOQUEO DE RECEPTORES AT1 DE ANGIOTENSINA II ATENUA EL DESARROLLO DE LA SENSIBILIZACIÓN CONDUCTUAL A ANFETAMINA EN UN PROTOCOLO DE DOS INYECCIONES.**

Paz M.<sup>1</sup>; Assis M.<sup>2</sup>; Cabrera R.<sup>3</sup>; Cancela L.<sup>4</sup>; Bregonzio C.<sup>5</sup>  
IFEC-CONICET-UNC<sup>1 2 4 5</sup>; Laboratorio de Investigaciones Neuroquímicas Comportamentales y Endócrinas (LINCE-IMBECU-CONICET), Área Farmacología, F.C.M. Universidad Nacional de Cuyo Argentina.<sup>3</sup>  
mcpaz@fcq.unc.edu.ar

Se ha demostrado que una única inyección de anfetamina es suficiente para inducir sensibilización conductual, neuroquímica y neuroendócrina en ratas. La neurotransmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens y caudado putamen juega un rol crítico en las propiedades adictivas de las drogas de abuso. Se han encontrado receptores de Angiotensina (Ang II) tanto en el soma como en terminales de neuronas dopaminérgicas mesolímbicas; además Ang II, actuando sobre sus receptores AT<sub>1</sub>, facilita la liberación de dopamina (DA) en caudado putamen. La hipótesis estudiada plantea que los receptores AT<sub>1</sub> están involucrados en cambios neuroadaptativos inducidos por una única exposición de anfetamina y que dichos cambios se relacionan con el desarrollo de sensibilización conductual y neuroquímica. Con este propósito, examinamos la expresión de una respuesta locomotora aumentada frente a una inyección de anfetamina (0.5 mg/kg i.p.) en animales pre-tratados con candesartan, antagonista de receptores AT<sub>1</sub>, (3 mg/kg p.o x 5 días), tres semanas después de una inyección de anfetamina (5 mg/kg i.p.). Además se testeó la hiperactividad dopaminérgica, midiendo la liberación de 3H-DA *in vitro* en cortes de caudado putamen y núcleo accumbens, inducida por un estímulo de K<sup>+</sup>. Se confirmó la sensibilización conductual en un protocolo de dos-inyecciones de anfetamina y que el pre-tratamiento con candesartan atenúa dicha respuesta. Se demostró que el bloqueo previo de los receptores AT<sub>1</sub> no modifica la respuesta locomotora a agonistas dopaminérgicos. Respecto a la sensibilización neuroquímica testeada realizando experimentos *ex vivo* de liberación de 3H-DA, demostramos que el pre-tratamiento con antagonista AT<sub>1</sub> bloqueó la respuesta aumentada a un estímulo de K<sup>+</sup>. Nuestros resultados sustentan la idea de que el desarrollo de cambios neuroadaptativos inducidos por anfetamina, involucra la activación de receptores AT<sub>1</sub> de Ang II cerebral. Financiación: FONCyT, CONICET, SECyT.

**210. (730) EL BACLOFEN RESTABLECE LOS NIVELES DEL RECEPTOR NICOTÍNICO ( $\alpha 4\beta 2$ ) AUMENTADOS DURANTE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A LA NICOTINA EN RATONES.**

Varani A.<sup>1</sup>; Calvo M.<sup>2</sup>; Balerio G.<sup>3</sup>  
*Instituto de Investigaciones Farmacológicas<sup>1 2 3</sup>; Cátedra de Farmacología-Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA)<sup>3</sup>*  
 avarani@ffyb.uba.ar

Reportes previos de nuestro laboratorio mostraron que el baclofen (BAC), agonista selectivo de los receptores GABA<sub>B</sub>, es capaz de prevenir la expresión del síndrome de abstinencia a la nicotina (NIC). En base a estos resultados, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) analizar la densidad del receptor nicotínico ( $\alpha_4\beta_2$ ), en distintas áreas cerebrales del ratón, durante el síndrome de abstinencia a la NIC; 2) evaluar si la administración previa con BAC es capaz de modificar los niveles del receptor nicotínico alterados durante el síndrome de abstinencia. Se utilizaron ratones macho de la cepa Swiss Webster, los cuales recibieron un tratamiento crónico de NIC (2.5 mg/kg; sc), 4 veces al día, durante 7 días con el objeto de inducir la dependencia. El día del experimento (día 8), un grupo de ratones dependientes recibió una inyección de mecamilamina (MEC) (2 mg/kg; ip), antagonista de los receptores nicotínicos, con el fin de precipitar el síndrome de abstinencia. A otro grupo de animales dependientes se les administró BAC (2 mg/kg; ip), 45 minutos antes de la administración de MEC. Treinta minutos después de la inyección de MEC, los animales fueron sacrificados, se disecaron los cerebros y se congelaron a -70 °C. Posteriormente se obtuvieron los cortes cerebrales, para realizar los ensayos de autoradiografía con [<sup>3</sup>H]-epibatidina. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles del receptor nicotínico ( $\alpha_4\beta_2$ ) aumentaron significativamente en el núcleo habenuclar medial (HbM) ( $P < 0,001$ ) y en el núcleo interpeduncular ( $P < 0,05$ ) durante el síndrome de abstinencia a la NIC. El pretratamiento con BAC restableció los niveles del receptor nicotínico ( $\alpha_4\beta_2$ ) aumentados durante el síndrome de abstinencia en la HbM ( $P < 0,01$ ). En conclusión, la capacidad del BAC para restablecer los niveles del receptor nicotínico ( $\alpha_4\beta_2$ ) durante el síndrome de abstinencia a la NIC, podría estar relacionado con su efecto a nivel conductual, de prevenir la expresión somática del síndrome.

**211. (797) TRANSDIFERENCIACIÓN DE ASTROCITOS MADUROS EN NEURONAS POR EL MACRÓLIDO INMUNOSUPRESOR FK506**

Quintá H.<sup>1</sup>; Galigniana M.<sup>2</sup>  
 IBYME<sup>1 2</sup>; Departamento de Química Biológica de la FCEN-UBA<sup>2</sup>  
 hquinta@leloir.org.ar

Las inmunofilinas (IMMs) son proteínas solubles que unen drogas inmunosupresoras, efecto que sólo ejercen los congéneres de bajo PM. Las de alto PM poseen funciones poco definidas, habiendo demostrado nuestro grupo que forman complejos con receptores esteroidales. Las IMMs se expresan 50 veces más en el sistema nervioso que en otros tejidos. Recientemente reportamos que la droga FK506 posee efecto neurodiferenciador vía la IMM FKBP52 (Quintá et al., J Neurochem 2010). Durante estos estudios notamos que los astrocitos que contaminan las preparaciones neuronales desaparecen en función del tiempo de diferenciación inducido por FK506, por lo que quisimos elucidar si ello se debe a que FK506 promueve la muerte de células gliales o su transdiferenciación a neuronas. Los astrocitos se aislaron de ratas noveles y se enriquecieron en un medio con citosina-arabinoasa hasta una pureza  $\geq 90\%$  (~22 días). Se cuantificó la población astrocitaria (GFAP<sup>+</sup>) frente a otras células gliales, fibroblastos y neuronas, usando como marcadores falloidina (microfilamentos), nestina (células radiales gliales), B<sub>III</sub>-tubulina (microtúbulos neuronales) y Map-2abc (dendritas). El análisis se repitió 7 días post-tratamiento con FK506, observándose una fuerte disminución del número de astrocitos con el consiguiente incremento de células bipolares nestina<sup>+</sup> y/o B<sub>III</sub>-tubulina<sup>+</sup>. En contraste, el control sólo mostró astrocitos. La aparición de células radiales gliales bipolares sugirió que los astrocitos se transdiferenciaron, y al ser

estas células el punto de divergencia hacia neurona o astrocito, se cambió el medio a neurobasal. A los 11 días, el control mostró el fenotipo poligonal típico de astrocitos y ninguna célula positiva para marcadores neuronales, mientras que la mitad de las células tratadas con FK506 mostraron fenotipo neuronal y fueron positivas para B<sub>III</sub>-tubulina y Map-2abc. Postulamos que FK506 produce la transdiferenciación de astrocitos maduros a neuronas, probablemente vía FKBP5.

**212. (815) REMODELADO SINÁPTICO EN NEURONAS HIPOCAMPALES INDUCIDO POR HIPERESTIMULACIÓN GLUTAMATÉRGICA: SU CORRELACIÓN CON UN MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESIÓN Y SU TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

Podestá M.<sup>1</sup>; Codagnone M.<sup>2</sup>; Lorenzo Lopez J.<sup>3</sup>; Lopéz M.<sup>4</sup>; Brusco A.<sup>5</sup>; Wikinski S.<sup>6</sup>; Reines A.<sup>7</sup>  
 Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, UBA-CONICET)<sup>1 2 3 6 7</sup>; Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN)<sup>4 5</sup>  
 podestamf@ffyb.uba.ar

La plasticidad hipocampal estaría involucrada en la fisiopatología de la depresión y en la acción de los antidepressivos. En modelos experimentales de depresión se observó atrofia dendrítica hipocampal, la cual podría deberse a una excesiva liberación de glutamato (GLU). Nuestro objetivo fue estudiar las características del remodelado estructural sináptico del área CA3 del hipocampo en un modelo experimental de depresión, paradigma de desesperanza aprendida (LH), y en su tratamiento farmacológico. En los animales LH observamos un aumento de la longitud de la brecha sináptica y del número de sinapsis con un número alterado de vesículas sinápticas totales. El espesor y longitud de la densidad postináptica resultó, respectivamente, aumentado y disminuido, de manera que el área no se modificó. En estos animales observamos una disminución de los niveles de la molécula de adhesión neuronal (NCAM) y de su isoforma no adhesiva PSA-NCAM, marcador de remodelado sináptico. El tratamiento con fluoxetina (FLX) revertió las alteraciones sinápticas, favoreció la reducción de NCAM inducido por el paradigma y promovió específicamente un aumento de PSA-NCAM en los animales LH. In vitro estudiamos los cambios sinápticos inducidos por la hiperestimulación glutamatérgica en neuronas hipocampales en cultivo en una condición que produce atrofia sin muerte neuronal. El tratamiento con GLU redujo la expresión de las mismas proteínas sinápticas y de las moléculas de adhesión registradas en los animales LH. El tratamiento posterior de dichas neuronas con FLX, si bien no revertió la atrofia, incrementó el área del árbol dendrítico. Nuestros resultados indican que la excesiva liberación de GLU en el área CA3 de los animales LH podría ser responsable de la disminución de NCAM y PSA-NCAM, lo que induciría cambios plásticos y una alteración de la conectividad sináptica hipocampal; y que si bien la FLX no revierte la atrofia dendrítica su acción involucraría el remodelado sináptico dependiente de PSA-NCAM.

**213. (93) MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DEL METABOLISMO DE 2-ARAQUIDONOILGLICEROL EN SINAPTOSOMAS DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.**

Pascual A.<sup>1</sup>; Giusto N.<sup>2</sup>; Pasquaré S.<sup>3</sup>  
 INIBIB<sup>1 2 3</sup>  
 acpascual@criba.edu.ar

El 2-araquidonoilglicerol (2-AG) es un endocanabinoide que participa en la modulación de la transmisión sináptica. Es sintetizado en terminales postsinápticas y actúa a nivel presináptico sobre receptores CB1 y CB2. Las enzimas estudiadas involucradas en su síntesis y degradación son la diacilglicérido lipasa (DAGL) y la monoacilglicérido lipasa (MAGL), respectivamente. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el metabolismo del 2-AG por efecto de agonistas y antagonistas CB1 y CB2 en el envejecimiento fisiológico. Se trabajó con sinaptosomas provenientes de corteza cerebral (CC) de ratas adultas (4 meses) y seniles (28 meses), los cuales fueron obtenidos por centrifugación diferencial y purificados

en gradientes de ficoll. Las actividades de DAGL y MAGL, se ensayaron empleando como sustrato diacil[<sup>3</sup>H]glicerol. Los productos de DAGL y MAGL, monoacil[<sup>3</sup>H]glicerol y [<sup>3</sup>H]glicerol, fueron cuantificados previa separación por CCF o a partir de la fase acuosa, respectivamente. En el envejecimiento se ven incrementadas las actividades de las enzimas de síntesis (498%) y degradación (56%). La presencia de JWH133 (agonista CB2) y de WIN5522-2 (agonista CB1 y CB2) produce un incremento en la síntesis de MAG de 350% y 289% en sinaptosomas adultos, no observándose efectos en sinaptosomas seniles. El empleo de SR144528 (antagonista CB2) en sinaptosomas adultos produce un estímulo menor (111%) que los agonistas, efecto que se mantiene cuando se pre-incuba con SR144528 y WIN5522-2. El bloqueo del receptor CB2 en sinaptosomas seniles lleva la actividad de la DAGL a valores similares a los adultos. Los agonistas y antagonistas modifican la actividad MAGL de sinaptosomas seniles acercándose a valores similares al adulto. Los resultados evidencian un aumento del metabolismo de 2-AG en el envejecimiento, proceso que se ve modulado a partir de receptores cannabinoides.

### ONCOLOGIA 3

#### 214. (33) MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOSO

Milla L.<sup>1</sup>; Rodríguez E.<sup>2</sup>; Cogno S.<sup>3</sup>; Juarranz á.<sup>4</sup>; Rivarola V.<sup>5</sup>

Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales UNRC<sup>1 2 3 5</sup>; Facultad de Ciencias UAM<sup>4</sup> lauramilla2002@yahoo.com.ar

La terapia fotodinámica (TFD), usando ALA y sus derivados, es empleada para tratar el cáncer cutáneo no melanoma. Uno de los problemas de la TFD es la aparición de células resistentes. El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos de resistencia a la TFD en carcinoma de células escamosas (SCC-13). Los objetivos específicos fueron: 1) Obtener poblaciones resistentes (R) a tratamientos repetidos de TFD con Me-ALA en cultivos de SCC-13. 2) Caracterizar morfológica, molecular y funcionalmente las poblaciones R. La población original (parental) se sometió a ciclos de TFD-Me-ALA, habiéndose aislado 10 subpoblaciones R (generaciones). Se estudió la morfología celular a través de la tinción con azul de toluidina. La localización del fotosensibilizador producido a partir del Me-ALA (PpIX) fue analizada por microscopía de fluorescencia. Mediante citometría de flujo se midió el contenido de PpIX intracelular y se estudió el ciclo celular. Empleando Western Blot e inmunofluorescencia indirecta se determinaron los cambios en los niveles y patrones de expresión de proteínas de adhesión célula-célula (E-cadherina y  $\beta$ -catenina), de adhesión célula-sustrato ( $\beta$ 1-integrina, vinculina y p-FAK), proteínas antiapoptóticas (p-survivina) y del citoesqueleto ( $\alpha$ -tubulina y F-actina) en la población celular parental y en las generaciones R. Las células resistentes mostraron una morfología más fibroblástica en relación a las parentales. El fotosensibilizador se localizó en membrana, lisosomas y mitocondrias, tanto en las células R como en parentales. Las células R no mostraron alteraciones en el ciclo celular, ni diferencias marcadas en el contenido de PpIX intracelular con respecto a las parentales, pero presentaron una mayor expresión de p-survivina, de proteínas de adhesión célula-sustrato y de F-actina y cambios en la distribución de F-actina. Los resultados permiten concluir que alteraciones en la expresión y/o la distribución de dichas proteínas podrían actuar como una estrategia de resistencia a la TFD.

#### 215. (85) LA EXPRESIÓN DE NHERF1 EN EL ADENOCARCINOMA DE COLON INDUCIDO POR 1,2 DIMETILHIDRACINA (DMH) EN RATA ES INDEPENDIENTE DE LA FUNCIÓN OVÁRICA

Troncoso M.<sup>1</sup>; Cuello-carrión D.<sup>2</sup>; Guiñazu E.<sup>3</sup>; Montt-guevara M.<sup>4</sup>; Semino S.<sup>5</sup>; Fanelli M.<sup>6</sup>; Cabrini R.<sup>7</sup>; Caron R.<sup>8</sup>; Kreimann E.<sup>9</sup>

IMBECU<sup>1 2 3 4 5 6 8</sup>; CONEA<sup>7 9</sup> troncoso.mariana@gmail.com

NHERF1 es una proteína adaptadora de membrana expresada mayoritariamente en epitelios polarizados, interactúa con Beta-Catenina y forma parte de la ultraestructura de las células epiteliales del intestino y el colon. En condiciones patológicas, en cáncer de mama e hígado, NHERF1 se acumula en el citoplasma y núcleo. En líneas celulares de cáncer de mama, la síntesis de la proteína NHERF1 es regulada por estrógenos pero se desconoce su regulación en el tejido del colon. Varios estudios epidemiológicos describieron un aumento de la incidencia de cáncer de mama y una reducción de la incidencia de cáncer de colon de hasta un 40% en mujeres menopáusicas sujetas a terapia de reemplazo hormonal, sin embargo, los mecanismos de este efecto no han sido dilucidados. La hipótesis de este trabajo plantea que los estrógenos actúan como protectores en el cáncer de colon y NHERF1 sería una proteína mediadora de esta acción. Los estrógenos mantendrían la síntesis de NHERF1 y su rol estructural en el epitelio del colon, la falta de estrógeno y ausencia de NHERF1 contribuiría al proceso de transformación. Con este objetivo, se estudió la influencia estrogénica en la aparición, multiplicidad y grado tumoral en un modelo de carcinogénesis química (DMH) en rata con ovariectomía (OVX). Mediante inmunohistoquímica se estudio la expresión de la proteína NHERF1 y Beta-Catenina. En el protocolo, donde la ovariectomía se realizó en la mitad de la inducción tumoral, se observó un leve aumento en la cantidad de ratas con tumores 7/10 (80%) vs. 12/17 (70,6%) y una mayor cantidad de tumores por rata (1.90 vs. 1.17, p<0.1286) en los grupos DMH+OVX vs. DMH, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. Contrariamente a lo esperado, se observó abundante expresión de NHERF1 en adenocarcinomas de colon de ratas ovariectomizadas, indicando que la expresión de la proteína NHERF1 en este modelo estaría regulada por otros factores y sería independiente de la función ovárica.

#### 216. (189) EFECTO DE ADENOSINA SOBRE FOCOS PRE-NEOPLÁSICOS EN HÍGADO DE RATA

Frontini A.<sup>1</sup>; De La Vega Elena C.<sup>2</sup>; Nicolorich M.<sup>3</sup>; Jauk F.<sup>4</sup>; Milicic S.<sup>5</sup>; Rechiman I.<sup>6</sup>; Jelusic G.<sup>7</sup>; Venera G.<sup>8</sup> Instituto Universitario Italiano de Rosario<sup>1 2 3</sup>; Alumno Adscripto lunir<sup>4 5 6 7</sup>; Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR-CONICET); Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (IQUIFIB-CONICET); Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>8</sup> veronicafrontini@hotmail.com

Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraron que el trifosfato de adenosina (ATP) tiene capacidad de inhibir la proliferación de diversas células tumorales. Contrariamente, en estudios previos demostramos que el ATP exógeno favorece el desarrollo de focos de hepatocitos alterados (FHA) en un modelo de preneoplasia hepática murina de iniciación/promoción. El objetivo del presente estudio fue determinar la probable contribución de la adenosina, producto de hidrólisis del ATP y probado carcinógeno, al efecto observado por la administración del nucleótido. Ratas Wistar macho se dividieron en grupos: sometidas al modelo de preneoplasia (M), tratadas con ADO (M-ADO) o ATP (M-ATP) intraperitonealmente durante las dos fases del modelo y se realizaron los correspondientes grupos controles. Se cuantificaron: a) el número y el volumen de focos preneoplásicos por hígado por la expresión de la forma placentaria de la glutatión S-transferasa de rata (rGSTp), b) el índice proliferativo (IP), por la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y c) el índice apoptótico (IA) mediante HE y TUNEL. El número de FHA por hígado, los FHA expresados como porcentaje del hígado y la relación IP/IA fueron mayores en el grupo M-ATP respecto al grupo M-ADO (p<0,01; p<0,001; p<0,05 respectivamente) y los tres parámetros fueron significativamente mayores en los animales tratados con ATP y ADO respecto al grupo M.

Grupo	FHA/hígado (10 <sup>6</sup> )	FHA % de hígado	IP/IA
M (n=7)	2,75 ± 0,39	0,57 ± 0,09	12,05 ± 0,31
M-ADO (n=7)	5,75 ± 0,72	1,38 ± 0,08	16,96 ± 0,29
M-ATP (n=7)	9,80 ± 1,07	4,59 ± 0,08	26,98 ± 1,19

Los resultados indican que ATP y ADO son protumorales y que el efecto no puede atribuirse exclusivamente a la generación de ADO. Tanto el nucleótido como el nucleósido dirigen las células hacia la proliferación y la apoptosis alterando el balance entre ambos procesos y contribuyendo a la transformación maligna. El trabajo evidencia un efecto intrínseco del ATP sobre la proliferación de los FHA.

- 217. (212) EFECTO DE SLPI (SECRETORY LEUKOCYTE PROTEASE INHIBITOR) SOBRE LA EXPRESIÓN DE CADHERINA EPITELIAL Y MOLÉCULAS RELACIONADAS EN UN MODELO DE CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA MURINO**  
 Lapyckyj L.<sup>1</sup>; Celiano N.<sup>2</sup>; Sanchez M.<sup>3</sup>; Chuluyan E.<sup>4</sup>; Vazquez-levin M.<sup>5</sup>  
*Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CO-NICET - UBA)*<sup>1 5</sup>; *3ra. Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*<sup>2 3 4</sup>  
 lapyckyj@dna.uba.ar

**Introducción:** El SLPI es una serpina sintetizada y secretada por varias mucosas. Además de su actividad antiinflamatoria se le ha adjudicado un rol en la cicatrización de heridas y en la proliferación celular. Si bien su expresión ha sido descrita en varios tumores, su relación con la progresión tumoral no ha sido completamente dilucidada. Cadherina epitelial (cadE) es una glicoproteína transmembrana de 120 kDa involucrada en la adhesión celular y considerada un supresor tumoral. Alteraciones en su expresión, localización y/o funciones han sido asociadas a la progresión tumoral. Hasta el presente no se ha caracterizado la relación entre SLPI y cadE. **Objetivo:** Evaluar el efecto de SLPI sobre la expresión de cadE y proteínas relacionadas. **Metodología:** Se utilizaron células de tumor de mama murino F3II transfectadas con el plásmido pcDNA3-SLPI humano (2C1) y su control (células F3II transfectadas con plásmido pcDNA3). Se evaluó la expresión de cadE, beta-catenina y actina filamentosa, cadherina neural y los factores de transcripción Snail y Twist. Se emplearon técnicas de "Western Immunoblotting", inmunocitoquímica y RT-PCR estándar y en tiempo real. **Resultados:** Comparado con las células control F3II, en las células 2C1 se detectó 1) una disminución (30%) de los niveles de ARNm de cadE, 2) una disminución (55%) de los niveles de la proteína cadE presente en lisados celulares, 3) una localización citoplasmática de cadE y de la proteína adaptadora beta-catenina, 4) alteraciones en el patrón de localización de actina filamentosa, 5) niveles aumentados (500%) del ARNm de Twist, factor de transcripción relacionado con el silenciamiento de cadE. **Conclusión:** El SLPI modifica la expresión y localización de cadE, de otros componentes del complejo adherente (beta-catenina y actina filamentosa) y de factores de transcripción (Twist) que modulan la molécula de adhesión; estos cambios son característicos de células tumorales que presentan un fenotipo más agresivo.

- 218. (276) EFECTO DEL HIPO E HIPERTIROIDISMO SOBRE EL DESARROLLO DE TUMORES MAMARIOS INDUCIDOS POR DIMETILBENZANTRACENO (DMBA) EN RATAS.**  
 López Fontana C.<sup>1</sup>; Maselli M.<sup>2</sup>; Cuello Carrión D.<sup>3</sup>; Jahn G.<sup>4</sup>; Carón R.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, IMBECU, CCT-CONICET MENDOZA*<sup>1 2 5</sup>; *Laboratorio de Oncología, IMBECU, CCT-CONICET Mendoza*<sup>3</sup>; *Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CCT-CONICET Mendoza*<sup>4</sup>  
 clopezfontana@mendoza-conicet.gov.ar

**Objetivo:** determinar si el hipo e hipertiroidismo leves afectan la incidencia y progresión del cáncer de mama (CaM) y, en particular, la apoptosis de las células tumorales. **Materiales y métodos:** Ratas hembras Sprague Dawley fueron tratadas p.o. con una única dosis de DMBA (15mg/rata) a los 55 días de edad y divididas en 3 grupos: eutiroides (EUT; n=10), con hipertiroidismo leve (HIPER, 0,25mg/kg/día de T4 por vía s.c.; n=12) y con hipotiroidismo leve (HIPO, 0,01% de PTU en el agua de bebida; n=9). La latencia, incidencia y progresión de los tumores fueron determinadas en los tres grupos. Cuando el tumor alcanzó un volumen > a 1000 mm<sup>3</sup>, el animal fue decapitado y los tumores fueron extraídos y alicuotados para análisis histopatológico y estudios moleculares. El índice

apoptótico se calculó contando los cuerpos apoptóticos en cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina con objetivo de 60X. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA I y Bonferroni, o con la prueba de Kruskal-Wallis y de Dunn, según la normalidad de la variable. Los porcentajes de incidencia se analizaron por Chi cuadrado. **Resultados:** Observamos una tendencia a una menor latencia de aparición de los tumores en HIPER (87.5±5.3 días) con respecto a HIPO (97.7±7.5 días) y a EUT (91.1±4.8 días). La incidencia tendió a ser mayor en HIPER (75%) que en EUT (70%) e HIPO (33.3%). La velocidad de crecimiento tumoral fue mayor en los tumores de HIPER y EUT que en HIPO (p<0.05). El aspecto histopatológico fue similar en los tres grupos, pero el índice apoptótico fue significativamente menor en las HIPER con respecto a los otros dos grupos (p=0.02). **Conclusiones:** los resultados hasta el momento sugieren que la apoptosis de los tumores mamarios se ve disminuida por el hipertiroidismo, lo que podría dar cuenta de la tendencia observada en la latencia, incidencia y velocidad de crecimiento de los mismos. Estudios moleculares de la apoptosis, actualmente en marcha, podrán confirmar esta relación.

- 219. (395) CARACTERIZACION DE DERIVADOS PORFIRINICOS CON POTENCIAL FOTOQUIMIOTERAPEUTICO SOBRE CELULAS DE CANCER DE COLON HUMANO**  
 Prack McCormick B.<sup>1</sup>; Milla Sanabria L.<sup>2</sup>; Rumie Vittar N.<sup>3</sup>; Carvalho C.<sup>4</sup>; Faustino M.<sup>5</sup>; Neves M.<sup>6</sup>; Cavaleiro J.<sup>7</sup>; Rivarola V.<sup>8</sup>  
*Departamento de Biología Molecular Universidad Nacional de Río Cuarto Argentina*<sup>1 2 3 8</sup> *Departamento de Química Universidad de Aveiro Portugal*<sup>4 5 6 7</sup>  
 b.mcprack@gmail.com

La terapia fotodinámica (TFD) o fotoquimioterapia es un tratamiento contra tumores pequeños y superficiales. Se basa en la combinación de un compuesto fotosensible (FS), luz y oxígeno. Actualmente se busca desarrollar nuevos FSs con mayor acción fotocitotóxica y menor riesgo de mutagénesis. En el presente estudio analizamos la actividad fotodinámica, en células de cáncer de colon humano (línea CaCo-2), de los compuestos tricatiónicos sintetizados Tri-Py<sup>+</sup>-Me-CO<sub>2</sub>H (TPM-CO<sub>2</sub>H), Tri-Py<sup>+</sup>-Me-Ph (Ph) y Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (PF), y el derivado tetracatiónico Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (TMPyP4). Para establecer el potencial citotóxico en TFD ensayamos: 1) toxicidad en oscuridad (ensayo MTT) a distintas concentraciones de droga (1-200 µM) para definir la dosis de tratamiento, 2) viabilidad celular en función del tiempo de incubación y de irradiación (ensayo MTT), 3) localización intracelular de los compuestos (microscopía de fluorescencia); 4) muerte celular pos-TFD (morfología celular en campo claro/ tinción nuclear Hôechst). Los compuestos demostraron inocuidad *in vitro* en ausencia de activación por luz. El estudio de localización intracelular mostró un patrón extranuclear de Ph y PF, disminuyendo su potencial mutagénico. Ambos derivados porfirínicos presentaron mayor acción fotosensibilizante con respecto a TPM-CO<sub>2</sub>H y TMPyP4. La promoción de la muerte celular empleando Ph o PF (1µM) fue dependiente de la dosis de luz y del tiempo de incubación, reduciendo la viabilidad celular a un 15%. El derivado PF ocasionó cambios tempranos en la morfología celular pos-TFD; a nivel nuclear el tipo de respuesta dependió de la dosis de luz. A 5 J/cm<sup>2</sup> predominaron núcleos condensados tipo necrosis (83,0±0,7%), mientras a 3 J/cm<sup>2</sup> se observó un incremento de núcleos fragmentados tipo apoptosis (65,0±0,5%). Nuestros resultados preliminares mostraron que PF y Ph poseen características prometedoras para TFD, y que es posible modular la magnitud y el tipo de muerte en células de cáncer de colon humano. Estas evidencias ameritan continuar con el estudio de dichos derivados.

- 220. (410) POLIMORFISMO P53C72 COMO MARCADOR DE PROGRESIÓN MALIGNA EN CÁNCER DE CUELLO UTERINO INDUCIDO POR HPV.**  
 Gírgulsky L.<sup>1</sup>; Gori M.<sup>2</sup>; López Ferrucci M.<sup>3</sup>; Shayo S.<sup>4</sup>; Mauro J.<sup>5</sup>; Eiguchi K.<sup>6</sup>  
*Cátedra de Bioquímica e Inmunología Usa*<sup>1 2 3 6</sup>; *Servicio de Tocoginecología. Htal. Gral de Agudos "Carlos G Durand"*<sup>4 5</sup>  
 ligrulsky@yahoo.com.ar



El desarrollo de cáncer cervical inducido por HPV involucra múltiples eventos coordinados por las oncoproteínas virales E6 y E7. E6 favorecería la ubiquitinización de p53, interacción considerada como el evento de mayor importancia en la carcinogénesis mediada por HPV. Dentro del codón 72 del gen p53 surge un polimorfismo (prolina P/arginina A); la variante Arginina sería más eficiente en inducir apoptosis y más susceptible a degradación por E6. El rol del polimorfismo de p53 en la epidemiología del cáncer permanece controvertido. Se analizaron 109 muestras de sangre periférica derivadas del Htal. GA "CG Durand", organizadas en 4 grupos: Control n=36, CIN I n=17, CIN II/III n=23, Carcinomas n=33. La determinación de genoma HPV y de los alelos p53 se realizó por PCR con cebadores específicos. Las frecuencias poblacionales del genotipo AA fueron significativamente mayores (0.64) en comparación con las otros genotipos (AP 0.24; PP 0.12;  $p < 0.0001$ ). Las frecuencias alélicas en función del grado de lesión no fueron significativamente diferentes a las poblacionales, sólo observándose diferencias entre grupos. Tampoco se observaron diferencias entre muestras HPV positivas.

Grupo	Frecuencias		
	AA	AP	PP
Control	0,58 *	0,25	0,17
CIN I	0,71 <sup>z</sup>	0,12	0,18
CIN II/III	0,65 <sup>e</sup>	0,22	0,13
Carcinomas	0,67 <sup>g</sup>	0,30 <sup>h</sup>	0,03

\*vs AP/PP  $p < 0,0005$ ; zvs AP/PP  $p < 0,001$ ; evs AP/PP  $p < 0,006$ ; gvs AP/PP  $p < 0,0001$ ; &vs PP  $p < 0,006$ .

Las frecuencias observadas concuerdan con resultados previos y son acordes a las nacionalidades analizadas. Nuestros resultados indicarían que el polimorfismo de p53 (codón 72) no se encuentra relacionado con la mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer cervical inducido por HPV.

## 221. (519) PROTEASAS, TNF-ALFA Y SU RELACION CON EL INHIBIDOR DE PROTEASAS TIMP-2 EN CARCINOMAS MAMARIOS HUMANOS

Laguens G.<sup>1</sup>; Coronato S.<sup>2</sup>; Chambo J.<sup>3</sup>; Vincent N.<sup>4</sup>; Di Girolamo V.<sup>5</sup>;  
*Facultad de Ciencias Médicas UNLP<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*glaguens@med.unlp.edu.ar*

La invasión y la metástasis son los eventos más importantes en la progresión tumoral. En los mismos están implicadas entre otras moléculas, las proteasas sintetizadas por las células estromales y tumorales que degradan la matriz extracelular. La acción de las proteasas depende del equilibrio entre su activación por distintas citoquinas como TNF $\alpha$  y su inhibición, controlada por inhibidores endógenos TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases). Nuestro objetivo fue determinar en carcinomas mamarios humanos infiltrantes la actividad proteolítica, la expresión de TNF $\alpha$  y correlacionarlas con la presencia de TIMP-2. Se utilizaron carcinomas mamarios infiltrantes (n=50). Como control se utilizaron 10 biopsias de pacientes sometidas a mamoplastía. En todos los casos, los sobrenadantes de los homogenatos fueron procesados para electroforesis en gel de poliacrilamida con 0.1% de gelatina para determinar actividad gelatinolítica y se determinó por ELISA la concentración de TIMP-2. Se utilizaron técnicas de IHQ para la determinación de TNF $\alpha$ . Resultados: En el 65,7% de los carcinomas, la expresión de TNF $\alpha$  fue detectada en las células tumorales y en algunas células de la estroma, en el 65% se observó actividad proteolítica. La presencia de TIMP-2 se detectó en el 100% de los homogenatos. Se encontró correlación entre la expresión de TNF $\alpha$  y actividad proteolítica ( $p < 0,01$ ) y correlación inversa entre TIMP-2 con proteasas ( $p < 0,01$ ) y con la expresión de TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). En los controles no se detectó actividad proteolítica ni expresión de TNF $\alpha$ . El nivel de TIMP-2 fue bajo. Conclusiones: la actividad proteolítica detectada en los carcinomas mamarios es influida por TNF $\alpha$  e inhibida por TIMP-2. Estos hallazgos podrían servir como futura estrategia terapéutica para inhibir la progresión tumoral.

## 222. (524) IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL CAPACES DE INTERFERIR VÍAS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR ASOCIADAS A LA TRANSFORMACIÓN MALIGNA

Cardama G.<sup>1</sup>; Comin M.<sup>2</sup>; Alonso D.<sup>3</sup>; Gomez D.<sup>4</sup>; Lorenzano Menna P.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes<sup>1 3 4 5</sup>; Centro Investigación y Desarrollo en Química, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI), Buenos Aires<sup>2</sup>*  
*gcardama@gmail.com*

Las Rho GTPasas son pequeñas proteínas de alrededor de 21 kDa que pertenecen a la superfamilia Ras. Estas proteínas funcionan como interruptores moleculares en un gran número de vías de señalización, siendo Rac uno de los miembros más estudiados. Las Rho GTPasas regulan numerosos procesos celulares como la dinámica del citoesqueleto de actina, la transcripción génica, la regulación del ciclo celular, adhesión celular, entre otros. El desbalance de vías de señalización asociadas a las Rho GTPasas está implicado en un gran número de patologías humanas, incluyendo cáncer. Por ello, en los últimos años se han abordado diferentes estrategias teniendo a las Rho GTPasas como blancos moleculares en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas antitumorales. A partir de una *screening* virtual basado en *Docking* utilizando una biblioteca de aproximadamente 200.000 compuestos químicos de tipo "drug-like", se obtuvo una lista de aproximadamente 30 candidatos que podrían presentar una alta afinidad por el sitio de activación de Rac. Se evaluó el efecto antitumoral *in vitro* de alrededor de 15 compuestos. Como resultado se encontraron 4 compuestos con actividad antitumoral en un panel de 6 líneas tumorales humanas y 2 murinas. Estos compuestos presentaron valores de IC<sub>50</sub> en el rango de 50-150  $\mu$ M. Además varios de estos compuestos fueron capaces de disminuir los niveles intracelulares de Rac activo. Por otra parte se demostró que al menos uno de estos compuestos fue capaz de interferir procesos celulares mediados por Rac1 como polimerización de actina y migración celular en un modelo de glioblastoma. En este sentido, el compuesto fue capaz de bloquear de manera significativa ( $p < 0,01$ ) la capacidad migratoria de células de glioblastoma humano a una concentración de 10  $\mu$ M. Estos resultados sugieren una potencial aplicación de estos compuestos novedosos como agentes antitumorales, ya sea para el tratamiento de tumores donde la actividad de Rac es relevante o para potenciar el efecto de drogas conocidas.

## 223. (552) INHIBICIÓN PROLONGADA DE LA PROGRESIÓN TUMORAL POR SILENCING DE RNA PARA AKT1

Herrera Páez J.<sup>1</sup>; Alippe Y.<sup>2</sup>; Colombo L.<sup>3</sup>; Pérez H.<sup>4</sup>; Biancolini C.<sup>5</sup>; Carreras M.<sup>6</sup>; Poderoso J.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires.<sup>1 2,4 5</sup> Instituto de Oncología Roffo, Universidad de Buenos Aires<sup>3</sup>; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno y Departamento de Bioquímica Clínica-ffyB, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires; CONICET<sup>6</sup>; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires; CONICET.<sup>7</sup>*  
*jujohepa@hotmail.com*

Akt1 es una Ser/Thr quinasa involucrada en la progresión del ciclo celular, apoptosis, metabolismo, tumorigénesis y crecimiento tumoral. La hipótesis general es que el silenciamiento de Akt1 rescata la capacidad apoptótica de las células a corto plazo, reactiva vías de control de la proliferación y revierte el crecimiento tumoral a mediano plazo. El objetivo es inhibir el crecimiento de tumores P07 por administración de *silencing* de RNA para Akt1 (*siAkt1*) mediante electroporación. Se utilizaron ratones Balb/C de 60 días, inoculados subcutáneamente con células tumorales LP07 en el dorso. Los tumores de entre 30 y 60 mm<sup>3</sup> se transfectaron por electroporación con vector vacío (VV) o 25-75  $\mu$ g de *siAkt1*. La actividad del *silencing* se confirmó mediante WB de los homogenatos de tumores silenciados respecto a los controles.

Mediante el ensayo TUNEL se observó un incremento en la apoptosis a las 72 hs en los tumores tratados con *silencing* respecto al VV (VV= 9.52±0.47%, siAkt1 25 µg= 16.31±1.20%, siAkt1 50 µg= 17.15±2.85%, siAkt1 75 µg= 40.13±5.63%; p<0,05). Los tumores transfectorados con 25 µg de siAkt mostraron la máxima regresión inicial observada (53.3%) a las 48 hs de tratamiento (0hs= 0.38±0.04 vs 48hs= 0.18±0.015 mm<sup>3</sup> p<0,05), y se mantuvieron sin crecer en promedio hasta 60 días posteriores (a 10 d: VV= 1.8±0.25 vs 25 µg= 0.34±0.05 mm<sup>3</sup>; a 60 d: 25 µg siAkt= 0,34±0.06; p<0,05). Con 25 y 50 µg se observó recuperación del peso de los ratones a los 10 días respecto al estado pre-tratamiento (VV: 0d= 33±1,4; 10d= 26±1,4; 25 µg 10d= 33±1,4; 50 µg 10d= 33±0,81. p<0,05). Además, los ejemplares inoculados presentan un aumento en la supervivencia respecto de los controles (supervivencia media: VV=11 d, 75 µg= 17d, 50 µg= 39 d, 25 µg= 60 d. p<0,0001). En conclusión, la máxima efectividad del tratamiento se logra con 25 µg de *silencing*, y sus efectos se mantienen en forma muy prolongada por mecanismos diferentes al silenciamiento inicial y con adecuada expresión de Akt1.

**224. (558) 12-LIPOXYGENASA (12-LOX), UN NUEVO REGULADOR DE LA FUNCIÓN ANTIAPOPTÓTICA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GLI1 EN CÉLULAS CANCEROSAS.**

Comba A.<sup>1</sup>; Pasqualini M.<sup>2</sup>; Vara Messler M.<sup>3</sup>; Brunotto M.<sup>4</sup>; Valentich M.<sup>5</sup>; Fernandez-zapico M.<sup>6</sup>; Eynard A.<sup>7</sup>  
I<sup>a</sup> CAT. DE BIOL. CEL. HIST. Y EMBRIOL. INST. BIOL. CEL. FCM.UNC<sup>1 2 3 5 7</sup>; Cat. de Biología Celular A. FO. UNC<sup>4</sup>; Schulze Center for Novel Therapeutics, Mayo Clinic. Rochester MN USA<sup>6</sup>  
andreacomba@hotmail.com

La vía metabólica del ácido araquidónico-lipoxygenasas (AA-LOXs) modula la actividad de factores de transcripción, moléculas claves para la regulación de la expresión génica y la transformación neoplásica. Aunque estos eventos moleculares han sido estudiados, los mecanismos utilizados por esta vía en la expresión de genes no son enteramente conocidos. Nos propusimos evaluar el rol de la enzima 12-LOX y su sustrato, el AA, en la activación de genes anti-apoptóticos implicados en la transformación neoplásica. En líneas celulares cancerosas de mama y páncreas se determinó la actividad transcripcional (Ensayo de luciferasa), viabilidad celular (Azul de Tripán) y apoptosis (Hoechst). Demostramos que la vía AA-LOXs modula la función antiapoptótica del factor de transcripción GLI1. La sobreexpresión de la enzima 12-LOX produjo un aumento significativo (p<0,05) de la actividad de GLI1 en ambas líneas celulares. La co-expresión de 12-LOX y GLI1 produjo un incremento sinérgico en la actividad del mismo. Además, la sobreexpresión de 12-LOX, aumentó significativamente (p<0,05) la actividad del promotor de 4-1BB-luciferasa, un gen anti-apoptótico target de GLI1, comparado con la actividad basal del vector control. Interesantemente, en las células de páncreas la 12-LOX aumentó significativamente la actividad transcripcional del promotor GLI1 (p<0,05) aumentando su expresión, sugiriendo un mecanismo regulador de este factor de transcripción. Inesperadamente el tratamiento exógeno de AA inhibió la actividad transcripcional del promotor 4-1BB mediada por GLI1 y 12-LOX. A su vez el AA produjo un aumento significativo de la apoptosis (p<0,05) y una disminución dosis dependiente, de la viabilidad celular (p<0,05). En conclusión, estos resultados sugieren una función protumorigénica de la 12-LOX independiente del AA a través de la regulación de GLI1 y su función anti-apoptótica, proporcionando una visión novedosa en las complejas vías de señalización implicadas en la carcinogénesis.

**225. (584) DISMINUCIÓN DEL NÚMERO Y TAMAÑO DE LAS METÁSTASIS PULMONARES EXPERIMENTALES (MTTSPEXP) DEL MELANOMA B16F10 POR PRESENCIA PREVIA DE MTTSPXP DEL ADENOCARCINOMA DE MAMA LM3, EN RATONES (BALBXC57BL) F1**

Cresta Morgado P.<sup>1</sup>; Vanzulli S.<sup>2</sup>; Lodillinsky C.<sup>3</sup>; Eiján A.<sup>4</sup>; Colombo L.<sup>5</sup>

Instituto A. H. Roffo. UBA<sup>1 3 4 5</sup>; Inst. Invest. Oncológicas, Fund Maissa, Acad. Nac. Medicina.<sup>2</sup>  
pablo\_crestam@hotmail.com

**Introducción:** En trabajos previos venimos investigando si modificando el microambiente del pulmón con distintas metodologías, podemos favorecer o perjudicar el desarrollo de metástasis en dicho órgano. **Objetivo:** En este trabajo investigamos si la presencia de MttsPEXP de un tumor, como el LM3 (de origen BALB/c), no visibles todavía (solo 6 días post inóculo endovenoso), dificulta o favorece el desarrollo de MttsPEXP de otro tumor no relacionado, como el Melanoma B16F10 (de origen C57BL), que se inocula más tarde. **Material y Métodos:** Hembras adultas (BALBxC57BL) F-1, que aceptan como propios los tumores de BALB y los de C57BL, fueron inoculadas endovenosamente (iv) con 100.000 células LM3 (Grupo Exp) o medio de cultivo (Grupo Control) a día cero. A día 6, se les inoculó iv a los mismos ratones 50.000 células del Melanoma B16F10. A día 21, se sacrificaron las ratonas, se fijaron los pulmones en Bouin, y posteriormente se contaron y clasificaron las MttsPEXP de acuerdo a su tamaño, bajo lupa estereoscópica. Las MttsPEXP de LM3 son blancas y las de B16 son negras, lo que permite diferenciarlas fácilmente. **Resultados:** El número de MttsPEXP negras (B16) fue: Mediana (rango): Controles: 64 (18-156) (n=10) Vs Exp: 22 (8-158) (n=10). El número de ratones con más de 40 MttsPEXP fue: Control: 8 de 10, Vs Exp: 2 de 10. Fischer p=0,023 (<0,05), o Chi cuadrado: p=0,0253 (<0,05). Encontramos que el porcentaje de las MttsPEXP mayores de 1,5 mm de diámetro, disminuyó desde Mediana (rango): 14,5 (0-24,4) (n=10) en los controles, a 0,61 (0-17,7) (n=10) en los Exp. P=0,0245 (<0,05), (Mann Whitney non parametric test). **Discusión:** Demostramos que la presencia previa en el pulmón de micro-metástasis, no visibles aún macroscópicamente, dificulta el desarrollo de metástasis de células que arriban más tarde al pulmón, tanto en su número como en su tamaño, aunque ambos tumores sean muy diferentes (diferente tipo, cepa, origen embriológico, etc).

## ONCOLOGIA 4

**226. (31) EL MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DE LA 2'-NITROFLAVONA INVOLUCRA LA PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK Y LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA INTRINSECA DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA**

Cardenas M.<sup>1</sup>; Marder M.<sup>2</sup>; Roguin L.<sup>3</sup>  
Iquifib Catedra de Química Biológica Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>1 2 3</sup>  
cardenasmariano@gmail.com

En trabajos previos demostramos el efecto antitumoral del flavonoide sintético 2'-nitroflavona (2'-NF) en líneas celulares de leucemias y linfomas. Asimismo comprobamos que este compuesto induce cambios morfológicos típicos de una respuesta apoptótica en células de leucemia promielocítica aguda (HL-60). Con el fin de identificar las vías involucradas en la muerte celular, evaluamos la actividad de las caspasas -3, -8 y -9 en células HL-60 incubadas por distintos tiempos con una concentración 20 µM de 2'-NF. Observamos un incremento máximo de 3,0 ± 0,5 veces en la actividad de la caspasa-3, y de 1,9 ± 0,2 y 3,5 ± 0,2 en la actividad de las caspasas -8 y -9, respectivamente. Por ensayos de Western Blot se evaluó la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 y la liberación de citocromo c al citosol. Los resultados obtenidos luego de 6 h de incubación mostraron un aumento significativo en la expresión de Bax (1,5 ± 0,2) y en los niveles citosólicos de citocromo c (1,6 ± 0,2), sin cambios en la cantidad de Bcl-2 y Bcl-XL. Puesto que las proteína-quinásas activadas por mitógenos (MAPK) participan del balance entre las señales de proliferación y muerte celular, evaluamos si la 2'-NF modifica la actividad de las quinásas ERK 1/2, p38 y JNK. Mientras que la defosforilación de ERK 1/2 fue evidente después de 15 minutos de tratamiento con 2'-NF, la fosforilación de p38 y JNK alcanzó niveles máximos luego de 15 y 30 minutos, respectivamente (1,4

$\pm 0,2$  y  $7,3 \pm 0,4$ ). Los resultados obtenidos indican que la 2'-NF induce la activación de las vías p38 y JNK, relacionadas con procesos de muerte celular, y la inhibición de la cascada ERK 1/2, generalmente asociada a señales de proliferación y supervivencia. Además, la vía intrínseca de la apoptosis interviene en el mecanismo de acción antitumoral de este compuesto. Aunque observamos un aumento en la actividad de la caspasa-8, queda aún por confirmar la participación de la vía extrínseca en la respuesta apoptótica inducida por la 2'-NF.

**227. (95) EFECTOS DEL TRATAMIENTO COMBINADO CON EL GEN DEL CIFN- $\beta$  Y BORTEZOMIB O DICLOROACETATO SOBRE LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA CANINO. ESTUDIOS IN VITRO.**

Rossi U.<sup>1</sup>; Gil Cardeza M.<sup>2</sup>; Villaverde M.<sup>3</sup>; Glikin G.<sup>4</sup>; Finocchiaro L.<sup>5</sup>

Instituto de Oncología Angel H. Roffo<sup>1 2 3 4 5</sup>  
uchiursis@hotmail.com

El melanoma espontáneo canino mucoso (MECM) oral, digital o uveal es un tumor altamente maligno, metastásico y letal que se caracteriza por su rápido crecimiento, invasión local y metástasis temprana. La cirugía, si bien mejora transitoriamente la situación del paciente, no previene la recidiva, ni la aparición de metástasis, ni aumenta significativamente el lapso de supervivencia. En el presente trabajo se ensayaron, en distintas líneas celulares derivadas de MECM, los efectos de la combinación del tratamiento genético del IFN $\beta$  canino (cIFN $\beta$ ) con: i) bortezomib (BTZ, inhibidor reversible del proteosoma 26S; o ii) dicloroacetato (DCA, inhibidor inespecífico de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa). Células control y lipofectadas con el plásmido psCMV- $\beta$ gal o psCMV-cIFN $\beta$  fueron sembradas como monocapas (mc) o como esferoides sobre cubierta de agar sólido (esf). Luego de 24 hs, se agregaron las drogas, y a los 5 días (mc) ó 12 días (esf) se determinó la viabilidad utilizando el reactivo MTS. Para evaluar el efecto de la lipofección del gen cIFN-B sobre las drogas se graficaron las curvas relativizando los 2 tratamientos génicos a su respectivo cero de concentración (100%) para poder determinar la concentración inhibitoria 50 (IC50). Los resultados mostraron que la combinación del gen cIFN $\beta$  con BTZ en mc tuvo un efecto sinérgico en cuatro de las seis líneas evaluadas: Ak (p<0,01), Bk (p<0,01), Ol (p<0,01), Ll (p<0,05); y un efecto aditivo en Br y Bts. En cambio, la combinación del gen cIFN $\beta$  con DCA en las cinco líneas evaluadas mostró efectos variables: sinérgicos (Mo, p<0,05; Ol, p<0,05), antagonistas (Ch, p<0,01) y aditivos (Bk; Cn; Ak). Por otro lado, se observaron efectos aditivos en las dos líneas cultivadas como esf (Ol; Mo). Teniendo en cuenta las escasas opciones terapéuticas efectivas disponibles en la actualidad, los resultados obtenidos estimulan la continuación del desarrollo de nuevas estrategias combinadas para el tratamiento de esta neoplasia.

**228. (202) POTENCIAL REGULACIÓN DE LA IMPRONTA GENÓMICA (IG) DE LOS GENES IGF2 Y H19 EN EL CÁNCER COLORRECTAL (CCR).**

Pellegrini M.<sup>1</sup>; Kahan M.<sup>2</sup>; Vaccaro C.<sup>3</sup>; Argibay P.<sup>4</sup>; Redal M.<sup>5</sup>; Gomez D.<sup>6</sup>

Unidad de Medicina Molecular y Genómica, Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental<sup>1 2 4 5</sup>; Servicio de Cirugía General, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina<sup>3</sup>; Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes<sup>6</sup>  
maria.pellegrini@hospitalitaliano.org.ar

El CCR es una patología que involucra cambios epigenéticos. La IG es una característica epigenética que implica el silenciamiento específico de uno de los alelos parentales. El IGF2, involucrado en la proliferación celular, presenta IG, expresándose solo el alelo paterno. Está localizado río arriba del H19, el cual también presenta IG. H19 ha sido propuesto como un potencial gen supresor de tumores. Además, en la expresión de ambos genes interviene una zona regulatoria que define la IG en la mayoría de los casos. Esta

región presenta áreas diferencialmente metiladas (DMRs): cuando se encuentra sin metilar, un factor nuclear se une específicamente, impidiendo la transcripción del IGF2. El objetivo del trabajo fue evaluar la IG del IGF2 y H19 en muestras tumorales de CCR. Se analizaron 45 muestras de tumor de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma colorrectal estadio I, II y III, del Servicio de Cirugía. Previa firma del consentimiento informado, se realizó la extracción de ADN y ARN. Mediante PCR-RFLP se genotipificaron los polimorfismos RsaI del H19 y ApaI del IGF2. Se analizó la expresión alélica diferencial de ambos en las muestras heterocigotas mediante RT-PCR. El 53% de las muestras resultaron heterocigotas para H19 y 23% para IGF2. Se observó la expresión bialélica de IGF2 en el 66% de las muestras heterocigotas analizadas y 8% para el caso de H19; sugiriendo pérdida de IG (PI) Solo una muestra que presentó PI del IGF2 se observó no expresión del H19, en las restantes se observó la expresión monoalélica del gen. Este resultado sugiere que la zona DMR ubicada entre ambos genes no estaría involucrada en la regulación de la expresión del IGF2. El IGF2 presenta otros DMRs localizados cerca del promotor, en los cuales se ha observado hipometilación provocando la expresión bialélica del gen. Los resultados presentados responderían a este tipo de regulación en donde la expresión del H19 no se ve afectada y tampoco estaría involucrada en la patología.

**229. (283) EFECTO DEL CADMIO SOBRE LA MODULACIÓN DE  $\beta$ -CATENINA, HSP27 Y CAVEOLINA-1 EN CÉLULAS TUMORALES HELA.**

Alvarez Olmedo D.<sup>1</sup>; Cuello Carrión D.<sup>2</sup>; Martinis E.<sup>3</sup>; Pietrobon E.<sup>4</sup>; Wuilloud R.<sup>5</sup>; Ciocca D.<sup>6</sup>; Fanelli M.<sup>7</sup>

Laboratorio de Oncología. IMBECU. CCT-MENDOZA-CONICET<sup>1 2 6 7</sup>; Laboratorio de Investigación y Servicios Ambientales. Quianid. Lisamen. CCT-mendoza-CONICET<sup>3 5</sup>; Cátedra de Histología. IHEM. Universidad Nacional de Cuyo<sup>4</sup>  
ciberdaiana@gmail.com

El metal Cadmio (Cd) es un contaminante ambiental que ingresa al organismo mediante la dieta y/o a través del humo del cigarrillo. Es considerado carcinógeno de tipo 1 asociado con distintos tipos de cáncer humanos. Actúa en todos los estadios del proceso oncogénico, a través de múltiples mecanismos no exclusivos que afectan distintas vías intracelulares. Recientemente, se ha propuesto que es capaz de actuar como metalo-estrógeno vía receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ). También afecta vías independientes del receptor de estrógenos (RE). A nivel de células de túbulo proximal distal, el Cd induce disrupción de uniones adherentes mediadas por E-caderina y translocación de  $\beta$ -catenina al citosol y núcleo, promoviendo la proliferación celular y evasión de la apoptosis. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del Cd sobre la sobrevida y apoptosis celular mediada por la modulación de la expresión y localización de las proteínas  $\beta$ -catenina, Hsp27 y caveolina-1 en una línea celular RE (-). Se trabajó con células Hela sometidas a concentraciones de Cl<sub>2</sub>Cd (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ M) durante tres horas. La citotoxicidad se evaluó por MTT y ensayo clonogénico. La localización y niveles de expresión de  $\beta$ -catenina, Hsp27 y caveolina-1 fueron evaluadas por inmunocitoquímica y por Western blot en extractos proteicos totales, citosólicos y nucleares. La apoptosis se evaluó por Tunel y el índice Bax/Bcl-2. Se encontró que el tratamiento disminuyó la viabilidad hasta un 20% y disminuyó drásticamente la formación de colonias a partir de Cl<sub>2</sub>Cd 5  $\mu$ M. Indujo cambios significativos en los niveles de las proteínas estudiadas. La localización de  $\beta$ -catenina se modificó aumentando su expresión en citoplasma. La relación Bax/Bcl-2 disminuyó significativamente (<1) con respecto al control. El Cd estaría modulando la expresión y localización de  $\beta$ -catenina, Hsp27 y caveolina-1 en células RE (-) afectando capacidades innatas como formación de colonias sin inhibir totalmente su viabilidad.

**230. (372) MECANISMOS DE MUERTE INDUCIDOS POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA BASADA EN ALA EN CÉLULAS DE LEUCEMIA MURINA.**

Diez B.<sup>1</sup>; Teijo M.<sup>2</sup>; Ernst G.<sup>3</sup>; Cordo Russo R.<sup>4</sup>; Hajos S.<sup>5</sup>; Batlle A.<sup>6</sup>; Fukuda H.<sup>7</sup>

Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porfirinas CIPYP CONICET Hospital de Clínicas UBA<sup>1 2 6 7</sup>, Departamento de Química Biológica FCEN UBA<sup>1 2 7</sup> Cátedra de Inmunología, IDEHU, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA-CONICET<sup>3 4 5</sup>  
berenediez@hotmail.com

La terapia fotodinámica basada en ácido 5-aminolevulónico (TFD-ALA) es útil para erradicar células malignas mediante la fotoactivación de protoporfirina IX (PpIX), fotosensibilizante muy eficiente, sintetizado a partir del precursor ALA. Estudiamos los mecanismos de muerte celular inducidos por TFD-ALA en células de leucemia murina: LBR- (sensible a drogas antineoplásicas), LBR-D160 (resistente a doxorubicina) y LBR-V160 (resistente a vincristina). Se estudió la morfología mitocondrial mediante la tinción con MitoTracker Green. En las tres líneas se observó una pérdida de la integridad mitocondrial a medida que aumentó la dosis lumínica en la TFD. Mediante tinción con bromuro de etidio y naranja de acridina se estudió la inducción de apoptosis y necrosis. En las tres líneas celulares se observó un incremento en la morfología apoptótica en función de la dosis lumínica y del tiempo post-TFD (% Apoptosis LBR-, 1 h post-TFD: ctrl -: 10,4±3,7, TFD 5': 23±3,2, TFD 10': 68,7±5, TFD 20': 89,3±2,7; 2 h post TFD: ctrl -: 11,4±0,6, TFD 5': 25,8±0,9, TFD 10': 85,5±3,9, TFD 20': 87,3±6,1). La inducción de necrosis fue muy baja en las tres líneas. Utilizando un anticuerpo específico se evaluó la liberación de citocromo c al citoplasma. Se produjo un aumento en la liberación del mismo cuando las células se trataron con TFD, sugiriendo la activación de la vía apoptótica intrínseca. Se estudió la activación de apoptosis lisosomal utilizando el inhibidor de catepsina D, pepstatina A (pA). En las líneas celulares resistentes se observó una disminución en los niveles de apoptosis al utilizar pA, en comparación con las células tratadas sólo con TFD, mientras que en la línea sensible LBR- no se observaron diferencias (% Apoptosis LBR-, TFD 20': 80,47±5,9, TFD 20' + pA: 79,2±3,1; LBR-D160: TFD 20': 26,1±5,2, TFD 20' + pA: 16,7±4,5; LBR-V160, TFD 20': 60±0,9, TFD 20' + pA: 41,6±4,9). Los resultados obtenidos contribuyen a dilucidar los mecanismos de acción subyacentes a la TFD.

### 231. (388) INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD NF-KB POR CICLINA D1

Rubio M.<sup>1</sup>; Fernández Larrosa P.<sup>2</sup>; Alvarado C.<sup>3</sup>; Ruiz Grecco M.<sup>4</sup>; Micenmacher S.<sup>5</sup>; Costas M.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, IDIM-CO-NICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
maferrubio@yahoo.com.ar

El factor de transcripción NF-κB regula la expresión de CD1. Esta proteína además de regulador de ciclo es capaz de asociarse con varios receptores nucleares regulando su actividad a través del reclutamiento de correguladores. Demostramos previamente que RAC3, coactivador de receptores nucleares y de NF-κB, regula la expresión de CD1 vía un complejo conteniendo al ER y NF-κB. Además, observamos que CD1 se asocia a NF-κB, reprimiendo su actividad y este efecto es contrarrestado por RAC3 o tratamiento con un inhibidor de deacetilasas. En ensayos de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), observamos que existe una secuencia temporal en la formación de complejos a nivel del promotor; donde se observa que la unión de NF-κB a sus secuencias es acompañada por el reclutamiento de RAC3 y el desplazamiento de CD1 y HDAC1. Para corroborar el rol del CD1 endógeno sobre la actividad de NF-κB se realizaron ensayos reporteros, donde células HEK293 fueron transfectadas con un vector que expresa el ARN de interferencia de CD1 (siRNA-CD1) y observamos que la inhibición de CD1 aumenta significativamente la actividad de NF-κB tanto en condición basal como estimulada (170% en células estimuladas con vs sin el siRNA-CD1 p < 0,001) y revierte el efecto inhibitorio de CD1 cuando se aumentan sus niveles mediante un vector de expresión (85% vs 62% inhibición en células que sobreexpresan CD1 sin o con siRNA-CD1 p < 0,001) Para determinar si el reclutamiento de HDAC1 a las secuencias kB dependía de la presencia de CD1 en el promotor, se realizaron ensayos de ChIP en células HEK293 transfectadas

con el siRNA-CD1 y observamos que la inhibición de CD1 endógena correlaciona con menor reclutamiento de HDAC1. Si bien CD1 y RAC3 se encuentran sobreexpresados en distintos tipos de tumores, su antagonismo en la acción proliferativa, sugiere la existencia de mecanismos moleculares más complejos implicados en la progresión tumoral, cuyo estudio contribuiría al diseño de nuevas estrategias para su tratamiento.

### 232. (420) RESPUESTA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA IN VIVO EMPLEANDO DISTINTOS FOTSENSIBILIZANTES Y LÁSER DE 635 NM

Rodríguez L.<sup>1</sup>; Vanzulli S.<sup>2</sup>; Gustavo R.<sup>3</sup>; Petino J.<sup>4</sup>; Alvarez I.<sup>5</sup>; Di Venosa G.<sup>6</sup>; Mamone L.<sup>7</sup>; Gándara L.<sup>8</sup>; Batlle A.<sup>9</sup>; Casas A.<sup>10</sup>

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias<sup>1 6 7 8</sup>  
<sup>9 10</sup>; Servicio de Patología, IEO-FM, Academia Nacional de Medicina<sup>2</sup>; Lumii<sup>3 4 5</sup>; lorenagabrielarodriguez@yahoo.com.ar

La luz puede ser empleada para el tratamiento de tumores superficiales o de acceso por vía endoscópica por medio de la Terapia Fotodinámica (TFD). La acción fotodinámica consiste en el daño celular provocado por un fotosensibilizador (FS) en presencia de luz visible y de oxígeno, generándose especies reactivas que causan la destrucción del tumor. Existen diversos tipos de FSs. Los más utilizados son los derivados de las porfirinas, tales como el Photofrin, las benzoporfirinas (Verteporfin) y las clorinas, tales como el Foscan (meta (tetrahidroxifenil) clorina)). En el presente trabajo se estudió el efecto de la TFD in vivo sobre la regresión tumoral del adenocarcinoma mamario murino LM2 implantado subcutáneamente, empleando diversos FSs y vías de administración. Se utilizó un láser de diodo de 635 nm de fabricación nacional como fuente lumínica. Se inyectaron los ratones con 80 mg Verteporfin/kg, 30 mg Photofrin/kg y 18,75 ul Foscan/kg y luego de 3, 24 y 72 hs respectivamente se irradiaron con una dosis lumínica de 750 J/cm<sup>2</sup>. Se determinaron los volúmenes tumorales a las 24 y 48 hs post tratamiento. Los ratones control sufrieron un aumento del volumen tumoral de un 36,4 ± 6,2 % a las 24 hs y un 46,3 ± 9,3 % a las 48 hs. En los tratados con Verteporfin iv se vio a las 24 hs una reducción del tumor del 57,7%, con Foscan ip 40,5 ± 7,6% y con Photofrin 39,9 ± 9,2%. A las 48 hs continuó la regresión de la masa tumoral, tiempo al cual se sacrificaron los animales para el análisis histológico del tumor. La microscopía reveló que la penetración del láser fue de 1 cm en todos los casos. Se vieron signos de necrosis epidérmica, vascular y tumoral generalizada, con focos de células viables en la profundidad del tumor. Se concluye que el láser de 630 nm de fabricación nacional es una fuente lumínica adecuada para el tratamiento de tumores superficiales con los FSs empleados. En la próxima etapa se evaluará la sobrevida de los ratones tratados con TFD.

### 233. (442) LIGANDOS DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA COMO POTENCIALES AGENTES RADIOSENSIBILIZANTES DE CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO

Martinel D.<sup>1</sup>; Brenzoni P.<sup>2</sup>; Massari N.<sup>3</sup>; Ventura C.<sup>4</sup>; Cocca C.<sup>5</sup>; Rivera E.<sup>6</sup>; Medina V.<sup>7</sup>

Lab. Radioisótopos, Fac. Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

dmartinel@ffyba.uba.ar

Previamente demostramos que la histamina regula diferencialmente procesos biológicos en células mamarias normales y tumorales. Asimismo, reportamos que la histamina es capaz de proteger tejidos radiosensibles frente al daño producido por la radiación ionizante (RI). El objetivo del presente trabajo fue determinar si la histamina y ligandos de sus receptores podían modular la radiosensibilidad *in vitro* de las líneas celulares de cáncer mamario humano MDA-MB-231 y MCF-7. Para ello, la irradiación se efectuó empleando una fuente de <sup>137</sup>Cs (0 a 10 Gy). Las células se trataron 24 h antes de la irradiación y se determinó la proliferación clonogénica a los 7 días post-irradiación. Las curvas de sobrevida se ajustaron al modelo matemático Lineal-Cuadrático, obteniéndose los parámetros de radiosensibilidad (fracción de sobrevida 2 Gy,

FS2Gy, a y b) empleando la ecuación:  $S = e^{-(aD + bD^2)}$ . Asimismo, la proliferación celular se evaluó mediante la incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU), la apoptosis mediante el ensayo de TUNEL y Anexina-V y la senescencia a través de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa luego de una dosis de 2 Gy. Los resultados demuestran que la histamina produjo la radiosensibilización de las células MDA-MB-231 (FS2Gy 0.06 $\pm$ 0.02 vs. 0.22 $\pm$ 0.04, P<0.01) y MCF-7 (FS2Gy 0.16 $\pm$ 0.01 vs. 0.21 $\pm$ 0.02, P<0.05). Este efecto se ve simulado por agonistas del receptor H1 (FS2Gy 0.04 $\pm$ 0.01) y del receptor H4 (FS2Gy 0.06 $\pm$ 0.01) en las células MDA-MB-231 y MCF-7, respectivamente. La RI (2Gy) produjo una disminución de la incorporación de BrdU, un aumento de la apoptosis y la senescencia celular. Estos efectos se intensifican con el tratamiento con histamina y agonista H1 en células MDA-MB-231 y con histamina y agonista H4 en células MCF-7. Podemos concluir que el tratamiento con histamina y sus agonistas modifican la radiosensibilidad de las células de carcinoma mamario y por lo tanto podrían mejorar la eficacia de la radioterapia como modalidad terapéutica para esta enfermedad.

**234. (534) DESREGULACIÓN DE LA VÍA DEL TGFB Y EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN KLF4 EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO.**

Alvarez R.<sup>1</sup>; Sánchez V.<sup>2</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>3</sup>; Raimondi A.<sup>4</sup>

Instituto de Oncología Angel H Roffo<sup>1 3 4</sup>; Cátedra de Anatomía Patológica, FOUBA<sup>2</sup>  
roalvarez\_4@yahoo.com.ar

El carcinoma de células escamosas bucal (CCEB) representa más del 95% de los cánceres de la cavidad bucal, siendo uno de los cánceres más frecuente. Es conocido que TGF $\beta$  cumple un rol en el mantenimiento de la homeostasis tisular y que sus anomalías promueven la tumorigénesis. Se han descrito alteraciones de esta vía en CCEB, pero se desconocen sus efectos en la carcinogénesis bucal. Recientemente se asoció al factor de transcripción KLF-4 con cáncer de esófago y en otros casos con su inducción por TGF $\beta$ , río arriba de p21. Objetivo: Estudiar el estado de activación de la vía de TGF $\beta$  y analizar la posible expresión de KLF-4 y su relación con TGF $\beta$  en CCEB. Se utilizaron líneas celulares de CCEB humano HN12, 13 y 30 y la línea HaCat como control normal. Mediante el ensayo de MTS determinamos que las líneas de CCEB no suprimieron su patrón de crecimiento luego de 24hs de tratamiento con 2 ng/ml de TGF $\beta$ 1, si bien las HN30 mostraron una disminución de la viabilidad del 10% sin ser significativa (ANOVA p= 0.077). Las células HaCat mostraron un efecto inhibitorio del 23% (2 ng/ml). Las tres líneas de CCEB expresaron TBRI y TGF $\beta$ 1, evaluado por western blot. Al analizar la fosforilación de Smad2 las HN12 y 30 presentaron un nivel de activación similar a las HaCat y las HN13 mostraron una menor inducción. El inhibidor del ciclo celular p21 se indujo en las HN13 (137%) y las HN30 (87%) no observando cambios significativos en los niveles de p27. Las HN12 no presentaron cambios. En cuanto a KLF4, las tres líneas lo expresan (KLF4/actina: HN12 1.07; HN13 0.95, HN30 0.62; HaCat 0.32) y solo las HN13 respondieron al TGF $\beta$ 1 disminuyendo un 53% su expresión mientras las HaCat la aumentaron en un 45%. Las líneas de CCEB fueron resistentes al efecto inhibitorio de TGF $\beta$ . Aunque las líneas conservan activación de la vía canónica y p21, excepto las HN12; y regulación de KLF4 las HN13. Esta desregulación de la vía TGF $\beta$  y la expresión anómala de KLF-4 contribuirían a la tumorigénesis bucal.

**235. (559) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE UN COMPUESTO PEPTÍDICO INHIBIDOR DE LA CASEÍNA KINASA 2 (CK2) EN MODELOS DE CÁNCER PULMONAR.**

Benavent Acero F.<sup>1</sup>; Perera Y.<sup>2</sup>; Perea S.<sup>3</sup>; Acevedo Castro B.<sup>4</sup>; Alonso D.<sup>5</sup>; Gomez D.<sup>6</sup>; Farina H.<sup>7</sup>

Laboratorio Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina.<sup>1 5 6 7</sup>; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, La Habana, Cuba.<sup>2 3 4</sup>  
fbenavent@unq.edu.ar

La enzima CK2 es una serina/treonina kinasa altamente conservada y constitutivamente activa en células eucariotas implicada en múltiples funciones celulares. Los niveles elevados en la actividad de CK2 se asocian con la transformación maligna de varios tipos tisulares y con el comportamiento tumoral agresivo. Varios grupos internacionales han tratado de inhibir la actividad de CK2 usando como blanco el sitio de unión del ATP o interfiriendo la transcripción génica mediante el uso de oligonucleótidos antisentido. Una estrategia inhibitoria de la enzima CK2, descrita previamente por nuestro grupo, involucra el desarrollo de un compuesto peptídico denominado CIGB-300 (o P15-Tat), el cual se encuentra diseñado para interrumpir la interacción entre el dominio ácido fosfoaceptor de los sustratos con la enzima CK2. Anteriormente nuestro grupo demostró que el péptido CIGB-300 fue capaz de inducir apoptosis y regresión tumoral cuando se administró por inyección directa en tumores sólidos o por vía sistémica en ratones. En este trabajo se estudió el efecto del péptido CIGB-300 sobre células de carcinoma pulmonar murino y humano. Se evaluó la sensibilidad *in vitro* del compuesto, encontrándose valores de IC<sub>50</sub> de 113,5  $\mu$ M para la línea celular 3LL y de 73,5  $\mu$ M en las células de carcinoma humano H-125. Mediante el uso de microscopía de fluorescencia se corroboró la internalización y la posterior localización intracelular que adopta una variante fluorescente del péptido en ambas líneas celulares. Por otra parte, con el fin de averiguar el mecanismo de entrada del CIGB-300 se estudió su co-localización con marcadores endosomales por medio de inmunofluorescencia. Por último, se evaluó la actividad anti-metastásica *in vivo* del CIGB-300 mediante el ensayo de metástasis experimental, observándose una disminución significativa del número de nódulos metastásicos en ratones tratados con el péptido CIGB-300 a una dosis de 10 mg/Kg por vía sistémica (p<0.05 Mann Whitney). Estos resultados preclínicos sugieren la potencial utilización del compuesto CIGB-300 en carcinomas pulmonares.

**236. (593) IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LA SECUENCIA PROMOTORA DE RAC3**

Alvarado C.<sup>1</sup>; Martínez Noël G.<sup>2</sup>; Micenmacher S.<sup>3</sup>; Fernández Larrosa N.<sup>4</sup>; Ruiz Grecco M.<sup>5</sup>; Rubio M.<sup>6</sup>; Costas M.<sup>7</sup>

IDIM-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
ceciliaalvarado@conicet.gov.ar

RAC3 es un coactivador de receptores nucleares y de NF- $\kappa$ B que está sobreexpresado en tumores hormono-dependientes e independientes y contribuye a su desarrollo. Para evaluar que secuencias regulatorias modulan su expresión se realizó el análisis bioinformático de su promotor. El gen de RAC3 de 155kb, se encuentra en el cromosoma 20 del genoma humano entre las posiciones 16326949-16481709 y codifica un transcrito de 7935pb. Se examinaron los sitios putativos de unión a factores de transcripción de una secuencia nucleotídica de 5kb (zona *upstream* del gen y parte de la zona 5'UTR) con los programas *AliBaba2.1*, *ConSite* y *Genomatix*. Se identificaron sitios consenso de unión a factores de transcripción p53, GR, PR, NF- $\kappa$ B y Snail sugiriendo que la expresión de RAC3 podría estar afectada por vías desreguladas en tumores (ej mTOR) y/o en las vías en las que RAC3 interviene. Además, se analizaron las zonas regulatorias del promotor RAC3 conservadas con otros mamíferos (*Pan troglodytes-Mus musculus-Rattus norvegicus-Canis familiaris-Bos taurus-Monodelphis domestica*). Encontramos 3 regiones altamente conservadas evolutivamente en la región de 5kb del promotor (ECR1-2-3) (*ECR Browser*). ECR1 se encuentra en la región 5'UTR y ECR2 y 3 a -5 y -4000pb respectivamente. Interesantemente, ECR1 y 2 se encuentran conservados entre todos los organismos analizados. Identificamos etiquetas blanco para NF- $\kappa$ B en ECR1-3 y para Snail en ECR2, remarcando la importancia de estos sitios en la regulación de RAC3. Para evaluar la actividad promotora se realizaron ensayos reporteros con un fragmento de 1kb del promotor de RAC3 río arriba del gen de la luciferasa, observándose un 20% menos de actividad en las células no tumorales HEK293 tratadas con Rapamicina 100nM (inhibidor específico de la vía mTOR) respecto a las sin tratar

( $p < 0.001$ ). Por lo tanto la vía mTOR participaría entre otras en la regulación génica de RAC3 aunque se debe dilucidar cuales de los factores predichos actúan específicamente.

**237. (601) IMPLICANCIA DE LOS RECEPTORES A HISTAMINA EN EL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS BxPC3.**

Mohamad N.<sup>1</sup>; Porretti J.<sup>2</sup>; Rivera E.<sup>3</sup>; Gutiérrez A.<sup>4</sup>; Martín G.<sup>5</sup>; Cricco G.<sup>6</sup>

Laboratorio de Radioisótopos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup> mohamadnora@gmail.com

Previamente demostramos que la histamina (HA) regula procesos relacionados con la proliferación, diferenciación y capacidad invasiva de la línea celular indiferenciada de carcinoma ductal de páncreas PANC-1. En este trabajo evaluamos el papel de la HA en otra línea moderadamente diferenciada de carcinoma pancreático BxPC3. Empleando el método clonogénico, demostramos que la HA modula la proliferación en forma dosis dependiente. Se estimula a 100 nM ( $160 \pm 10\%$  vs control,  $p < 0.01$ ), y se inhibe a 10  $\mu$ M ( $63 \pm 6\%$  vs control,  $p < 0.05$ ). El efecto estimulador se reproduce con un agonista del receptor a HA de tipo H3 ( $170 \pm 12\%$  vs control,  $p < 0.01$ ), mientras que la disminución de la proliferación se verificó con agonistas de los receptores a HA de tipo H4 ( $51 \pm 5\%$  vs control,  $p < 0.01$ ). La incorporación de bromodeoxiuridina evaluada por inmunocitoquímica y la expresión de ciclina E y D por inmunoblot confirmaron el aumento de la fracción celular en fase S a las 24h de incubación con agonista H3 y dosis de HA menores a 100 nM. Ensayamos la actividad gelatinolítica de las células BxPC3 mediante zimografía. Las gelatinasas A y B aumentaron con agonistas H4 ( $136 \pm 7\%$  y  $145 \pm 8\%$  vs control respectivamente,  $p < 0.05$ ) y disminuyeron con el agonista H2. La inoculación sc de  $10^7$  células BxPC3 en ratones nude resultó en el desarrollo de tumores con moderada anisocariosis y numerosas mitosis en cordones celulares, algunos con espacios quísticos. El tumor se transplantó a dos lotes de ratones nude que recibieron HA sc (1mg/kg/día) o solución fisiológica. La velocidad de crecimiento fue mayor para los tratados con HA respecto de los controles (T duplicación  $9 \pm 1$  vs  $15 \pm 2$  días,  $p < 0.01$ ). En resumen la HA modula diferencialmente la proliferación celular través de sus distintos receptores, así como la actividad gelatinolítica en la línea BxPC3. Estos resultados junto a nuestros trabajos anteriores en la línea PANC-1, señalan a los receptores a HA como posibles blancos terapéuticos en el cáncer de páncreas.

**238. (646) PDK1 CONTRIBUYE A LA PROGRESIÓN DE MELANOMA Y CONSTITUYE UN NUEVO E INTERESANTE BLANCO TERAPÉUTICO.**

Picco M.<sup>1</sup>; Lorenzo D.<sup>2</sup>; Shah M.<sup>3</sup>; Bravo M.<sup>4</sup>; Ronai Z.<sup>5</sup>; Lopez-Bergami P.<sup>6</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 4 6</sup>; Burnham Institute for Medical Research, USA<sup>3 5</sup>  
picco@dna.uba.ar

Melanoma es la forma más severa de cáncer de piel. El 80% de los tumores primarios son detectados tempranamente y la enfermedad puede ser resuelta por extirpación quirúrgica. Por el contrario, la supervivencia en la fase metastática es reducida debido a la carencia de tratamientos efectivos. En contraste con las tasas de incidencia generales de cáncer, la incidencia de melanoma continúa en aumento ( $> 3\%$  anual). Muchos de los cambios que ocurren en la progresión de melanoma se relacionan con alteraciones que afectan la señalización celular en el melanocito, entre las que se destacan la activación constitutiva de las vías MAPK y PI3K. PDK1 es una quinasa maestra que no sólo juega un rol clave en la vía de PI3K/Akt sino que también activa otras quinastas como PKC, S6K y SGK, implicadas en crecimiento, proliferación y supervivencia celular. En estudios previos hemos demostrado que la expresión elevada de PDK1 en melanoma resulta en un incremento en la actividad de Akt y de PKC. El silenciamiento de PDK1 por shRNA, redujo la activación de Akt y el crecimiento celular de células de melanoma *in vitro*. Para explorar la utilidad

terapéutica de estos hallazgos se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* en las células de melanoma metastático Lu1205 y UACC903 empleando AR12, un inhibidor de PDK1 desarrollado por Arno Therapeutics. AR12 inhibió la actividad de PDK1 y la fosforilación de Akt (Ser473 y Thr308) en forma dosis y tiempo dependiente. AR12 también redujo la fosforilación de ERK y JNK. AR12 inhibió la proliferación de células Lu1205 y aumentó el porcentaje de apoptosis ( $14.3\%$  tratadas vs.  $0.2\%$  controles). AR12 (30mg/kg) redujo significativamente ( $p < 0.001$ ) el tamaño de tumores en ratones xenotransplantados con células UACC903. En conjunto, estos resultados sugieren que PDK1 sería un buen blanco terapéutico en melanomas avanzados. Sin embargo, la utilización de AR12 debe ser estudiada en mayor profundidad, ya que actuaría por mecanismos dependientes e independientes de PDK1.

**PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR 1**

**239. (84) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA POTENCIACIÓN MUSCARÍNICA DEL EFECTO DEL PACLITAXEL EN CÉLULAS MCF-7**

Jacob G.<sup>1</sup>; Español A.<sup>2</sup>; Diez R.<sup>3</sup>; Sales M.<sup>4</sup>

Segunda Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina UBA<sup>1 3</sup>; CEFYBO-CONICET<sup>2 4</sup>  
aespan\_1999@hotmail.com

La combinación de drogas antitumorales es una posibilidad para mejorar su efecto individual y revertir un problema crítico en la terapéutica tumoral como es la resistencia a las mismas. La óxido nítrico sintasa (NOS) así como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) son importantes en la tumorigénesis de la glándula mamaria. Se sabe que las drogas anti-tumorales pueden activar la vía de NF- $\kappa$ B e inducir resistencia a su utilización. Previamente demostramos que la activación de receptores muscarínicos (RM) por el agonista carbacol (CARB) o por el citoestático paclitaxel (PTX) en células de un adenocarcinoma humano, MCF-7, inhiben la proliferación con una concentración efectiva máxima de  $10^7$  M y  $10^8$  M ( $34 \pm 2\%$  y  $33 \pm 3\%$  vs cél. sin tratamiento  $p < 0,001$ ) respectivamente. Utilizando concentraciones sub-umbrales que no tuvieron efecto *per se* en la proliferación de células MCF-7 ni MCF-10A (línea de mama humana normal) investigamos el efecto de la combinación PTX+CARB sobre la proliferación celular y las vías de señalización activadas durante dicho tratamiento. La proliferación celular se determinó por MTT (% de inhibición respecto de control). Determinamos que la combinación de la concentración sub-umbral de PTX ( $10^{-11}$  M) con la de CARB ( $10^{-8}$  M) inhibió la proliferación de células tumorales ( $31 \pm 2\%$   $p < 0,001$  vs cél. sin tratamiento) sin modificar la viabilidad de células normales MCF-10A. En células MCF-7 el pre-tratamiento con 4-DAMP ( $10^{-7}$  M), antagonista de RM3, NCDC ( $10^{-6}$  M), inhibidor de fosfolipasa C (PLC) o L-NMMA ( $10^{-4}$  M), inhibidor de NOS, revirtió el efecto de la combinación de PTX+CARB ( $p < 0,001$  vs PTX+CARB); mientras que la preincubación con MG-132 ( $2 \times 10^{-5}$  M), inhibidor de NF- $\kappa$ B, lo incrementó ( $95 \pm 6\%$  vs PTX+CARB  $p < 0,001$ ). Concluimos que la asociación de un quimioterápico con un agonista muscarínico potencia el efecto citotóxico en células tumorales de mama vía la activación del RM3 a través de las enzimas PLC y NOS, pudiéndose incrementar dicho efecto bloqueando la activación de NF- $\kappa$ B

**240. (151) DISFUNCIÓN ERITROPOYÉTICA POST HEMORRAGIA: ROLES DEL RECEPTOR DE ERITROPOYETINA (EPO-R) Y DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A LA APOPTOSIS/SOBREVIVENCIA CELULAR.**

Stoyanoff T.<sup>1</sup>; Todaro J.<sup>2</sup>; Aguirre M.<sup>3</sup>; Juaristi J.<sup>4</sup>; Brandan N.<sup>5</sup>

Facultad de Medicina Universidad Nacional del Nordeste<sup>1 2 3 4 5</sup>

nbrandan@med.unne.edu.ar

La hemorragia es una complicación frecuente asociada a lesiones traumáticas y quirúrgicas que activa complejos mecanismos compensatorios, causando disfunción de la médula ósea (MO) y comprometiendo funciones vitales del organismo. El objetivo fue

evaluar la respuesta eritropoyética durante 15 días, en un modelo experimental de hipoxia inducida por sangrado; a través de la proliferación, diferenciación y expresión de proteínas ligadas a la apoptosis/sobrevivencia en MO. Ratones (CF-1) fueron sangrados por punción retroorbital (1/3 de la volemia), reponiendo la misma con solución isotónica (NaCl 0.9% ip) y paralelamente lotes controles. Se determinaron parámetros hematológicos y la celularidad diferencial de los precursores eritroides fue evaluada con MGG. El estudio funcional de progenitores medulares se realizó en cultivos clonogénicos. La apoptosis se determinó con AO/EB. Las expresiones de Bax, Bcl-x<sub>L</sub>, Caspasa-3, Epo-R, Citocromo C (Cyt C) y Smac/DIABLO fueron evaluadas por western blotting. Los parámetros hematológicos revelaron una marcada anemia (p<0.01) y la reticulocitosis entre el día 1 y 3 marcó el grado de respuesta eritropoyética. Tanto los progenitores tempranos (BFU-E), como los precursores disminuyeron entre el día 1 y 2, evidenciando su posterior recuperación. Una relación Bcl-x<sub>L</sub>/Bax baja y las sobreexpresiones de Cyt C, Smac/DIABLO y Caspasa-3 fueron coincidentes con la máxima apoptosis observada en los primeros días. En adición, el incremento de la expresión de Epo-R y Bcl-x<sub>L</sub>, se relacionó con la recuperación de los progenitores eritroides. Estos hallazgos demuestran que bajo stress hipóxico se ponen en juego mecanismos adaptativos donde los progenitores/precursores eritroides presentan diferencias en la interacción Epo-R/Bcl-x<sub>L</sub> que condicionan la sobrevivencia o apoptosis celular. Estos se hallan implicados en el mantenimiento de la eritropoyesis, por lo que la alteración de este balance jugaría un rol en la patogénesis de la anemia posterior al sangrado.

**241. (179) LA LEPTINA COMO FACTOR PROLIFERATIVO Y DE SUPERVIVENCIA EN CÉLULAS PLACENTARIAS**

Ibarbalz F.<sup>1</sup>; Maymó J.<sup>2</sup>; Gambino Y.<sup>3</sup>; Calvo J.<sup>4</sup>; Maskin B.<sup>5</sup>; Varone C.<sup>6</sup>

*Depto. Química Biológica - FCEN - UBA*<sup>1 2 3 4 6</sup>; *Hospital Alejandro Posadas*<sup>5</sup>  
*fedelbarbalz@gmail.com*

El diálogo materno fetal durante la implantación involucra múltiples reguladores, como la leptina. Esta proteína de 16 kDa cumple diversos roles en el crecimiento y la supervivencia placentaria. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la leptina aumenta la proliferación celular y supervivencia en células JEG-3 y BeWo. También demostramos que la expresión de leptina está regulada por diferentes efectores placentarios. El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos involucrados en la acción proliferativa y antiapoptótica de la leptina en placenta. Se utilizaron como modelos de trabajo células BeWo, Swan y explantos de placenta humana a término. Se detectó por Western blot la expresión de leptina, caspasa-3, Bcl-2, Bax y p53. La proliferación se determinó por conteo de células e incorporación de <sup>3</sup>H-timidina. Para determinar el efecto de leptina sobre diferentes vías de señalización, se realizaron ensayos de transfección transitoria con construcciones reporteras conteniendo los promotores de Bax y p21. El tratamiento de células Swan con leptina aumentó su proliferación celular hasta 3 veces. El efecto máximo se observó con leptina 100 ng/ml luego de 48 h de incubación. La leptina disminuyó la proteólisis de caspasa-3 de manera dosis dependiente. Además, la disminución endógena de leptina por tratamiento con un oligonucleótido antisentido (2-4 μM) aumentó la apoptosis celular medida por activación de caspasa-3. Luego del tratamiento con leptina los niveles y la relación de Bcl-2 y Bax mostraron diferencias no significativas. Se observó una disminución en el nivel de p53, regulador clave del ciclo celular. Todos estos resultados refuerzan la noción de la leptina como una importante citoquina placentaria, con la función de promover el crecimiento y la supervivencia de células trofoblásticas.

**242. (414) MECANISMOS DE RESISTENCIA A LA APOPTOSIS POR EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA MAGE-I**

Ladelfa F.<sup>1</sup>; Peche L.<sup>2</sup>; Cangelosi R.<sup>3</sup>; Toledo M.<sup>4</sup>; Dusetti N.<sup>5</sup>; Schenider C.<sup>6</sup>; Monte M.<sup>7</sup>

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*<sup>1 3 4 7</sup>; *Laboratorio Nazionale CIB, Ara Science*

*Park, Trieste, Italia*<sup>2 6</sup>; *Laboratorio de Stress Celular, U624-INSEERM, Marsella, Francia.*<sup>5</sup>;  
*fladelfa@qb.fcen.uba.ar*

MAGE-I constituye una familia de proteínas con expresión específica tumoral. Esta familia está constituida por las subfamilias Mage-A, -B y -C. Los genes MAGE-I mapean en clusters en el cromosoma X y poseen una región MHD de alta homología, que define a la familia y presupone que puedan tener efectos biológicos redundantes. Nosotros hemos comparado los efectos de dos miembros, Mage-A2 y Mage-B2, y hemos analizado su efecto sobre la apoptosis, comparado los mecanismos celulares y moleculares involucrados. Nuestros resultados indican que Mage-A2 (y otras proteínas Mage-A) localiza en el núcleo y posee actividad anti-apoptótica. El mecanismo se basa en la unión e inhibición de p53, un factor de transcripción y supresor tumoral capaz de activar apoptosis como respuesta al daño al ADN. La represión de la actividad transcripcional que la expresión de Mage-A2 ejerce sobre p53 se debe a la unión de Mage-A2 a deacetilasas de histonas (HDACs) y a la formación del complejo p53/Mage/HDAC. La expresión de Mage-A2 induce la resistencia a la apoptosis inducida por tratamiento con drogas antitumorales. Por otro lado, la expresión de Mage-B2 también causa la resistencia a la apoptosis, pero el mecanismo se ha revelado diferente. Hemos visto que, a diferencia de Mage-A2, Mage-B2 localiza en los nucléolos y luego del tratamiento con agentes pro-apoptóticos como la Actinomomicina D o luz ultravioleta (UV) Mage-B2 relocaliza rápidamente al nucleoplasma. Además, Mage-B2 no se une a p53 ni a HDACs y su expresión no reprime la actividad de p53. De hecho, Mage-B2 mostró actividad anti-apoptótica en células previamente transfectadas con RNA de interferencia para p53. Finalmente, hemos realizado un screening de interactores proteicos que indica potenciales mecanismos de Mage-B2 para la inhibición de la apoptosis independiente de p53. Nuestro trabajo indica que distintos proteínas MAGE podrían conferir resistencia a drogas antitumorales por distintos mecanismos moleculares.

**243. (471) PERFIL DE PROLIFERACIÓN Y SOBREVIVENCIA ERITROIDE EN MEDULA ÓSEA MURINA BAJO CONDICIONES DE STRESS HIPÓXICO**

Todaro J.<sup>1</sup>; Stoyanoff T.<sup>2</sup>; Aguirre M.<sup>3</sup>; Juaristi J.<sup>4</sup>; Brandan N.<sup>5</sup>

*Facultad de Medicina Cátedra de Bioquímica UNNE*<sup>1 2 3 4 5</sup>  
*juansantiagotodaro@yahoo.com.ar*

La complejidad de la respuesta eritropoyética al entorno hipóxico, exige un control individual en la regulación de los componentes de la maquinaria celular, frente a relevantes situaciones fisiológicas que altera la captación de oxígeno. El objetivo de este trabajo fue evaluar en un modelo murino, el efecto prolongado de la hipoxia hipobárica crónica sobre la apoptosis/sobrevivencia del compartimiento eritroide en médula ósea (MO). Ratones CF-1, fueron sometidos a hipoxia hipobárica continua en cámara (0,4 atm correspondiente a 5800 m) durante 0, 1, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 días. Al término de cada tiempo experimental, se determinaron parámetros hematológicos, celularidad diferencial de precursores (MGG) y la capacidad proliferativa eritroide en cultivos clonogénicos. La apoptosis fue cuantificada por microscopía de fluorescencia (AO/EB), mientras que las expresiones de Bax, Bcl-x<sub>L</sub> y receptor de Eritropoyetina (Epo-R) por inmunoblotting. La hemoglobina, el hematocrito y el porcentaje de reticulocitos periféricos aumentaron progresivamente a lo largo del estudio. El recuento de progenitores y precursores eritroides (Proeritroblastos y Eritroblastos basófilos) mostró un aumento significativo a partir del día 3 hasta el final del ensayo. Los subsets maduros (Eritroblastos policromatófilos y ortocromáticos), retornan a valores controles a partir del día 10. La sobreexpresión de Bax entre los días 1 y 3 fue concordante con los mayores índices de apoptosis observados. Epo-R, fue sobreexpresado a partir del día 1, acompañando al aumento de Bcl-x<sub>L</sub>, el cual fue coincidente con el incremento dramático en el número de progenitores BFU-E y CFU-E (P<0.01) y precursores eritroides. Estos resultados demuestran que en respuesta al stress hipóxico se produce un incremento del compartimiento

eritroideo, resultando en una adaptación a través de la modulación Epo-R/Bcl-x<sub>l</sub> llevando al reequilibrio posterior del sistema.

**244. (502) LA EXPOSICIÓN TRANSITORIA A FACTORES ESTROMALES GENERA RESISTENCIA PERDURABLE AL TAMOXIFENO EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**

Raffo D.<sup>1</sup>; Pontiggia O.<sup>2</sup>; Sampayo R.<sup>3</sup>; Simian M.<sup>4</sup>  
*Instituto de Oncología "Angel H. Roffo", Area Investigaciones<sup>1 2 3 4</sup>*  
*diegoraffo@hotmail.com*

El 70% de los tumores de mama son positivos para receptores de estrógeno y progesterona, siendo el tamoxifeno (T) la terapia de elección para estas pacientes. Demostramos previamente que la fibronectina (FN) y el medio condicionado (MC) de fibroblastos asociados a tumor LM05-F generan resistencia al T en las líneas de cáncer de mama LM05-E y MCF-7. En el caso del MC, la vía PI3K/AKT está implicada río abajo del receptor de EGF y la integrina beta 1. Para la FN, tanto la vía PI3K/AKT como la MAPK/ERK 1/2 están involucradas río abajo de la beta 1. El objetivo de este trabajo fue determinar si el efecto protector de estos factores es reversible, o si por el contrario persiste en el tiempo, incluso cuando han sido eliminados del cultivo. Para ello pre-tratamos células LM05-E cultivadas en medio suplementado con 1% suero fetal bovino charcoalizado (SFBCh) con FN (10µg/ml), MC o vehículo. Luego las células fueron tripsinizadas, lavadas y sembradas en ausencia de factores estromales para evaluar si seguían o no siendo resistentes al T. Para ello se trataron durante 72 hrs con estradiol (10<sup>-8</sup>M) o estradiol más 4-OH-T (10<sup>-6</sup>M) en medio con 1% SFBCh. Se evaluó la muerte celular por incorporación de yoduro de propidio. El pre-tratamiento con MC o FN durante 48 horas confirió resistencia al T (n=3; p<0.001). Esta resistencia perduró por 7 días en ambos casos. Pre-tratamientos de menor tiempo, como 6, 12 y 24 hrs no fueron capaces de inducir resistencia prolongada (n=2). Inhibidores de las vías PI3K/AKT (LY294002; 10 µM, n=2), MAPK/ERK1/2 (PD98059; 10 µM, n=2) y del receptor de EGF (AG1478; 6,4 µM, n=2) no revertieron el efecto protector del MC y FN. Nuestros resultados sugieren que los componentes estromales son capaces de inducir cambios perdurables en las células tumorales mamarias que afectan la respuesta a la terapia endocrina. Este trabajo es subsidiado por la Fundación Susan G. Komen for the Cure (BCTR0600341) y la ANPCYT (PICT 2008-0325).

**245. (625) TOLERANCIA AL DAÑO GENÓMICO LUEGO DE IRRADIACIÓN UVC, NUEVAS FUNCIONES PARA CHK1 EN LA COORDINACIÓN DE LA SÍNTESIS POR TRANSLACIÓN**

Speroni J.<sup>1</sup>; Federico MB.<sup>2</sup>; Mansilla S.<sup>3</sup>; Gottifredi V.<sup>4</sup>  
*Laboratorio De Ciclo Celular Y Estabilidad Genómica, Fundación Instituto Leloir<sup>1 2 3 4</sup>*  
*jsperoni@leloir.org.ar*

Diversos mecanismos celulares se encargan 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 aumento 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 con sitios activos laxos que aceptan bases dañadas como molde. Evidencia experimental obtenida en nuestro laboratorio permitió demostrar que la modulación negativa de diversas proteínas de chequeo afecta el proceso de TLS en presencia de daño genómico. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el mecanismo mediante el cual la proteína efectora y principal de la vía de chequeo, Chk1, es capaz de coordinar la TLS después de UV. Para esto, se utilizó como estrategia experimental la modulación negativa de Chk1 con siRNA e inhibidores químicos. Además, se hicieron mutantes refractarios al siRNA de Chk1 a los cuales se les mutagenizó el dominio de actividad quinasa (KD) y el de unión a PCNA (PIP) y se estudió su efecto sobre marcadores conocidos

de TLS como la modificación post-traducciona (ubiquitinación) PCNA y la organización de una polimerasa permisiva, Pol eta, en estructuras focales después de UV. Por otro lado, se analizó la mutagénesis asociada a una activación deficiente de TLS y se estudiaron cambios en la velocidad de avance de horquillas de replicación mediante análisis de moléculas únicas de ADN. Nuestros datos indican que la función de Chk1 sobre la TLS no está relacionada a su actividad quinasa. Este descubrimiento es verdaderamente importante ya que todas las funciones conocidas de Chk1 dependen de su capacidad para fosforilar proteínas. Demostramos además la existencia de un nuevo dominio proteico mediante el cual Chk1 sería capaz de regular a la TLS.

**246. (633) LA MELATONINA INDUCE LA VÍA APOPTÓTICA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS C6 DE GLIOMA DE RATA. IMPLICANCIAS TERAPÉUTICAS**

Sapienza C.<sup>1</sup>; Alaimo A.<sup>2</sup>; Gorjod R.<sup>3</sup>; Kotler M.<sup>4</sup>  
*Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, Argentina<sup>1 2 3 4</sup>*  
*karlajuknat@hotmail.com*

La melatonina (MLT) es una hormona sintetizada por la glándula pineal. Diversas evidencias indican su acción antiproliferativa en células tumorales aunque aún no se ha descripto una vía de señales que explique este efecto. Nuestra hipótesis propone que la MLT induce apoptosis en células C6 involucrando la vía mitocondrial. En este estudio, hemos demostrado que la MLT (2mM) induce una disminución de la viabilidad celular (ensayo de MTT) a 24 y 48hs en presencia (18±1%, 40±1%) y ausencia de suero (57±1%; 63±1%). Mediante microscopía de contraste de fase se observó una ruptura de la monocapa celular con retracción de los procesos astrocíticos a 24 y 48hs. La tinción con colorante de Hoechst 33258 mostró núcleos con alteraciones morfológicas consistentes con un proceso apoptótico (condensación y fragmentación de la cromatina a 1 y 2mM). Mediante espectrofotometría, se detectó un aumento en la actividad de caspasa 3 en presencia (81±23%, 200±32%) y ausencia de suero (208±40%, 89±29%) para 2mM MLT, a 24 y 48hs respectivamente. La preincubación con PD98059, inhibidor de la actividad de MEK, recuperó totalmente la viabilidad en ausencia de suero; sin embargo, en su presencia, PD98059 aumentó la muerte inducida por MLT. La expresión de proteínas de la vía mitocondrial indicó un aumento de Bax y una disminución de la proforma de Bid, de manera dosis dependiente; los niveles de Bcl-2 y Bcl-XL mostraron concordancia con los resultados anteriores. El análisis morfológico mitocondrial mediante el reactivo MitoTracker Red CMXRos evidenció la presencia de mitocondrias normales (tubulares) en los controles y mitocondrias intermedias y fragmentadas en los tratamientos con MLT. Nuestros resultados sugieren que la MLT es capaz de inducir la vía apoptótica mitocondrial en células C6 de glioma, lo cual la señala como un posible adyuvante en nuevas estrategias terapéuticas.

**247. (651) FOTOTOXICIDAD GENERADA POR RIBOFLAVINAS EN CULTIVO DE QUERATINOCITOS**

Juarez A.<sup>1</sup>; Palmeri C.<sup>2</sup>; Sosa L.<sup>3</sup>; Boetto N.<sup>4</sup>; Pittau R.<sup>5</sup>; Haggi E.<sup>6</sup>; Torres A.<sup>7</sup>; Pons P.<sup>8</sup>  
*Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.<sup>1 2 3 4 5 7 8</sup>, División Tecnología Unidad Académica Río Gallegos, Universidad Nacional de La Patagonia Austral<sup>6</sup>*  
*virginiajuarez@gmail.com*

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento antitumoral que se basa en la muerte celular luego de la activación lumínica de un fotosensibilizador (FS). Dependiendo de la intensidad y tipo de estímulo, la muerte celular se produce por necrosis o apoptosis. La Riboflavina (RF), molécula hidrosoluble, podría utilizarse como FS en TFD. Para aumentar su permeabilidad celular, se acetiló la molécula obteniendo un compuesto lipofílico. Objetivo: Evaluar la toxicidad y determinar el tipo de muerte generado por TFD mediada por RF Hidrosoluble (RFH) y RF Liposoluble (RFL) en células de carcinoma escamoso (SCC-13). Las células se



incUBaron en medio DMEM con RFL o RFH (100 y 50mM), por 30min y se irradiaron con una lámpara (150mW/cm<sup>2</sup>, λ475nm) a densidades de energía de 25, 50, 75J/cm<sup>2</sup>. Se analizó: viabilidad celular mediante rojo neutro, proliferación celular por inmunocitoquímica de Ki-67 e incorporación de BrdU, muerte celular apoptótica y necrótica por citometría de flujo (Anexina V/IP) y respuesta ultraestructural por microscopía electrónica (ME). Análisis estadístico ANOVA-Tuckey. RFL a dosis de luz mayores a 25J/cm<sup>2</sup> y RFH a dosis de luz mayores a 50J/cm<sup>2</sup> disminuyeron la viabilidad celular (p<0.001 vs controles). La proliferación celular disminuyó tanto a 50J/cm<sup>2</sup> como a 75J/cm<sup>2</sup> con ambas RF (p<0.001 vs controles). Con la activación lumínica de 50J/cm<sup>2</sup> ambas RF (50mM), produjeron muerte celular; sin embargo, RFH generó mayor porcentaje de apoptosis, mientras que RFL indujo principalmente necrosis (p<0.05). La ME no evidenció una respuesta específica para cada tratamiento, observándose un amplio rango de signos, desde polarización de las organelas hasta total destrucción celular. Estos resultados permiten concluir que ambas RF pueden utilizarse como FS en TFD. La RFH requiere mayor dosis de luz para su activación, sugiriendo que RFL podría funcionar con mayor efectividad. El próximo objetivo es lograr mayor muerte celular apoptótica ajustando la dosis de luz y de FS.

#### 248. (674) EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MAGE Y LA RESPUESTA DE CÉLULAS DE CARCINOMA DE PRÓSTATA DU145 A DEXAMETASONA

Laiseca J.<sup>1</sup>; Galigniana M.<sup>2</sup>; Monte M.<sup>3</sup>

Lab Biología Celular Y Molecular, Dpto QB, FCEN, UBA<sup>1</sup> <sup>2</sup>

<sup>3</sup> Lab Receptores Nucleares, IByME/CONICET <sup>2</sup>;

jlaiseca@qb.fcen.uba.ar

La dexametasona (Dexa) es un glucocorticoide que se puede utilizar en combinación con el paclitaxel en el tratamiento de tumores de próstata que no responden a terapia hormonal. Recientemente se ha demostrado que el receptor de glucocorticoides (GR) cumple un papel fundamental como inhibidor de la proliferación celular en el cáncer de próstata. Su activación por glucocorticoides induce el arresto celular. MAGE-A (Melanoma antigen-A), forma parte de una familia de proteínas con expresión específica tumoral y su expresión ha sido detectada en un gran número de células tumorales de distintos orígenes. Hemos observado que el tratamiento con Dexa inhibe el crecimiento de las células de cáncer de próstata DU145 y que la transfección de Mage-A6 revierte este efecto. Con el fin de investigar este mecanismo, hemos estudiado el efecto de la expresión de distintos genes MAGE-A sobre la actividad transcripcional de GR, en presencia de Dexa. Nosotros hemos observado que Mage-A6 inhibe la actividad transcripcional de GR. Esto lo hemos demostrado mediante la transfección de células que no expresan GR o MAGE-A (293T) y sobre la actividad de GR endógeno en células de próstata humana, DU145. La actividad transcripcional fue determinada utilizando pMMTV-LUC como gen reportero. Utilizando este sistema hemos observado que Mage-A6 es un potente inhibidor de la actividad transcripcional de GR. Esta actividad de represión transcripcional también fue observada sobre el receptor de mineralocorticoides. La actividad de Mage-A6 sobre GR podría estar asociada a su localización nuclear, ya que la relocalización nuclear forzada de Mage-A4 (normalmente citoplasmático y débil represor de GR) mediante el agregado una señal de localización nuclear (NLS), aumenta la represión sobre GR. Nuestros resultados sugieren que la expresión de genes MAGE-A en tumores de próstata podrían condicionar la respuesta a glucocorticoides.

#### 249. (749) EL ENVEJECIMIENTO CELULAR INVOLUCRA CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA COACTIVADORA RAC3

Ruiz Grecco M.<sup>1</sup>; Fernández Larrosa P.<sup>2</sup>; Rubio M.<sup>3</sup>; Alvarado C.<sup>4</sup>; Micenmacher S.<sup>5</sup>; Martínez Noël G.<sup>6</sup>; Costas M.<sup>7</sup>

Instituto Lanari<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

marinals@gmail.com

Las células senescentes presentan arresto irreversible del ciclo celular y aumentan de tamaño. Presentan un metabolismo activo y actividad  $\alpha$ -galactosidasa a pH ácido. En ellas ocurren rearrreglos en la estructura del ADN por heterocromatinización, induciendo cambios en el patrón de expresión génica, lo cual puede contribuir al desarrollo tumoral de otras células no senescentes. Ocurre por distintos mecanismos: acortamiento telomérico asociado a la vejez (senescencia replicativa) o acumulación de daños genómicos (prematura). Dado que RAC3 es un coactivador que interviene en el remodelado de la cromatina y contribuye al desarrollo tumoral, se investigó su posible participación en senescencia. Se desarrolló un modelo de senescencia prematura por inducción de daño al DNA con dosis subletales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (150 $\mu$ M). Las líneas celulares 3T3L1 y T47D no respondieron al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mientras que las líneas HEK293T, HEK293 y Wi38 presentaron un arresto del ciclo celular (24hs postratamiento). Se observó aumento en el tamaño nuclear a 6 días postratamiento (microscopía de fluorescencia y tinción con Hoescht) del 10%, 20% y 25% en las HEK293T, Wi38 y HEK293, respectivamente y aumento del porcentaje de células  $\alpha$ -gal ácidas positivas a las 72hs de un 29% (HEK293) y 15% (Wi38) (al menos p<0,01 test Tukey). Los niveles de RAC3 (WB) disminuyeron en respuesta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,45, 0,7 y 0,45 veces a las 72hs en HEK293T, HEK293 y Wi38. El factor de transcripción anti-edad FOXO3A, que se inactiva por fosforilación, se activó 0,94, 0,74 y 6,28 veces en HEK293T, HEK293 y Wi38 a las 24hs post H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ensayos de inmunoprecipitación cruzada a las 24 hs post H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugieren que RAC3 y FOXO3A formarían parte de un mismo complejo. Se puede concluir que mientras altos niveles de RAC3 se asocian al desarrollo tumoral, bajos niveles acompañan al estado senescente, probablemente preservando la expansión de células con acúmulo de errores genómicos.

#### 250. (817) EL BALANCE DE LA MUERTE Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN DROSOPHILA

Ferrero P.<sup>1</sup>; Corujo G.<sup>2</sup>; Hernández G.<sup>3</sup>; Lu W.<sup>4</sup>; Abrams J.<sup>5</sup>; Rivera Pomar R.<sup>6</sup>

Centro Regional de Estudios Genómicos; Dpto Ciencias Básicas y Experimentales Unnoba<sup>1</sup> <sup>6</sup>; Centro Regional de Estudios Genómicos<sup>2</sup>; Dept. Biology, McGill University, Montreal, Canada<sup>3</sup>; Dept. Cell Biology, Utsw Medical Center, Dallas, EEUU.<sup>4</sup> <sup>5</sup>;

pferrero@cereg.org.ar

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que se desencadena naturalmente durante la embriogénesis o bien inducido por factores de estrés que comprometen la estabilidad genómica y el medio interno. Uno de los factores capaz de promover la apoptosis es la proteína p53. Mutaciones de p53 disminuyen el efecto de muerte celular y en consecuencia conducen a mayor proliferación. Por otra parte, el factor de inicio de la traducción 4E (eIF4E) se asocia a un incremento de la apoptosis cuando falta. De este modo, ambas proteínas tienen funciones contrapuestas. Nuestro objetivo es dilucidar la relación entre eIF4E y p53 en la regulación del equilibrio muerte vs. Proliferación usando como modelo a *Drosophila melanogaster*. Tanto eIF4E como p53 de *Drosophila* presentan una alta homología con la de mamíferos. En el caso de p53 no existen en *Drosophila* aquellos reguladores de su actividad presentes en mamíferos. Usando mutantes para los distintos factores así como por medio de la sobreexpresión en líneas transgénicas, presentaremos evidencia que sugieren que eIF4E y p53 cumplen funciones opuestas dentro de una misma vía de señalización. Por otro lado se mostrará el efecto de la ausencia y la sobreexpresión de eIF4E en una línea transgénica que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) en respuesta a la activación de p53 por radiaciones ionizantes.

#### BIOTECNOLOGIA 1 Y FARMACOTECNIA 1

#### 251. (103) GENERATION OF MAGNETIC NANOPARTICLE-ADENOVECTOR COMPLEXES AND THEIR USE FOR MAGNETIC FIELD-ASSISTED TRANSDUCTION OF CELL LINES

Schwerdt J.<sup>1</sup>; Hereñú C.<sup>2</sup>; Caminoa L.<sup>3</sup>; Morel G.<sup>4</sup>; Mykha-lyk O.<sup>5</sup>; Goya R.<sup>6</sup>  
 INIBIOLP-Histología B, School of Medicine, UNLP<sup>1 2 3 4 6</sup>; Institute of Experimental Oncology and Therapy Research, TUM, München, Germany<sup>6</sup>  
 ignacio\_sdt@hotmail.com

Neuroprotective gene therapy for Parkinson's disease is a promising approach but up to now gene delivery to the brain requires direct injection of gene vectors into the target brain region. The association of viral vector-based gene delivery with nanotechnology now offers the possibility of developing minimally invasive gene therapy strategies for the brain. In order to explore this alternative we have constructed two adenoviral vectors, RAd-DsRed2 which expresses DsRed2, a red fluorescent protein, and RAd-GFP a vector expressing green fluorescent protein (GFP). The vectors were constructed by the two-plasmid method. These vectors were or are to be complexed with three types of magnetic nanoparticles (MNP) whose physical characteristics are shown in Table 1. Non complexed vectors were tested at varying multiplicities of infection (MOI) in different cell lines (HEK 293, B92, N2a and C2C12 muscle cells) and showed pancellular expression of the corresponding reporter gene. In the rat brain, the vectors showed appropriate levels of expression in the hypothalamus, substantia nigra and the ependymal cell layer. Subsequently, MNP-RAD complexes were generated and tested on the above cell lines under the influence of an external magnetic field. Magnetic field-assisted reporter gene delivery (magnetotransduction) led to a MNP-dose dependent enhancement of gene expression. We conclude that our MNP-RAD complexes are suitable for magnetotransduction *in vitro*. These magnetic adenovectors are to be used for future *in vivo* magnetotransduction studies in the rat brain.

**Table 1.** Characteristics of magnetic nanoparticles suitable for association with adenovectors

Magnetic nanoparticles	Core composition	Mean magnetite crystallite size (nm)	Saturation magnetisation of the core M <sub>s</sub> (emu/g iron)	Electrokinetic potential in water ξ (mV)	Iron content (g Fe / g dry weight)
SO-Mag6-125	Magnetite	11	118	+37.4 ± 1.6	0.50
PB Mag1-4	Magnetite	12	73	+41.3 ± 3.2	ND
AdenoMag	Iron oxide	10	ND	+34.3 ± 5.7	0.49

## 252. (256) AVANCES EN EL DESARROLLO DE UNA VACUNA A SUBUNIDAD CONTRA INFLUENZA HUMANA

Boado L.<sup>1</sup>; Musallo F.<sup>2</sup>; Cargnelutti D.<sup>3</sup>; Sanchez V.<sup>4</sup>; Scodeller E.<sup>5</sup>; Alvarez P.<sup>6</sup>; Mattion N.<sup>7</sup>  
 ICT-MILSTEIN<sup>1 2 6 7</sup>; IMBECU<sup>3 4 5</sup>  
 lorenaboado@yahoo.com.ar

El virus de influenza es el agente causal de una de las enfermedades respiratorias con mayor impacto sobre la población humana, a lo que se suma la posibilidad de una pandemia por eventual aparición de cepas aviares transmisibles entre humanos. En el mercado sólo existen vacunas a virus inactivado, mayormente producidas en huevos embrionados. Sin embargo, los nuevos escenarios incluyen la producción de proteínas virales recombinantes. El objetivo de este trabajo es la producción de una vacuna basada en la expresión de la hemaglutinina viral (HA) por tecnología de ADN recombinante, en el sistema baculovirus (Bv). Desde hace años se ha identificado a la HA como la proteína donde residen los epitopes neutralizantes más importantes. La HA recombinante ha demostrado ser capaz de inducir una inmunidad protectora en animales y humanos y el sistema de producción Bv/células de insecto ha demostrado ser eficiente para su producción (USA patente N° 6.245.532). Para generar esta vacuna se abordaron 3 metodologías: (i) se clonó el gen completo de HA (cepa A/New Caledonia/20/99(H1N1)); (ii) se clonó el mismo gen reemplazando la señal de secreción de HA por la señal de secreción de la glicoproteína gp64 de Bv; (iii) se clonó el dominio HA1 de HA de la cepa potencialmente pandémica A/Vietnam 1203/2004 (H5N1), dominio donde residen la mayoría de los epitopes neutralizantes. Estos genes se transfirieron a Bv por tecnologías convencionales. En los 3 casos se obtuvieron y clonaron los rBvs expresando las proteínas heterólogas luego de la infección de cultivos de células de insecto. Estas fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot, utilizando reactivos de referencia de la OMS. Dada la falta de producción nacional de vacunas contra la gripe, la utilización del sistema Bv/células de insecto, que ya fue aprobado por la FDA para producción de vacunas pandémicas, habilitaría un sistema seguro y de fácil escalado para la cobertura de las necesidades locales de vacuna antigripal.

proteína gp64 de Bv; (iii) se clonó el dominio HA1 de HA de la cepa potencialmente pandémica A/Vietnam 1203/2004 (H5N1), dominio donde residen la mayoría de los epitopes neutralizantes. Estos genes se transfirieron a Bv por tecnologías convencionales. En los 3 casos se obtuvieron y clonaron los rBvs expresando las proteínas heterólogas luego de la infección de cultivos de células de insecto. Estas fueron analizadas por SDS-PAGE y western blot, utilizando reactivos de referencia de la OMS. Dada la falta de producción nacional de vacunas contra la gripe, la utilización del sistema Bv/células de insecto, que ya fue aprobado por la FDA para producción de vacunas pandémicas, habilitaría un sistema seguro y de fácil escalado para la cobertura de las necesidades locales de vacuna antigripal.

## 253. (331) PRODUCCIÓN DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL DIRIGIDO CONTRA LA PRIMERA REGIÓN EXTRACELULAR DEL CFTR

Valdivieso A.<sup>1</sup>; Sánchez F.<sup>2</sup>; Taminelli G.<sup>3</sup>; Pagano E.<sup>4</sup>; Clazure M.<sup>5</sup>; Massip Copiz M.<sup>6</sup>; Schulman G.<sup>7</sup>; Teiber M.<sup>8</sup>; Santa Coloma T.<sup>9</sup>  
 Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
 agvaldivieso@gmail.com

El CFTR es un canal de cloruro regulado por ATP y AMP cíclico. Este canal se localiza en la membrana plasmática y su ausencia causa la enfermedad conocida como Fibrosis Quística. Existen varios anticuerpos monoclonales contra el CFTR. Unos reconocen sólo la proteína en su estado nativo y otros en su forma desnaturalizada, lo que restringe su versatilidad. Además, la mayoría son poco específicos y sensibles. Los de mayor título y especificidad reconocen únicamente regiones intracelulares del canal. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un anticuerpo monoclonal dirigido contra la primera región extracelular del CFTR, capaz de reconocer al canal en su forma nativa y desnaturalizada. Este anticuerpo monoclonal nos permitiría en el futuro desarrollar de un aptámero capaz de reconocer la misma región extracelular del CFTR. Para obtener el anticuerpo se inyectaron 3 ratones BALB/c con un péptido sintético que contenía la secuencia correspondiente a la primera región extracelular del CFTR (primer "loop"), aminoácidos 102-117. Fue elegida esta región extracelular por su alto índice antigénico, de acuerdo al programa CGC (Genetic Computer Group). El péptido fue acoplado a KLH y luego de cuatro inyecciones se seleccionaron los ratones con mayor título. Los hibridomas se generaron usando la técnica de Köhler y Milstein. Luego se realizó la expansión clonal del hibridoma seleccionado y se extrajo el fluido ascítico. Se determinó la especificidad del anticuerpo producido mediante Western blots, utilizando proteínas de células Caco-2. El anticuerpo resultó altamente específico y sensible en Western blots, pero al igual que el resto de los anticuerpos existentes, reconoce muy débilmente el CFTR en la membrana extracelular. El próximo paso será producir aptámeros contra la misma región del CFTR y evaluar su utilidad en reemplazo de los anticuerpos. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (AGV y MMMC) y ANPCYT(MC).

## 254. (365) POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE PROTEÍNA DE SOJA COMO VEHÍCULO DE HONGOS NEMATÓFAGOS

Sagúés M.<sup>1</sup>; Purslow P.<sup>2</sup>; Fernandez S.<sup>3</sup>; Fuse L.<sup>4</sup>; Iglesias L.<sup>5</sup>; Saumell C.<sup>6</sup>  
 U.N.C.P.B.A.; C.O.N.I.C.E.T.<sup>1 4 5 6</sup>; UNIV. GUELPH<sup>2 3</sup>  
 federica@vet.unicen.edu.ar

La aparición de resistencia antihelmíntica en el ganado, su-  
 mada, a la preocupación por consumir alimentos inocuos para la salud humana, ha estimulado el desarrollo de otros métodos de control parasitario como el Control Biológico (CB). Entre los enemigos naturales de las larvas de nematodos gastrointestinales se encuentra el hongo *Duddingtonia flagrans* el cual tiene la capacidad de reducir el número de larvas en heces y sus clamidospores de atravesar el tracto gastrointestinal y mantener su viabilidad facilitando la posibilidad de desarrollar formulaciones farma-

céuticas. Los sistemas de liberación controlada de compuestos activos han sido rápidamente desarrollados en la década pasada. Proteínas presentes en polímeros naturales tienen la capacidad de actuar con una amplia gama de compuestos y presentar uniones reversibles con moléculas activas, protegiéndolas hasta la liberación en el sitio deseado. Dentro de las proteínas naturales se encuentran los polímeros de proteína de soja (PPS), que unido a otros ingredientes forman una estructura estable y resistente a la degradación. El objetivo de este ensayo fue evaluar la incorporación del hongo nematófago en el PPS y evaluar su resistencia a la degradación en el rumen de ovinos. El primer paso fue unir el hongo con el ingrediente que le da la estructura física al PPS, el dialdehído de almidón, luego de la incUBACIÓN, se administró a un ovino canulado en el rumen. El PPS se extrajo semanalmente para la observación de la estructura física y heces fueron recolectadas para observar la capacidad predatora del hongo en placas de Petri con ágar bacteriológico al 2% y *Panagrellus* spp. La viabilidad de los clamidosporos no se afectó cuando fue incorporado en los PPS. La liberación de éstos a través del PPS fue la adecuada. La permanencia del PPS en el rumen fue de 4 semanas. La unión de estos dos elementos podría ser de gran utilidad para crear un sistema de liberación controlada pudiendo ser utilizada con agentes de CB.

**255. (419) EXPRESIÓN SIMULTÁNEA DE LOS GENES PARA LA GREEN FLUORESCENT PROTEIN Y EL PÉPTIDO TÍMICO TIMULINA UTILIZANDO UN SISTEMA ADENOVIRAL BIDIRECCIONAL REGULABLE**

Poch B.<sup>1</sup>; Reggiani P.<sup>2</sup>; Rimoldi O.<sup>3</sup>; Goya R.<sup>4</sup>  
*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>1 2 3 4</sup>*  
*brendapoch@yahoo.com.ar*

La timulina es un nonapéptido tímico (FTS) coordinado al ión Zn<sup>2+</sup>. En estudios previos hemos implementado terapia génica neuroendocrina utilizando nuestro vector adenoviral recombinante (RAAd) que expresa constitutivamente un gen sintético para un análogo de timulina (metFTS). La utilización de sistemas regulables de expresión génica permitiría la manipulación de la expresión de la timulina. Así, con el objetivo de disponer de un sistema vectorial más flexible y sofisticado, construimos un sistema bivectorial regulable Tet-Off que expresa simultáneamente los genes de la green fluorescent protein (GFP) y el metFTS. Generamos los siguientes vectores virales: 1) RAAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>-tTA, unidad de respuesta en la cual la transcripción de los transgenes se encuentra bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina (DOX), y 2) RAAd-tTA, unidad transactivadora que expresa la proteína reguladora tTA. Células CHO incUBadas con ambos RAAds (1x10<sup>7</sup>pfu/ml), en ausencia de DOX (48hs), mostraron una eficiente expresión de GFP (evidenciada por fluorescencia) y de metFTS (50pg/ml, en los sobrenadantes). La expresión de ambos genes pudo inhibirse por el agregado de DOX (1, 2 y 20ug/ml). Inyectamos ratas machos con ambos RAAds (im. 1x10<sup>9</sup>pfu/rata c/u, N=5) o con solo el RAAd-(GFP-TRE-FTS)<sub>bidir</sub>-tTA (N=5). Se dosó timulina sérica en los días experimentales: -2, 5, 10, 15, 20 y 25. En los días 15 y 20, se les adicionó DOX (1ug/ml) y DOX más dexametasona (15mg/l) en al agua de bebida, respectivamente. Inicialmente, los niveles de timulina sérica subieron (384±74fg/ml), con DOX desapareció la timulina recombinante (102±16fg/ml) y con el corticoide la endógena (18±4fg/ml). Este sistema fue también activo cuando se lo inyectó en cerebro de rata. La disponibilidad de este sistema adenoviral regulable de expresión permitiría determinar cuales son las ventanas críticas en las que actúa la timulina sobre la maduración del sistema neuroendócrino durante la vida postnatal en roedores.

**256. (689) EFICIENCIA Y EFECTOS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS BOVINOS.**

Sipowicz P.<sup>1</sup>; Farini V.<sup>2</sup>; Moncalero V.<sup>3</sup>; Laudicina A.<sup>4</sup>; Alvarez Heduan F.<sup>5</sup>; Radrizzani M.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín,*

*Buenos Aires, Argentina.<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
*pablosipowicz@hotmail.com*

La citometría de flujo es aplicada en la reproducción bovina, donde existe una preferencia en la producción de hembras para la industria láctea y de machos para la producción de carne, en lo que se conoce como sexado de semen. El sexado de semen favorece la predeterminación del sexo y se basa en la separación de espermatozoides por la diferencia en el contenido de ADN que presentan debido al tamaño del cromosoma sexual que portan. Sin embargo, el uso de semen sexado ha resultado en menores tasas de preñez y crías de sexo no deseado. En el presente trabajo se desarrollaron sondas de ADN para corroborar, mediante la hibridación *in situ* fluorescente, la eficiencia del proceso de sexado y se estudió el efecto del proceso de citometría de flujo sobre aspectos de la fisiología (motilidad, integridad y funcionalidad de membrana, apoptosis, compactación de cromatina, presencia de histona H2AX) de los espermatozoides en semen sexado y sin sexar (control) del mismo toro y lote de sexado. Se relacionaron los efectos del proceso sobre la fertilidad de los espermatozoides mediante fertilizaciones *in vitro* con semen sexado y sin sexar. Pudimos comprobar que el proceso de citometría de flujo presenta la eficiencia de separación descrita teóricamente (>86% de separación en semen sexado vs. 50% control). Observamos mayor proporción de espermatozoides con daños en membrana (>71% en semen sexado vs. >50% en control) y una reducción de la fertilidad de espermatozoides sexados (0% de blastocistos vs. 12,34% en control). No observamos mayor proporción de espermatozoides en semen sexado con alteraciones tanto en compactación de cromatina como en presencia de histona H2AX (>0,67% vs. 0,33% y >40% vs. 38% en control respectivamente). Concluyendo, se desarrollaron sondas de ADN fluorescentes que permiten determinar la eficiencia de separación de espermatozoides por citometría de flujo en pequeñas muestras de semen. No se observaron daños a nivel genómico pero sí a nivel de membrana.

**257. (719) OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO MEDIANTE EL DESARROLLO DE UN NUEVO TEST DE FISH PARA 13 CROMOSOMAS.**

Moncalero V.<sup>1</sup>; Laudicina A.<sup>2</sup>; Perandones C.<sup>3</sup>; Ahumada A.<sup>4</sup>; Carrere C.<sup>5</sup>; Rey Valzacchi G.<sup>6</sup>; Radrizzani M.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín, Buenos Aires, Argentina.<sup>1 2 3 7</sup>; Procrearte, Red de Medicina Reproductiva y Molecular.<sup>3 4 5 6</sup>;*  
*vemoncalero@hotmail.com*

El Diagnóstico Genético de Preimplantación (PGD) es la estrategia que posibilita el conocimiento del status cromosómico embrionario, reduciendo significativamente la tasa de abortos espontáneos (AE) debida a aneuploidías. La realización de la misma en estadio de blastocisto se propone como una variante metodológica que permitiría superar las limitaciones actuales del PGD que evalúa sólo una célula. La detección de aneuploidías se realiza habitualmente mediante FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) con evaluación de aneuploidías para 8 cromosomas (X, Y, 13, 15, 16, 18, 21 y 22). Dicha evaluación detecta sólo el 70% de las aneuploidías observadas en AE. Los objetivos del presente trabajo son Desarrollar la puesta a punto de la técnica de biopsia de trofoectodermo en blastocisto y optimizar la estrategia de FISH para permitir la evaluación con 13 sondas sin incrementar el tiempo requerido para el diagnóstico embrionario. Se realizaron biopsias de trofoectodermo en 26 blastocistos que fueron diagnosticados como aneuploides mediante SGP (screening genético de preimplantación) en el 3er día del desarrollo. Se realizó FISH con sondas para cromosomas 4, 7, 9, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y. Para optimizar la técnica se modificaron la desnaturalización de ADN, la concentración de las sondas y los componentes de la mezcla de hibridación. Los tiempos de incUBACIÓN se redujeron a 30 minutos y se realizaron 5 hibridaciones sucesivas. Se analizaron 26 células provenientes de 3 embriones. La eficiencia global del FISH fue del 97%, siendo del 100% para las sondas de los cro-

mosomas 13, 18 y 21 y del 94% para las restantes. Los resultados obtenidos muestran la distribución de las 13 sondas estudiadas en blastómeros y en blastocistos. La optimización realizada a la técnica de FISH permite incrementar la capacidad diagnóstica del 70 al 90% de las aneuploidías embrionarias, posibilitando un incremento significativo de la tasa de embarazo en protocolos de FIV-ICSI.

**258. (723) UN NUEVO MÉTODO DE FISH QUE PERMITE MÚLTIPLES HIBRIDACIONES EN MINUTOS Y PRESERVA LA MUESTRA**

Laudicina A.<sup>1</sup>; Farini V.<sup>2</sup>; Sipowicz P.<sup>3</sup>; Moncalero V.<sup>4</sup>; Alvarez-heduan F.<sup>5</sup>; Radrizzani M.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín, San Martín, Buenos Aires, Argentina<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
alaudicina@unsam.edu.ar

La práctica médica requiere de estudios moleculares complejos como la hibridación de sondas fluorescentes "in situ" o su acrónimo del inglés "FISH". Esta técnica es la principal herramienta para estudios citogenéticos requeridos para determinar el análisis en médula de Leucemias, líquido amniótico de embarazos en curso, cardiopatías congénitas y cáncer de mama entre otras. En muchos de estos casos se requiere rapidez y, a veces, confirmaciones con otras sondas. Nuestro objetivo es la obtención de un tratamiento que preserve la muestra de ADN permitiendo aplicar la técnica de FISH varias veces a una misma célula. Para ello los extendidos celulares fueron desnaturalizados en una nueva solución de desnaturalización fría (NaOH en Etanol) y luego son deshidratados para preservar el DNA desnaturalizado. La hibridación se realizó con sondas diluidas en una mezcla de hibridación modificada y desnaturalizadas por calor. Cada preparado se incubó 30 minutos a 45° C, se enjuagó el exceso de sonda y se tiñó con DAPI para observar al microscopio de fluorescencia. En las rondas de hibridación subsiguientes los tiempos de desnaturalización se redujeron a 30 segundos. Esta técnica fue puesta a punto para fijaciones de líquidos amnióticos, médula, sangre periférica y semen. En todos los casos se lograron hibridaciones sucesivas (2 a 5) que pudieron ser analizadas el mismo día, preservando la morfología cromosómica a lo largo de todo el proceso. En ningún caso se observaron trazas de hibridaciones anteriores que pudieran dar lugar a confusiones de interpretación. Concluyendo, la desnaturalización del ADN genómico mediante NaOH permite con sondas múltiples de FISH hasta 5 hibridaciones sobre la misma célula en horas. Este nuevo procedimiento facilita y permite el análisis de alteraciones citogenéticas complejas en leucemias y también podría emplearse para el diagnóstico genético preimplantatorio.

**259. (816) OBTENCIÓN DE APTÁMEROS CAPACES DE DETECTAR ESPERMATOZOIDES EN PROCESO DE APOPTOSIS.**

Radrizzani M.<sup>1</sup>; Farini V.<sup>2</sup>; Sipowicz P.<sup>3</sup>; Moncalero V.<sup>4</sup>; Laudicina A.<sup>5</sup>; Alvarez Heduan F.<sup>6</sup>; Perandones C.<sup>7</sup>; Radrizzani M.<sup>8</sup>  
Universidad Nacional de San Martín<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
martin.radrizzani@gmail.com

Los espermatozoides en los cuales se disparan estos procesos de apoptosis se produce una fragmentación del ADN, que puede afectar severamente la fertilidad en humanos así como en otros mamíferos. Los espermatozoides que han expresado fosfatidilserina en la superficie celular separados con las columnas de anexina V mejoran notablemente su fertilidad. Los aptámeros son, generalmente, secuencias oligonucleotídicas (DNA o RNA) obtenidas "in vitro". Consisten en una secuencia lineal de nucleótidos que en solución tienen la capacidad de unirse específicamente y con gran afinidad a una gran variedad de moléculas blanco. La ventaja sobre los anticuerpos es que no poseen restricciones inmunológicas y son capaces de reconocer conformaciones diferentes de una misma proteína. El objetivo del trabajo es aplicar la tecnología de aptámeros contra células espermáticas in situ para identificar marcadores moleculares del estado del espermatozoide en el semen. Utilizamos como blanco a espermatozoides fijados después

de tratarlos a 54° C durante 3 min. Los aptámeros elegidos son unidos espermatozoides sin tratar en restas y aquellos aptámeros que reconocen diferencialmente a los espermatozoides tratados, son clonados y secuenciados. Pudimos obtener dos clones son capaces de reconocer a los espermatozoides que pierden su movilidad en ensayos in vivo. Estos clones colocalizan con tinciones vitales con el colorante de Hoechst y con la anexina V- fluorescente. Muy pocos espermatozoides marcaron solamente con la Anexina V y no con nuestros aptámeros y cuando colocalizan, lo hacen de forma incompleta indicando que reconocen moléculas diferentes a la fosfatidilserina. El reconocimiento del aptámero pudo verse en espermatozoides de bovinos así como en humanos y en ovinos. Con estos resultados pudimos concluir que los aptámeros presentados poseen los requerimientos necesarios para ser puestos a prueba en procesos de separación de espermatozoides para mejorar la calidad del semen a utilizar.

**260. (245) DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE ALENDRONATO (AL), UN BIFOSFONATO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES ÓSEAS**

Guzman M.<sup>1</sup>; Battistini F.<sup>2</sup>; Olivera M.<sup>3</sup>; Manzo R.<sup>4</sup>  
Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba<sup>1 2 3 4</sup>  
lauraguzman84@hotmail.com

Los bifosfonatos son utilizados para el tratamiento y prevención de enfermedades óseas como la enfermedad de Paget, hipercalcemia y osteoporosis postmenopausia. Su potencial de irritación gástrica y baja biodisponibilidad dificultan la adherencia a la terapia y amenazan el éxito clínico. El diseño de sistemas de liberación con bifosfonatos, tales como AL, tiene el potencial de mejorar la permeabilidad intestinal y reducir efectos adversos comunes en la terapia con bifosfonatos. Se obtuvieron complejos entre AL y Eudragit E100 (EuE100), con diferentes porcentajes de neutralización. En este estudio se investigan sus propiedades in vitro mediante técnicas espectroscópicas, espectrofotométricas y calorimétricas (DSC, Tg, DRXP, FTIR, UV vis). También se estudia la cinética de liberación de AL frente a fluidos biológicos simulados y la reversibilidad de la unión, utilizando celdas bicompartimentales y titulación de pares iónicos. Los complejos EuE100-AL son sólidos amorfos con elevada capacidad de cargado. Se observa una fuerte interacción iónica entre los grupos fosfonato de AL y dimetilamino de EuE100, evidenciada por modificaciones en los espectros de FTIR. Este elevado grado de condensación podría reducir la captura intercelular de Ca<sup>2+</sup>, vinculada a procesos de ulceraciones asociados al uso del fármaco. El incremento del pH producido por titulación de pares iónicos da cuenta de la reversibilidad de la unión y su elevada afinidad, la que es superior (p<0,01) a la encontrada con fármacos ácidos con grupos carboxílicos en su molécula. Los sistemas se comportan como reservorios del fármaco, capaces de liberarlos en fluidos biológicos simulados en forma lenta y sostenida en el tiempo, ajustándose a una cinética de orden cero, sin efecto burst. Los complejos EuE100-AL son prometedores para el desarrollo de sistemas de liberación controlada y administración oral que pudieran mejorar la adherencia y eficacia en el tratamiento de enfermedades óseas.

**261. (504) ACTIVIDAD DE FLUBENDAZOLE SOBRE QUISTES HIDATÍDICOS EN EL MODELO OVINO: ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y DE EFICACIA**

Ceballos L.<sup>1</sup>; Canevari J.<sup>2</sup>; Canton C.<sup>3</sup>; Saumell C.<sup>4</sup>; Sagués F.<sup>5</sup>; Elissondo C.<sup>6</sup>; Bistoletti M.<sup>7</sup>; Sanchez Bruni S.<sup>8</sup>; Lanusse C.<sup>9</sup>; Alvarez L.<sup>10</sup>  
Lab de Farmacología Fac de Cs Veterinarias UNCPBA<sup>1 2 3 7 8 9 10</sup>; Laboratorio de Parasitología, FCV, UNCPBA, Tandil, Argentina.<sup>4 5</sup>; Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, FCEyN, UNMDP, Mar del Plata, Argentina<sup>6</sup>  
ceballos@vet.unicen.edu.ar

Los estadios intermedios de *Echinococcus granulosus* (EG) producen hidatidosis en humanos y otros huéspedes intermediarios como los ovinos. El objetivo del presente estudio

fue comparar la cinética plasmática de flubendazole (FLBZ) y albendazole (ABZ) y su eficacia sobre quistes hidatídicos en ovinos. Doce (12) ovinos naturalmente infectados con *EG* se dividieron en 3 grupos: Control, sin tratamiento; Grupo FLBZ y Grupo ABZ. Estos últimos fueron tratados con FLBZ y ABZ, respectivamente (0.032 moles/kg), por vía oral cada 48 h durante 56 días. La eficacia se evaluó a partir de la vitalidad y viabilidad de los protoescolices obtenidos de los animales de cada grupo. El estudio farmacocinético se realizó a partir de muestras de plasma obtenidas en forma previa y a diferentes tiempos post-tratamiento. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y el plasma obtenido fue analizado por HPLC. Flubendazole reducido (R-FLBZ) fue el principal metabolito plasmático detectado luego de la administración de FLBZ. Su concentración máxima ( $0.22 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ ) resultó significativamente mayor a la observada para FLBZ ( $0.10 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ ). ABZ no fue detectado en el plasma. Altas concentraciones ( $C_{\text{max}}$  de  $2.42 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$ ) del metabolito sulfóxido (ABZSO) fueron cuantificadas a las  $10.2 \pm 2.68$  h post-tratamiento. La vitalidad de los protoescolices fue del  $97.3 \pm 2.72\%$  (Grupo Control),  $18.4 \pm 4.99\%$  (Grupo FLBZ) ( $P < 0.05$ ) y  $2.6 \pm 0.57\%$  (Grupo ABZ) ( $P < 0.05$ ). La viabilidad de los protoescolices fue del 89, 25 y 33% para los grupos Control, FLBZ y ABZ, respectivamente. Las bajas concentraciones plasmáticas observadas para FLBZ y su principal metabolito, fueron suficientes para provocar una reducción significativa en la vitalidad/viabilidad de los protoescolices con respecto al grupo control. Dicha eficacia resultó similar a la observada para ABZ, molécula utilizada de rutina en el tratamiento de la hidatidosis en humanos.

## 262. (824) USE OF ASCORBYL PALMITATE NANOSTRUCTURES (ASC16) AS SYSTEMS FOR OPTIMIZING EFFICACY OF CPG-ODN

Ullio Gamboa G.<sup>1</sup>; Sanchez Vallecillo M.<sup>2</sup>; Palma S.<sup>3</sup>; Allemandi D.<sup>4</sup>; Moron G.<sup>5</sup>; Pistoiresi M.<sup>6</sup>; Maletto B.<sup>7</sup>  
 Depto de Farmacia Facultad de Cs Químicas UNC<sup>1 3 4</sup> ;  
 CIBICI-CONICET-Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina<sup>2 5 6 7</sup> ;  
 gullio@fcq.unc.edu.ar

CpG-ODN has successfully used as vaccine adjuvant but unfortunately has a reduced bioavailability. In order to improve their bioavailability we have used CpG-ODN formulated in a nanostructure of 6-O- ascorbyl palmitate (Coa-ASC16), which has the ability to form supramolecular aggregate that are produced by phase cooling below a critical micellar temperature. Previously, we have observed that this strategy increased the bioavailability considering that improved the CpG-ODN adjuvant activity. However, we still ignore the mechanisms by which Coa-ASC16 works. Perhaps more than one factor could be synergistically contributing. Here, we tested whether Coa-ASC16 "per se" is able to stimulate immune system. Mice were i.p. injected with Coa-ASC16 or without Coa-ASC16 (control group). Coa-ASC16 induced a recruitment of neutrophils ( $\text{Ly6G}^{\text{high}}$ , F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>,  $\text{Ly6C}^+$ ) ( $23 \pm 8$  vs control:  $0.06 \pm 0.09\%$  after two hours injection  $p < 0.05$ ) and inflammatory monocytes ( $\text{Ly6C}^{\text{high}}$ ,  $\text{Ly6G}^+$ , F4/80<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) ( $25 \pm 3$  vs control:  $3 \pm 1\%$  after six hours injection  $p < 0.05$ ) into the peritoneal cavity. We also observed production of IL-6 (ng/ml,  $0.8 \pm 0.4$  vs control:  $0.07 \pm 0.02$  after two hours injection  $p < 0.05$ ) in macrophages, neutrophils and inflammatory monocytes. These experiments were also carried out in TLR4<sup>-/-</sup> animals obtaining the same result. In addition, we evaluated the levels of LDH, ALT and AST enzymes released into the peritoneal lavage to assess cell damage/lysis. Coa-ASC16 induced an increase of levels of these enzymes two hours after injection: LDH (U/l) ( $7100 \pm 1600$  vs control:  $1400 \pm 780$   $p < 0.001$ ), AST (U/l) ( $230 \pm 74$  vs control:  $37 \pm 12$   $p < 0.001$ ), ALT (U/l) ( $92 \pm 38$  vs control:  $19 \pm 7$   $p < 0.005$ ). These observations suggest that one of the factors by Coa-ASC16 may enhance the effect of CpG-ODN is the recruiting of innate immune cells to the site of injection. Coa-ASC16 cause tissue damage at the site of injection and then could act as "endogenous danger signals" which may initiate a sterile inflammatory response.

## GENETICA 1

### 263. (60) ESTRATEGIA MOLECULAR DIAGNOSTICA FAMILIAR PARA Distrofia Muscular DE DUCHENNE/BECKER.

Giliberto F.<sup>1</sup>; Massot F.<sup>2</sup>; Ferreiro V.<sup>3</sup>; Pirra L.<sup>4</sup>; Ferrer M.<sup>5</sup>; Szijan I.<sup>6</sup>  
 Catedra de Genética y Biología Molecular Uba<sup>1 2</sup> ; Laboratorio Genética Molecular Diagnostica GENOS SA<sup>3</sup> ; Fundación Favaloro<sup>4</sup> ; Laboratorio de Neurobiología Molecular División de Neurociencia Hospital de Clínicas José de San Martín UBA<sup>5</sup> ; Catedra de Genética y Biología Molecular Uba<sup>6</sup> florgiliberto@hotmail.com

La Distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500), recesiva, ligada al X, progresiva y de evolución fatal. Por el momento no existe un tratamiento efectivo para detener o revertir su desarrollo. Los estudios moleculares resultan de suma utilidad para las familias con antecedentes de esta grave afección. El objetivo del trabajo se basó en generar una estrategia diagnóstica para estimar la probabilidad de ser afectado o portador de DMD en los integrantes de una familia con antecedentes. Para ello se analizaron siete mujeres (una de ellas embarazada), dos varones afectados y una vellosidad coriónica. Se purificó ADN de sangre periférica y de vellosidad para realizar los siguientes estudios moleculares: PCR multiplex, análisis de segregación de microsátelites (tinción argéntica/ marcación con fluorocromo) y estudio de Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA). Se halló una delección del exón 63 en ambos varones afectados (MLPA) y se realizó el estudio de segregación de 7 STR's conformando los haplotipos en los diez individuos analizados. En base a los resultados obtenidos se logró excluir al feto de ser enfermo o portador de la enfermedad. Se diagnosticaron a dos mujeres como portadoras con un 100% de certeza y se excluyeron a cinco mujeres de ser portadoras con aproximadamente un 100% de certeza. Se evidenciaron también dos eventos de recombinación y un evento de mutación de novo (mosaicismo germinal). No es posible aplicar un algoritmo único y general, cada familia requiere un análisis especial que se ajuste a su caso particular, debiendo desarrollarse una estrategia molecular utilizando distintas metodologías e interpretando los resultados en su conjunto para obtener una información más completa acerca de la alteración genética y realizar un diagnóstico molecular para brindar un correcto asesoramiento genético.

### 264. (275) NEUROFIBROMATOSIS TIPO 2: ANÁLISIS CLÍNICO Y MOLECULAR EN CASOS ESPORÁDICOS Y FAMILIARES

Ferrer M.<sup>1</sup>; Ferreiro V.<sup>2</sup>; Alfaro G.<sup>3</sup>; Ottaviani D.<sup>4</sup>; Ciavarelli P.<sup>5</sup>; Giliberto F.<sup>6</sup>; Basso A.<sup>7</sup>; Szijan I.<sup>8</sup>  
 División Neurocirugía - Hospital de Clínicas "José de San Martín"-UBA<sup>1 2 3 4 5 7</sup> ; Cátedra de Genética y Biología Molecular-FFyB-UBA<sup>6 8</sup>  
 ferrer.marcela@gmail.com

La Neurofibromatosis 2 es un síndrome familiar caracterizado por el desarrollo de schwannomas, meningiomas y ependimomas, tumores benignos, pero cuya localización en el sistema nervioso produce efectos perjudiciales sobre importantes estructuras craneales y espinales. Los tumores se desarrollan como resultado de la inactivación del gen NF2 (22q12) que codifica para proteína merlina o schwannomina con función de supresor tumoral. Las mutaciones inactivantes tienen lugar "de novo" (>50%) ó son heredadas y la mayoría de ellas son sin sentido o producen corrimiento del marco de lectura. El diagnóstico molecular es importante en síndromes donde los criterios clínicos no brindan certeza suficiente. El diagnóstico temprano del tumor es relevante para una terapia efectiva. Nuestro propósito es estudiar las alteraciones del gen NF2 en pacientes con tumores asociados a neurofibromatosis 2. Se analizaron 10 familias y 29 pacientes aislados por: 1) segregación de 4 STRs y la determinación del haplotipo de riesgo; 2) búsqueda de mutaciones en el gen NF2

por SSCP/HD seguidos de secuenciación. La segregación de STRs fue informativa en 8 familias: 1) 6 hermanos y 3 hijos de pacientes fueron excluidos del riesgo de NF2; 2) Por pérdida de heterocigocidad se detectaron 4 haplotipos de riesgo. Por análisis de SSCP/HD/Secuenciación se identificaron 5 mutaciones que permitieron obtener esta información: tres niños asintomáticos resultaron portadores de mutación y 6 individuos de 3 familias fueron excluidos del riesgo de enfermedad. El análisis de la relación genotipo/fenotipo mostró que las mutaciones con corrimiento de lectura o sin sentido se asocian a un comienzo temprano y un desarrollo severo de la enfermedad, mientras las mutaciones con sentido erróneo a una enfermedad más leve. Los resultados obtenidos son importantes para el diagnóstico presintomático y la exclusión de familiares del riesgo a desarrollar la enfermedad. Los datos pueden ser útiles para una futura terapia génica.

**265. (293) ANALISIS MOLECULAR Y DE SEGREGACION DE POLIMORFISMOS DEL GEN RB1 EN PACIENTES CON RETINOBLATOMA Y SUS FAMILIARES**

Piazza G.<sup>1</sup>; Otaviani D.<sup>2</sup>; Ferrer M.<sup>3</sup>; Giliberto F.<sup>4</sup>; Massot F.<sup>5</sup>; Szijan I.<sup>6</sup>

*Genética y Biología Molecular, Fac. Farm. y Bioqu. UBA<sup>1</sup> 2 4 5 6; Neurocirugía, Hospital de Clínicas José de San Martín<sup>3</sup> guillermopiazza79@hotmail.com*

El retinoblastoma (RB), cáncer de la niñez, puede ser hereditario (40%) con alta penetrancia (90%) o no hereditario (60%) originándose por mutaciones en el gen RB1 (13q14). Es importante identificar la mutación para detectar a individuos susceptibles al RB y aplicar un tratamiento temprano. El objetivo es identificar mutaciones en 7 familias con RB, 1 con historia familiar, por medio de: i) Segregación de polimorfismos, para determinar haplotipo de riesgo y detectar grandes deleciones y ii) Método de heteroduplex/secuenciación para pequeñas mutaciones. I) Se utilizaron 5 polimorfismos intragénicos: 3 RFLPs, un STR y un VNTR. II) Se realizó PCR/heteroduplex/secuenciación de Promotor, 27 exones y región poliadenilada de RB1. Además se detectaron mutaciones previas usando enzimas de restricción. El análisis de segregación de polimorfismos detectó una deleción en la región 5' del gen en uno de los casos y el haplotipo de riesgo en otro, permitiendo excluir a dos familiares. El análisis de secuenciación, en otra familia, identificó una sustitución de base G por A en posición 5 aguas arriba del extremo 3' del exón 21: g.165094G>A, importante para un correcto empalme de exones. Mediante el rastreo de mutaciones previamente detectadas se excluyó del riesgo a dos niñas recién nacidas. En el primer caso se excluyó a la hermana del afectado por secuenciación y ausencia de la mutación g.160733delA en el exón 21. En el segundo se excluyó a la hija de la afectada por medio del análisis restricción con la enzima Ddel, ya que una mutación en el exón 18 genera un sitio de corte, el análisis no evidenció bandas de digestión enzimática. Conclusión: Mediante el uso de diversas herramientas de análisis molecular se pudo determinar la presencia de dos mutaciones responsables del desarrollo de RB, una gran deleción de la región 5' del gen y una alteración en la 5ª base de la secuencia consenso dadora para empalme de exones y fue posible excluir a 4 familiares del riesgo.

**266. (345) ESTUDIO DE LA REGIÓN REGULATIVA DISTAL DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN CYP21A2 EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA.**

Fernández C.<sup>1</sup>; Buzzalino N.<sup>2</sup>; Oneto A.<sup>3</sup>; Stivel M.<sup>4</sup>; Belli S.<sup>5</sup>; Pasqualini T.<sup>6</sup>; Charreau E.<sup>7</sup>; Alba L.<sup>8</sup>; Dain L.<sup>9</sup>  
*Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1, 7, 9</sup>; Centro Nacional de Genética Médica<sup>2, 8, 9</sup>; División Endocrinología Htal. Durand<sup>4, 5</sup>; Servicio de Pediatría Htal. Italiano<sup>6</sup> cecisolfier@hotmail.com*

La enzima 21-hidroxisilasa es codificada por el gen CYP21A2, siendo su deficiencia causante del 95% de los casos de Hiperplasia Suprarrenal Congénita. El gen está generalmente

duplicado en tandem, contiguo e intercalado con un pseudogen CYP21A1P inactivo con un 98% de identidad de secuencia. Si bien la mayoría de las mutaciones causantes de la patología son derivadas del pseudogen, se han descrito mutaciones no relacionadas al mismo. Wijesuriya y col. (1999) identificaron una región regulativa que estimula la transcripción del gen ubicada entre -4.6Kb y -5.6Kb del CYP21A2. Sin embargo la misma ha sido escasamente estudiada como posible causa de la deficiencia. El objetivo del trabajo fue evaluar posibles variaciones de secuencia en esta región en pacientes con deficiencia de 21-hidroxisilasa. A partir de ADN genómico de 100 pacientes se amplificó mediante PCR la región de interés y los fragmentos fueron analizados por secuenciación directa. Se halló un cambio A>G en 3 pacientes río arriba de la secuencia del gen. El cambio fue hallado solo en 1/196 alelos controles. Estudios bioinformáticos mostraron que esta variante estaría alterando la topología del ADN, sugiriendo que la interacción con factores de transcripción en la secuencia analizada podría verse afectada. Se realizaron ensayos preliminares de transfección en células adrenales humanas utilizando las siguientes construcciones: A- promotor básico del CYP21A2, B- promotor básico + región regulativa y C- promotor básico + región regulativa con la variante G, todas ellas clonadas río arriba del gen reportero de luciferasa. Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de luciferasa entre A y B; y entre B y C (p<0.01), pero no entre A y C (p>0.05). Estos resultados preliminares estarían indicando que la variante encontrada modularía la expresión del gen CYP21A2, pudiendo estar relacionada con el desarrollo de la patología.

**267. (576) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR POR SECUENCIACIÓN DE PACIENTES CON HIPERPLASIA SUPRARRENAL CONGÉNITA (HSC) POR DEFICIENCIA DE 21 HIDROXILASA EN NUESTRA POBLACIÓN**

Taboas M.<sup>1</sup>; Minutolo C.<sup>2</sup>; Fernandez C.<sup>3</sup>; Buzzalino N.<sup>4</sup>; Casali B.<sup>5</sup>; Belli S.<sup>6</sup>; Oneto A.<sup>7</sup>; Stivel M.<sup>8</sup>; Pasqualini T.<sup>9</sup>; Alba L.<sup>10</sup>; Dain L.<sup>11</sup>

*Centro Nacional de Genética Médica<sup>1 2 3 4 5 10 11</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>9</sup>; División Endocrinología Hospital Durand<sup>6 7 8</sup>; Servicio de Pediatría Hospital Italiano<sup>9</sup>; melmac84@hotmail.com*

La Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC) es una enfermedad autosómica recesiva que se produce en el 95% de los casos por deficiencia en la enzima 21 hidroxisilasa. La enfermedad puede manifestarse en una forma severa o clásica (C), o en forma moderada o no clásica (NC). Luego del estudio de las 10 mutaciones más frecuentes del gen CYP21A2, que codifica para 21 hidroxisilasa, se estudió la presencia de mutaciones poco frecuentes y/o noveles en pacientes en los que restaba determinar al menos un alelo. Para ello, se secuenciaron las regiones codificantes y promotoras cercanas del gen en una muestra de 76 pacientes (7 C y 69 NC). A partir de ADN de linfocitos de sangre periférica, el gen fue específicamente amplificado por PCR 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 el caso de hallarse posibles mutaciones noveles, las mismas fueron estudiadas en 50 controles de población control mediante corte con enzimas de restricción. Se hallaron 17 mutaciones, 11 raras o poco frecuentes previamente descriptas (p.H62L, p.D322G, p.R341P, p.R356Q, p.R425H, p.R428Q, p.R443X, p.R478L, p.P482S, p.R483W y g.2672delG) y 6 mutaciones noveles (C>T en el exón 3, C>T en el exón 4, A>G en el exón 7, G>A en el exón 10, una deleción de 2G en el exón 10 y un cambio A>G en el intrón 5). El genotipo se ha completado en 15 pacientes, 6 C y 9 NC. En todos los casos en los que se completó el genotipo, la prueba de 17OHP post ACTH fue mayor a 14 ng/ml. Para aquellos pacientes en que no se hallaron las 2 mutaciones es necesario investigar otras causas genéticas que pudieran explicar su fenotipo.

## HEMATOLOGÍA 2

**268. (509) PARTICIPACIÓN DE LA CÉLULA ENDOTELIAL EN UN MODELO DE ESTUDIO DE LA TROMBOPOYESIS**Goette N.<sup>1</sup>; Lev P.<sup>2</sup>; Glembotsky A.<sup>3</sup>; Heller P.<sup>4</sup>; Molinas F.<sup>5</sup>; Marta R.<sup>6</sup>UE IDIM CONICET Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari<sup>1 2 3 4 5 6</sup>

npgoette@gmail.com

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de la migración del megacariocito hacia el nicho vascular y la acción de ciertas citoquinas y quimoquinas en la trombopoyesis. Nuestro objetivo fue determinar el efecto de la interacción de la célula endotelial con el megacariocito en la formación de proplaquetas (PP) y plaquetas (PQ) in vitro y la acción de la IL-8 en este proceso. Para esto se cultivaron por separado células endoteliales de cordón umbilical humano en condiciones estándar, y progenitores hematopoyéticos CD34 positivos de sangre de cordón umbilical estimulados con citoquinas megacariopoyéticas. En el día 12 del cultivo de los megacariocitos, ambos tipos celulares se co-cultivaron y se evaluó la producción de PP (recuento en microscopio invertido) y PQ (recuento en cámara) luego de 24 hs. Se observó un aumento significativo de la producción de PP cuando los megacariocitos fueron co-cultivados con las células endoteliales, 15 (4-25) (mediana y rango) vs 3 (1-13), p=0.0156 (n=7). La producción plaquetaria también fue mayor en presencia de las células endoteliales, 226/μl (90-555) vs. 70/μl (20-120) p= 0.016 (n=7). Así mismo, en dos de estos experimentos se continuó la evaluación durante los días 14 y 15 de cultivo manteniéndose las diferencias en la cantidad de PP y PQ entre los megacariocitos en presencia y ausencia de células endoteliales. En cambio, en presencia de IL-8 (de 5 a 100 ng/ml) no se observó un efecto consistente ni en la producción de PP ni PQ tanto en los megacariocitos solos como en presencia de las células endoteliales. En conclusión, la presencia de la célula endotelial potencia la producción plaquetaria in vitro. Su utilización en el estudio de la trombopoyesis representa un modelo que se asemeja a las condiciones fisiológicas y podría ser de mayor utilidad para la evaluación de posibles reguladores de la producción plaquetaria in vivo.

**269. (599) PARTICIPACIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LA ANGIOGÉNESIS**Etulain J.<sup>1</sup>; Negrotto S.<sup>2</sup>; Romaniuk A.<sup>3</sup>; Rabinovich G.<sup>4</sup>; Schattner M.<sup>5</sup>Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires<sup>1 2 3 5</sup>; Lab. Inmunopatología, IBIME<sup>4</sup>  
juliaetulain@hotmail.com

Las plaquetas contribuyen a la formación de nuevos vasos depositando de manera localizada altas concentraciones de proteínas reguladoras de la angiogénesis. Recientemente se ha demostrado que las moléculas pro y antiangiogénicas (VEGF y endostatina respectivamente) están contenidas en distintas subpoblaciones de gránulos á plaquetarios y su liberación es diferencial ante la estimulación por agonistas de los receptores PAR1 y PAR4 (PAR-AP). El objetivo de este trabajo fue extender estos hallazgos analizando por ELISA la liberación de VEGF y endostatina en plaquetas lavadas (PL) inducida por agonistas plaquetarios clásicos y por Galectina-1 (Gal-1), nuevo mediador de la activación plaquetaria y de la angiogénesis. Mediante microscopía de fluorescencia se confirmó el empaquetamiento diferencial de VEGF y endostatina en los gránulos á. La tabla 1 muestra los valores de ambas moléculas en los sobrenadantes plaquetarios (ELISA). Tabla 1 (veces del control sin estimular) \*P<0.05 vs. control (n=5). Tabla 1

	VEGF	Endostatina
Trombina 0,05U/ml	6.4±0.1*	4.7±0.1*
PAR1-AP 10μM	7.6±0.3*	5.0±0.3*
PAR4-AP 100μM	8.4±0.3*	4.7±0.3*
Colágeno 5μg/ml	2.8±0.1*	3.3±0.1*
Gal-1 60μg/ml	3.1±0.1*	0.9±0.2

Ambas moléculas fueron secretadas luego de la estimulación de PL con trombina, PAR1-AP, PAR4-AP y colágeno. Llamativamente, la estimulación de plaquetas con Gal-1 permitió la liberación de VEGF pero no la de endostatina. Interesantemente, mientras el contenido de VEGF (13.9±2.3ng/ml) plaquetario fue mayor al de endostatina (2.4±0.2ng/ml), los niveles plasmáticos arrojaron valores opuestos (1.1±0.7ng/ml y 81.0±4.2ng/ml para VEGF y endostatina respectivamente, n=5). Estos hallazgos cuestionan la liberación diferencial de VEGF y endostatina por agonistas plaquetarios clásicos y proponen a la Gal-1 como modulador selectivo. Además sugieren que la contribución de las plaquetas al proceso angiogénico estaría asociada principalmente al incremento de los niveles de VEGF plasmáticos.

**270. (570) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN ERIP-TOSIS INDUCIDA POR ENTRADA MASIVA DE CALCIO O EXPOSICIÓN A AGENTES PRO OXIDANTES**Vota D.<sup>1</sup>; Maltaner R.<sup>2</sup>; Callero M.<sup>3</sup>; Nesse A.<sup>4</sup>; Vittori D.<sup>5</sup>Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. CONICET Argentina.<sup>1 2 3 4 5</sup>  
daiana\_vota@qb.fcen.uba.ar

Eritrocitos maduros, bajo ciertas circunstancias patológicas pueden sufrir un proceso de autodestrucción prematura conocido como eriptosis debido a características fenotípicas similares a las de apoptosis de células nucleadas. A pesar de la existencia de varios estudios sobre la caracterización del proceso, la información actual acerca de los mecanismos involucrados es escasa. Previamente hemos reportado la caracterización de eriptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> o ionóforo de calcio (ICa). En el presente trabajo se estudian los mecanismos involucrados. Se encontró que en ambos tratamientos la activación de PI3K tiene un rol importante observándose disminución de la traslocación de fosfatidilserina (PS) por citometría de flujo en presencia del inhibidor Ly294002 (C 12±2,1%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 28±5,6%; Ly-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 14±2,5%; ICa 78±3,2%; Ly-ICa 40±12,3%; Ly-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> y Ly-ICa vs. ICa P<0,05. n=3). El tratamiento con ICa provocó disminución de la proteína Banda 3 y sólo en presencia de un ambiente oxidante como el generado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> (aumento de ROS y disminución de tioles), se detectó fosforilación de Banda 3 y nitrosilación de proteínas de membrana (Western blotting), diferencias que pueden explicar los distintos cambios morfológicos observados en ambos procesos. Resultados de ensayos realizados en medio libre de Ca sugieren que la inducción de eriptosis por nitritos también sería un proceso favorecido por el flujo de Ca. A pesar del aumento de Ca<sub>i</sub> observado con ambos tratamientos, ensayos con el inhibidor calpeptina (Cal) sugieren que la activación de calpaína no estaría relacionada con la traslocación de PS (C 13±5,1%; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 28±7,6%; Cal-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 28±9,6%; ICa 70±12,0%; Cal-ICa 65±13,6%, n=4). Los resultados permiten avanzar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en este novedoso proceso y muestran que la muerte prematura eritrocitaria puede ser inducida a través de diferentes mecanismos dependiendo del estímulo de eriptosis.

**271. (698) GALECTINA-1, UN NUEVO MEDIADOR DE LA HEMOSTASIA**Romaniuk M.<sup>1</sup>; Laponi M.<sup>2</sup>; Etulain J.<sup>3</sup>; Malaver E.<sup>4</sup>; Negrotto S.<sup>5</sup>; Rabinovich G.<sup>6</sup>; Schattner M.<sup>7</sup>Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5 7</sup>; IBYME CONICET<sup>6</sup>  
albertinar@gmail.com

En estudios previos identificamos que las plaquetas humanas expresan Galectina-1 (Gal-1) y que esta lectina induce activación plaquetaria. Con el fin de determinar el rol de la Gal-1 endógena en la hemostasia, se realizaron experimentos utilizando ratones KO para esta lectina. En primer lugar, determinamos que las plaquetas murinas también expresan Gal-1 y que las plaquetas de los ratones KO no la contienen. El recuento plaquetario y la expresión de la subunidad β<sub>3</sub> de la integrina α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> en los ratones deficientes en Gal-1 fueron normales. Sin embargo, los ratones Gal-1<sup>-/-</sup> presentaron tiempos de sangría significativamente más

prolongados que los WT ( $110 \pm 16$  vs.  $60 \pm 10$  segundos,  $p < 0.001$ ,  $n=14$ , test *t* de Student). Por otro lado, no se observó una disminución significativa en la adhesión a fibrinógeno inmovilizado. Ensayos de agregación utilizando plaquetas de estos ratones no mostraron diferencias en el porcentaje de agregación frente a la estimulación de plaquetas con colágeno, ADP o ácido araquidónico con respecto a los ratones control. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la liberación de ATP mediada por colágeno (40% de inhibición,  $n=3$ ). Las plaquetas de ratones deficientes en Gal-1 también mostraron ausencia de la retracción del coágulo en ( $n=6$ ). En conjunto estos hallazgos señalan que Gal-1 sería un nuevo mediador del proceso hemostático.

## 272. (745) INFLUENCIA DE LA LIPOPROTEÍNA (A) SOBRE LA FORMACIÓN Y LISIS DE LA FIBRINA.

Arín A.<sup>1</sup>; De Panis D.<sup>2</sup>; Lauricella A.<sup>3</sup>

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3</sup>  
lht@qb.fcen.uba.ar

La lipoproteína (a) (LPa), es un factor de riesgo independiente para la enfermedad cardiovascular aterotrombótica, stroke y aneurisma aórtico abdominal. Se ha propuesto que la LPa compite con el plasminógeno (Plg) por las uniones a fibrina y puede interferir con la activación de Plg mediada por el activador tisular del Plg (t-PA), disminuyendo la actividad fibrinolítica y generando un estado hipercoagulable in vivo. Teniendo en cuenta que la velocidad del proceso fibrinolítico no sólo depende de la actividad de los componentes del sistema plasminógeno-plasmina, sino además de las características de la red de fibrina a lisar, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la LPa sobre la formación y lisis de la fibrina. Se realizaron estudios cinéticos registrando la densidad óptica (DO405nm) en función del tiempo de: A) formación de la fibrina, a partir de fibrinógeno humano (concentración final 0,6 mg/ml) coagulado con trombina bovina (5 UNIH/ml) y cloruro de Calcio (20 mM) en presencia de LPa (68 mg/dl) versus control. B) lisis de la misma fibrina, por plasminógeno (0,3 mM) activado con t-PA (6 U/ml), utilizando un sistema en una etapa. Resultados: A) La fibrina con LPa se formó más rápidamente que la fibrina control (velocidad de polimerización  $0,5010 \pm 0,0002$  min<sup>-1</sup> vs  $0,0014 \pm 0,0001$  min<sup>-1</sup>) alcanzó menor DOfinal ( $0,151 \pm 0,009$  vs  $0,252 \pm 0,002$ ), indicando que la fibrina con LPa está formada por fibras delgadas. B) La velocidad de lisis con LPa resultó inferior a la control ( $9,7 \pm 0,4 \times 10^{-5}$  min<sup>-1</sup> vs  $61 \pm 8 \times 10^{-5}$  min<sup>-1</sup>) demorando más tiempo en lisarse ( $>1000$  min vs  $805 \pm 26$  min). Todas las diferencias resultaron estadísticamente significativas. Concluimos que la LPa acelera la formación de la fibrina y modifica su estructura originando fibras más delgadas, difíciles de lisar. Este sería otro mecanismo por el cual la LPa ejerce su efecto protrombótico.

## CARDIOVASCULAR 1

## 273. (121) BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL EN CORAZÓN DE RATA DURANTE LA ENDOTOXEMIA

Vanasco V.<sup>1</sup>; Carrivale A.<sup>2</sup>; Evelson P.<sup>3</sup>; Boveris A.<sup>4</sup>; Alvarez S.<sup>5</sup>

Cátedra de Fisicoquímica, Programa de Radicales Libres en Biología (PRALIB-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires<sup>1 2 3 4 5</sup>

vvanasco@ffybu.uba.ar

Durante la sepsis y la endotoxemia se ha observado respiración tisular inadecuada aunque la disponibilidad de oxígeno se encuentra inalterada. Con el objetivo de analizar el mecanismo de disfunción bioenergética que ocurre a nivel mitocondrial en corazón durante la endotoxemia, se evaluó la respiración a nivel mitocondrial y tejido, la producción de ATP, y la producción de especies activas del oxígeno en mitocondria. Ratas hembras Sprague-Dowley (45 días), fueron inyectadas ip con LPS (10 mg/kg); y luego de 6 hs se realizaron los diferentes análisis en corazón. En animales tratados con LPS, la relación entre el oxígeno utilizado

por la mitocondria y en vías no mitocondriales disminuye un 25% respecto a los animales controles. Este cambio se relaciona con un aumento del 100% hallado en la actividad de la NADPH oxidasa en los animales tratados con LPS respecto a los controles (control:  $13250 \pm 3020$  cpm/ mg tej,  $p < 0,05$ ). La respiración mitocondrial se encontró disminuida en los animales endotoxémicos (control:  $159 \pm 13$  n-at g O<sub>2</sub>/min.mg prot,  $p < 0,05$ ) y se analizó el efecto de distintos inhibidores de la cadena respiratoria. Se observaron velocidades aumentadas de producción mitocondrial de anión superóxido (70%, control:  $4,68 \pm 0,52$  nmol/min mg prot,  $p < 0,05$ ) y peróxido de hidrógeno (20%, control:  $1,17 \pm 0,13$  nmol/min mg prot,  $p < 0,05$ ) en animales tratados con LPS respecto al grupo control. Se evaluó la producción de ATP mitocondrial y la actividad de los complejos mitocondriales en los 2 grupos de estudio, observándose una disminución en la actividad del complejo I. A partir de estos resultados se puede inferir que, si bien existen otros mecanismos, la disfunción bioenergética mitocondrial durante la endotoxemia contribuiría al deterioro orgánico (corazón) observado en este síndrome.

## 274. (136) LA SOBREENPRESIÓN CARDIACA DEL RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II INDUCE MORTALIDAD TEMPRANA Y DISMINUYE LA RESERVA INOTRÓPICA EN RATONES TRANSGÉNICOS.

Matorra L.<sup>1</sup>; Rey Deutsch A.<sup>2</sup>; Donato M.<sup>3</sup>; Casanova V.<sup>4</sup>; Cicale E.<sup>5</sup>; Pidal G.<sup>6</sup>; Lightowler C.<sup>7</sup>; Morales C.<sup>8</sup>; Basso N.<sup>9</sup>; Gelpi R.<sup>10</sup>

Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 8 9 10</sup>; Bioterio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires<sup>4 5</sup>; Área de Patología Quirúrgica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires.<sup>6 7</sup>, Apoyo de la Asociación de Fomento a la Investigación Científica (AFIC).<sup>9</sup>  
f\_matorra@hotmail.com

En un trabajo previo se mostró la relación existente entre la sobreexpresión del receptor de angiotensina II tipo 1 (RAT1) a nivel cardiaco, el aumento en la incidencia de muerte súbita precoz y la aparición de arritmias. Continuando este estudio se analizó si la mortalidad está vinculada a un deterioro en la reserva inotrópica y si un bloqueante específico del RAT1 [Losartan (LOS)] puede revertir la misma. El objetivo fue determinar la reserva inotrópica y la supervivencia en dos modelos de ratones transgénicos: 1.- con sobreexpresión cardíaca específica del RAT1 completo (Tg1) y 2.- con sobreexpresión del RAT1 más una mutación específica que desacopla la proteína Gqα (Tg2). Se usaron ratones no transgénicos como grupo control (NTg). Otro grupo de Tg1 recibió LOS (Tg1L) (30 mg/Kg/día) durante los 30 días posteriores al destete. Se construyeron curvas de Kaplan Meier para evaluar supervivencia hasta los 60 días en NTg ( $n=30$ ), Tg1 ( $n=92$ ), Tg2 ( $n=144$ ) y Tg1L ( $n=29$ ). En NTg y Tg2 no se observó mortalidad, en Tg1 fue del 40%, y en Tg1L fue del 16%. Se realizó cateterismo cardiaco para medir la función ventricular izquierda y se administró isoproterenol para evaluar la reserva inotrópica a través del  $\Delta$  (% de variación) de la  $+dP/dt_{\text{máx}}$ . NTg ( $n=5$ )  $98 \pm 14\%$ , Tg1 ( $n=6$ )  $60 \pm 3\%$  ( $p < 0,05$  vs NTg y Tg1L); Tg2 ( $n=4$ )  $15 \pm 8\%$  ( $p < 0,05$  vs NTg, Tg1 y Tg1L) y Tg1L ( $n=5$ )  $82 \pm 7\%$ . Se evaluó también la relación peso del corazón (mg)/peso corporal (gr): NTg:  $4.7 \pm 0.1$ ; Tg1:  $5.8 \pm 0.1$  ( $p < 0.05$  vs NTg y Tg1L); Tg2:  $7.9 \pm 0.2$  ( $p < 0.05$  vs NTg, Tg1 y Tg1L); Tg1L:  $4.6 \pm 0.1$  (ns vs NTg). La sobreexpresión del RAT1 completo se asocia a la aparición de mortalidad temprana que disminuye con LOS. En el grupo Tg2 no se observó mortalidad temprana, a pesar de tener mayor hipertrofia cardiaca y deterioro en la reserva inotrópica. Este hecho sugiere que la proteína Gq- $\alpha$ , y toda la cascada de señales asociada a ella, tendrían relación directa con la mortalidad temprana de los animales.

## 275. (246) ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE SOD-MN ALA-9VAL Y DE LA ACTIVIDAD DE SODMN, GPX Y CATALASA EN PACIENTES CHAGÁSICOS

Zumoffen C.<sup>1</sup>; Lioi S.<sup>2</sup>; Gerrard G.<sup>3</sup>; Corbera M.<sup>4</sup>; Turco M.<sup>5</sup>; Beloscar J.<sup>6</sup>; D'arrigo M.<sup>7</sup>



Area Química Analítica Clínica - FBIOYF - UNR<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
 czumoffen@hotmail.com

La patogenia de la Miocardiopatía Chagásica Crónica (MCC) es polémica, no existiendo ninguna prueba definitiva de cuales son los factores necesarios para llegar a la etapa determinada. Factores genéticos de cada huésped podrían participar activamente en la evolución de la enfermedad de Chagas. Considerando que la variabilidad de la expresión fenotípica de la cardiomiopatía chagásica puede deberse a componentes genéticos del paciente, nos propusimos realizar un estudio descriptivo de las frecuencias genotípicas (FG) del polimorfismo (Ala-9Val) de superóxido dismutasa (SOD-Mn) y las actividades enzimáticas de superóxido dismutasa (SOD); glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa en pacientes chagásicos con (CconC n:20) y sin cardiopatía chagásica (CsinC n:11) comparados con controles sanos (CN n:55). La caracterización molecular se realizó por PCR-RFLP. Las actividades enzimáticas se determinaron por técnicas espectrofotométricas. Se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal y se aplicó Kruskal Wallis. Las FG para SODMn (IC 95%) fueron CN: (Ala/Ala 0.54(0.40-0.67), Ala/Val 0.33(0.20-0.45), Val/Val 0.13(0.04-0.21); CsinC (Ala/Ala 0.36(0.07-0.64), Ala/Val 0.46(0.16-0.75), Val/Val 0.18(0.00-0.40); CconC (Ala/Ala 0.35(0.14-0.56), Ala/Val 0.30(0.10-0.50), Val/Val 0.35(0.14-0.56). Las actividades obtenidas de catalasa(K/gHb) CconC 316±68, CsinC 332±41, CN 185±28; GPx(U/gHb) CconC 98±17, CsinC 102±20, CN 61±11; SOD (USOD/gHb) CconC 3270±833, CsinC 2590±188, CN 895±314. En relación al estudio de la FG de SOD-Mn entre chagásicos con y sin cardiomiopatía y controles se observaron diferencias significativas (p<0.01). Las actividades de catalasa, SOD y GPx mostraron diferencias (p<0.01) entre los pacientes chagásicos respecto de los controles. Los datos obtenidos reflejarían que ciertos polimorfismos involucrados en el stress oxidativo podrían tener implicancias en la patogenia de la MCC, modificando el riesgo individual en la evolución de las cardiomiopatías

## 276. (251) ALTERACIONES DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA POR TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

Del Balzo G.<sup>1</sup>; Riquelme B.<sup>2</sup>; Delannoy M.<sup>3</sup>; D'arrigo M.<sup>4</sup>  
 Area Química Analítica Clínica; FBIOYF; UNR; CONICET<sup>1 4</sup>;  
 Area Física FBIOYF IFIR CONICET UNR<sup>2</sup>; Area Física  
 FBIOYF UNR<sup>3</sup>  
 gonzalogdb6@hotmail.com

La disminución de la carga aniónica superficial eritrocitaria (CAE), tiene importancia hemodinámica y hemorreológica. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la tripsina sobre la CAE aplicando el método de reparto en sistemas bifásicos acuosos, unión a colorantes y medida de agregación eritrocitaria por retrodifusión láser. Se trabajó con eritrocitos tratados con tripsina a distintas concentraciones.

Tabla I. Medias y desvíos estándar de determinaciones de P, CAE y  $t_{50\%}$

Cc. tripsinamg/mL	P%	CAE%	$t_{50\%}$ S
0	97 ± 1	100 ± 5	4,1 ± 0,1
0.5	90 ± 1	96 ± 5	3,8 ± 0,1
1	85 ± 1	81 ± 5	3,3 ± 0,1
1.5	78 ± 1	69 ± 5	3,2 ± 0,1
2.0	57 ± 1	50 ± 5	2,6 ± 0,1
2.5	48 ± 1	35 ± 5	2,2 ± 0,1

Los eritrocitos fueron sometidos a la separación por reparto en un sistema bifásico carga sensible (Dextran T500 6.20%; polietilenglicol 6000 4.40%) a temperatura ambiente. Se calculó el coeficiente de reparto (P) definido como el cociente entre la cantidad de células en la fase superior respecto al total añadido al sistema. Con un Eritroagregómetro se determinó el tiempo que las células requieren para alcanzar el 50% de su capacidad máxima de agregación y con un Eritrodeformómetro se analizaron las posibles alteraciones en el Índice de Deformabilidad eritrocitaria (ID) producidas por el tratamiento. En los resultados obtenidos

se observó una disminución de la CAE en los hematíes tratados respecto de los sin tratar, no observándose alteraciones significativas en el ID (p>0.5). Se observó una disminución significativa (p<0.0001) en el tiempo requerido para alcanzar el 50% de la agregación máxima a medida que aumenta la concentración de tripsina, lo cual podría relacionarse con una disminución en la repulsión electrostática, correlacionada con la disminución en la CAE medida. La metodología empleada demostraría la pérdida de CAE por tratamiento con tripsina lo cual modeliza a las modificaciones de la membrana celular que podrían observarse en vasculopatías como la hipertensión arterial.

## 277. (478) CARACTERIZACIÓN DE LA ACCIÓN DE ANDRÓGENOS EN TEJIDO AÓRTICO

Campelo A.<sup>1</sup>; Massheimer V.<sup>2</sup>

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

El objetivo de este trabajo fue estudiar el mecanismo de acción de testosterona (T) a nivel vascular. Dado que previamente demostramos que T estimula la producción de óxido nítrico (NO) en anillos de aorta de ratas hembras, evaluamos la posible participación del receptor de andrógenos (RA). Primeramente se midió la producción de NO (método de Griess) en anillos de aorta tratados con 0,1nM T por 5 minutos en presencia de flutamide (Flut), antagonista del RA. El estímulo inducido por T fue suprimido por 100nM Flut (82 vs 2% s/control, T vs T+Flut respectivamente, p<0.05), sugiriendo la participación del RA. Resultados similares se obtuvieron empleando células endoteliales (CE) y otras dosis del inhibidor (1 y 10 nM). Considerando que testosterona metaboliza a estradiol por acción de la aromatasa, se midió el efecto de T sobre la producción de NO en anillos de aorta preincubados con anastrozole (inhibidor de aromatasa). La presencia del inhibidor (100nM) no modificó la acción del andrógeno (0,173 ± 0,021 vs 0,326 ± 0,039; 0,203±0,023 vs 0,379±0,042 nmoles NO/mg prot, C vs T -/+ anastrozole). La acción estimuladora de T es de tipo no genómico ya que se mantiene estando bloqueada la síntesis proteica con cicloheximida. Se demostró que el NO generado por T inhibe la agregación plaquetaria al incUBAr CE con un plasma rico en plaquetas. La acción antiagregante de T se atenuó en presencia de L-NAME (inhibidor de óxido nítrico sintasa). Los efectos reportados no dependen del sexo. En anillos aórticos aislados de ratas machos, tratamientos de 5 minutos con T (0,01-100 nM) estimularon la producción de NO con un efecto máximo entre 1-0.01 nM (65-85% s/control p<0,05). Se determinó que el andrógeno actúa también a nivel muscular estimulando la migración de células musculares lisas vasculares. Los resultados presentados muestran una acción directa y específica de T a nivel vascular regulando síntesis de vasoactivos, la agregación plaquetaria y la migración celular.

## 278. (704) LOSARTAN PROTEGE EL HIPOCAMPO DE LOS DAÑOS OXIDATIVO E INFLAMATORIO, LA LESIÓN MICROVASCULAR Y TISULAR ASOCIADOS A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL CON ALTA INGESTA DE SAL: UN MECANISMO DE PROTECCIÓN DE LA FUNCIÓN COGNITIVA?

Cavanagh E.<sup>1</sup>; Ferder M.<sup>2</sup>; Stella I.<sup>3</sup>; Insera P.<sup>4</sup>; Ferder L.<sup>5</sup>; Insera F.<sup>6</sup>

Centro de Hipertensión Arterial, Hospital Universitario Austral<sup>1 6</sup>; Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires<sup>2</sup>; Universidad Maimonides<sup>3 4</sup>; Ponce School Of Medicine, Ponce, Puerto Rico<sup>5</sup>  
 elenacavanagh@yahoo.com.ar

La hipertensión (HTA) y la alta ingesta salina son factores de riesgo para la morbimortalidad cerebrovasculares, que promueven el estrés oxidativo y daño a órganos blanco, incluyendo la vasculatura cerebral. Se investigó si el bloqueo AT1 protegería el área CA1 del hipocampo -asociado a memoria de largo plazo- del daño relacionado a HTA con alta ingesta de sal. Ratas

SHR (n=10/grupo) recibieron (durante 5 meses) agua de beber pura (grupo SH), o con 1.5% NaCl (SH+S), o 1.5% NaCl y 30mg losartan/kg/día (SH+S+L), o 50mg atenolol/kg/día (SH+S+A). Diez ratas WKY (W) fueron controles. PAS: W=119±3<sup>1</sup>, SH=180±4, SH+S=210±5<sup>2</sup>, SH+S+L=141±3<sup>3</sup>, SH+S+A=140±4<sup>3</sup> mmHg (<sup>1</sup>p<0.05 vs SH, SH+S, SH+S+L, SH+S+A; <sup>2</sup>p<0.05 vs SH, SH+S+L, SH+S+A; <sup>3</sup>p<0.05 vs SH). Inmunomarcaciones: a) GFAP (marcador de astrocitos), *Marca total corteza*: W=439±37<sup>1</sup>, SH=167±34, SH+S=387±20, SH+S+L=611±25<sup>1</sup>, SH+S+A=386±35 μm<sup>2</sup> (<sup>1</sup>p<0.05 vs SH, SH+S, SH+S+A); <sup>1</sup>\_*de astrocitos en CA1*: W=93±8<sup>1</sup>, SH=37±15<sup>2</sup>, SH+S=28±10, SH+S+L=95±8<sup>3</sup>, SH+S+A=2±0.9 astrocitos/μm<sup>2</sup> (<sup>1</sup>p<0.05 vs SH+S, SH+S+A; <sup>2</sup>p<0.05 vs W, SH+S+L, SH+S+A; <sup>3</sup>p<0.05 vs SH+S, SH+S+A); b) a-SMA (N° vasos) en CA1: W=12±2<sup>1</sup>, SH=7±1, SH+S=6±0.6, SH+S+L=10±1<sup>1</sup>, SH+S+A=6±1 vasos/mm<sup>2</sup> (<sup>1</sup>p<0.05 vs SH, SH+S, SH+S+A); c) NTir (daño proteínas): W=361±104<sup>1</sup>, SH=474±84, SH+S=596±66<sup>2</sup>, SH+S+L=359±78, SH+S+A=516±134 μm<sup>2</sup>, (<sup>1</sup>p<0.05 vs SH+S, <sup>2</sup>p<0.05 vs SH+S+L), NTir estaba asociada al área perivascular; d) MCP-1 (marcador inflamatorio): W=2.24±1.6<sup>1</sup>, SH=6.43±1.75, SH+S=10.1±3.3, SH+S+L=6.42±1.9, SH+S+A=7.56±2.44 [μm<sup>2</sup> x 10<sup>-3</sup>] (<sup>1</sup>p<0.05 vs SH, SH+S, SH+S+A). N° de neuronas en CA1: sin diferencias entre grupos. El desarrollo de los procesos astrocíticos en CA1 era superior en SH+S+L y WKY a los otros grupos (p<0.05), coincidiendo con una mayor densidad vascular. Conclusión: en la HTA, la protección de astrocitos - proveedores soporte metabólico a las neuronas- subyacería la prevención del daño cerebral por bloqueo AT1, excediendo el efecto dependiente del descenso de la presión arterial.

## ONCOLOGÍA 5

**279. (79) ROL DEL FGF-2 EN EL MECANISMO DE ACCIÓN ANTITUMORAL DE BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG)**  
Langle Y.<sup>1</sup>; Lodillinsky C.<sup>2</sup>; Góngora A.<sup>3</sup>; Baldi A.<sup>4</sup>; Casabé A.<sup>5</sup>; Eiján A.<sup>6</sup>  
*Instituto de Oncología Ángel H Roffo*<sup>1 2 5 6</sup>; *Instituto de Biología y Medicina Experimental*<sup>3 4</sup>  
yaninalangle@yahoo.com.ar

Bacilo Calmette Guerin (BCG) es el tratamiento estándar para prevenir recidivas y progresión del cáncer vejiga (CaV) superficial de alto grado histológico. BCG inhibe el crecimiento s.c. de células de CaV murinas MB49, generando un tejido fibrótico. In vitro observamos que BCG promueve la muerte de la línea MB49. Además, BCG induce proliferación y diferenciación de fibroblastos (FB) en forma directa o vía factores solubles liberados por los macrófagos (MAC), siendo el FGF-2 uno de esos factores. El objetivo de este trabajo fue estudiar si el FGF-2 liberado en respuesta a BCG es el responsable de la activación de los FB y participa en la inhibición del crecimiento tumoral en esta inmunoterapia. La inhibición del crecimiento tumoral por tratamiento con BCG va acompañada de un incremento en la expresión de FGF-2 (inmunohistoquímica). En un ensayo de reparación de heridas in vivo observamos que los MAC de un ratón portador de tumor tratado con BCG, incrementan la cicatrización e inducen la expresión de FGF-2 (inmunohistoquímica). En ambos casos se observa diferenciación de FB medido como expresión de actina de músculo liso alfa. La proliferación de FB inducida por el medio condicionado (Mc) de MAC tratados con BCG (p<0,001) se revierte en presencia del anticuerpo bloqueante de FGF-2 (p<0,001) por ensayo de <sup>3</sup>HTi. Por otro lado, el tratamiento in vitro con FGF-2 no modifica la proliferación de las células de CaV MB49, mientras que el tratamiento combinado con BCG promueve la muerte de las MB49 de modo similar a BCG solo (p<0,001) (MTS). En un ensayo piloto in vivo, FGF-2 (5ng/ratón intra-tumoral 3 veces por semana) reduce el tamaño tumoral (Control: 233±50 mm<sup>2</sup> vs FGF-2: 132±40 mm<sup>2</sup>; n=5 p=0,0061 Student T). Concluimos que el FGF-2, liberado por MAC, sería uno de los factores involucrados en la remodelación del estroma en respuesta a BCG. Este factor no revertiría la muerte de las células de CaV inducida por BCG y contribuiría in vivo a la reducción del crecimiento tumoral.

**280. (234) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN Y DEL ROL DE HEMOXIGENASA-1 EN CARCINOMAS MAMARIOS**

Gandini N.<sup>1</sup>; Andrés N.<sup>2</sup>; Buschiazzo M.<sup>3</sup>; Lopéz Romero A.<sup>4</sup>; Fermento M.<sup>5</sup>; Rivadulla M.<sup>6</sup>; Facchinetti M.<sup>7</sup>; Curino A.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Biología Básica del Cáncer Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca Inibibb Cct Bahía Blanca CONICET*<sup>1 2 3 5 7 8</sup>; *Iaca Laboratorios*<sup>4</sup>; *servicio de Patología Hospital Municipal Dr. Leónidas Lucero Bahíablancas*<sup>6</sup>; *ngandini@uns.edu.ar*

La hemoxygenasa-1 (HO-1) está seriamente implicada en el desarrollo y progresión tumoral, presentando actividad antitumoral en algunos tipos de cáncer y actividad pro-proliferativa y antiapoptótica en otros. En carcinomas mamarios hay pocos trabajos que describan el papel de HO-1 en la progresión tumoral, la mayoría realizados en líneas celulares. Por ello, los objetivos de este trabajo fueron investigar la expresión de HO-1 en carcinomas mamarios humanos, analizando su correlación con parámetros clínicos-patológicos y profundizar los estudios del rol de esta enzima en el cáncer de mama. Se emplearon 73 carcinomas mamarios estadios II y III y se realizó IHC para HO-1. Se observó sobreexpresión de HO-1 en el tumor con respecto a las zonas adyacentes no malignas (p=0,001), con una localización inusual nuclear en el 48% de los tumores. Se corroboraron los resultados estudiando la expresión del ARNm de HO-1. La presencia de HO-1 en los tumores se correlacionó con una mayor sobrevida de las pacientes (log rank test, p=0,033). Los estudios *in vivo* en modelos animales mostraron aumento de HO-1, localización nuclear, reducción del tamaño tumoral (p=0,003) y presencia de necrosis tisular luego del tratamiento con hémima. Asimismo, la modulación de HO-1 con hémima en la línea LM3 disminuyó el índice de proliferación/supervivencia (p=0,01) aumentando la población celular apoptótica (p=0,003). No se observaron cambios en la expresión de las ciclinas D y E ni en los niveles de p27 o p21. En conclusión, HO-1 se encuentra sobreexpresada en los carcinomas mamarios y su expresión se correlaciona con una mayor sobrevida de las pacientes. Estos resultados concuerdan y son reforzados con los estudios *in vivo* en los cuales la modulación de HO-1 se asocia con reducción del tamaño tumoral y aumento de necrosis así como también con los ensayos *in vitro* en los cuales se observa disminución en la sobrevida celular por incremento en la apoptosis.

**281. (318) HO-1 PARTICIPA EN LA INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA Y EL HUESO**

Ferrando M.<sup>1</sup>; Meiss R.<sup>2</sup>; Elguero B.<sup>3</sup>; Gueron G.<sup>4</sup>; De Siervi A.<sup>5</sup>; Navone N.<sup>6</sup>; Vazquez E.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Apoptosis y Cancer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*<sup>1 3 4 5 7</sup>; *Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina*<sup>2</sup>; *MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA*<sup>6</sup>  
*mercedesf@qb.fcen.uba.ar*

La metástasis del cáncer de próstata (PCa) se caracteriza por el tropismo al hueso, siendo típicamente osteoblástica. Los osteoblastos producen factores que favorecen el crecimiento y sobrevida de las células de PCa, pero la naturaleza molecular de esta interacción no se conoce. Reportes previos de nuestro laboratorio documentaron que hemoxygenasa-1 (HO-1) se expresa en carcinomas prostáticos primarios y se localiza en el núcleo. Recientemente se reportó la participación de HO-1 en el metabolismo óseo. El objetivo de este trabajo es investigar el rol de HO-1 en la interacción entre las células de próstata y el hueso. Se analizó la expresión de HO-1 por inmunohistoquímica utilizando un *tissue micro array* (TMA) generado a partir de 12 especímenes provenientes de metástasis ósea de PCa (MDA Anderson Cancer Center), creciendo como xenógrafos en ratones machos CB17 SCID salvajes o castrados. Cada uno de estos tumores dio origen a diferentes modelos biológicos clínicamente relevantes para el estudio de la progresión del PCa. Todas las muestras del TMA

presentaron marcación citoplasmática de HO-1 de variada intensidad. Se detectó, además, marcación nuclear positiva intensa en 3/5 tumores con morfología neuroendócrina. La expresión de HO-1 se correlacionó con otros marcadores como PSA, AR y Ki-67. Además, mediante estudios *in vitro* realizados en co-cultivos de células de PCa (PC3, osteolítica) con PMO (cultivos primarios de osteoblastos de ratón) demostramos por RTqPCR que la inducción de HO-1 en las células de PCa altera la expresión de genes involucrados en la morfogénesis ósea (DKK-1, Runx-2, OPN). Mediante microscopía confocal se detectaron diferencias en la localización nuclear de b-catenina en PMO co-cultivados con PC3. Estos resultados claramente indican la participación de HO-1 en la interacción entre las células de próstata y el hueso y el estudio de los mecanismos moleculares de dicha interacción brindará efectivas intervenciones terapéuticas.

**282. (530) IMPORTANCIA DE LOS DIFERENTES RECEPTORES DE ÁCIDO RETINOICO SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA.**

Campodónico P.<sup>1</sup>; Berardi D.<sup>2</sup>; Díaz Bessone M.<sup>3</sup>; Motter A.<sup>4</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>5</sup>; Urtreger A.<sup>6</sup>; Farias E.<sup>7</sup>; Todaro L.<sup>8</sup>  
 Instituto de Oncología Angel Roffo<sup>1 2 3 4 5 6 8</sup>; Mount Sinai School of Medicine NY USA<sup>7</sup>  
 pcampod@yahoo.com

Los retinoides (Rds) son de gran importancia biológica por su participación en diferenciación y apoptosis celular. Los Rds han sido evaluados en ensayos clínicos en prevención del cáncer. Centramos nuestros estudios en la línea celular tumoral mamaria murina LM38-LP que expresa los principales receptores retinoides RAR/RXR. Para entender la importancia de cada RAR respecto a la diseminación metastásica y crecimiento tumoral, generamos líneas transfectadas establemente de LM38-LP con shRNA contra RARa, RARb o RARg. Estas células fueron inoculadas en forma ortotópica en ratones singéneos BALB/c. Diez días post inoculación, cuando los tumores fueron palpables, los ratones recibieron pellets con o sin ATRA (10mg/ratón) durante 3 semanas y analizamos el volumen tumoral y metástasis espontáneas en pulmón. En aquellos ratones inoculados con las células LM38-LP control (sin modificar genéticamente), el tratamiento con ATRA disminuyó significativamente el volumen tumoral y el número de metástasis espontáneas (pd<sup>0,05</sup>). Los tumores y metástasis originadas por células transfectadas con shRNA contra RARa, b o g no respondieron a ATRA. La ausencia de RARb llevó a la pérdida total de la capacidad metastásica, sugiriendo la importancia de RARb en la progresión maligna. Por el contrario, la pérdida de RARa y RARg disminuyó el crecimiento tumoral en la glándula mamaria respecto del control (1,1875 mm<sup>3</sup> vs 463,638 mm<sup>3</sup> control, pd<sup>0,05</sup>), sin embargo promovió la formación de metástasis en pulmón (16 (12-16) vs 21 (16-21) control) sugiriendo que estos RARs podrían participar en la prevención de la diseminación metastásica. Conclusión: estos resultados demuestran que los principales RARs a, b y g están implicados, de diferentes formas, tanto en el crecimiento tumoral local como en la colonización del órgano secundario.

**283. (533) ESTUDIO DE CÉLULAS TRONCALES EN UN MODELO DE CARCINOMAS MAMARIOS MURINOS CON DISTINTO GRADO DE RESPUESTA HORMONAL**

Guillardoy T.<sup>1</sup>; Cerliani J.<sup>2</sup>; Lanari C.<sup>3</sup>  
 IBYME<sup>1 2 3</sup>  
 guillardoy@dna.uba.ar

Se hipotetiza que las células troncales de cáncer de mama tendrían baja expresión de receptores hormonales. Una forma de enriquecer los cultivos de cáncer de mama en células troncales es el cultivo en mamoesferas. El objetivo general de nuestro trabajo es estudiar la evolución de las células troncales a lo largo de la progresión tumoral en un tumor que ha evolucionado por distintas etapas de hormono dependencia. Para ello, se caracterizaron las células creciendo en mamoesferas de tumores C4-HD (hormono dependiente) y C4-HI (hormono independiente). Se analizaron por citometría de flujo el perfil de marcadores de superficie aso-

ciados al fenotipo troncal (CD44<sup>High</sup>/CD24<sup>Low</sup>). Se pudo observar un aumento similar en la subpoblación con este fenotipo en los cultivos en mamoesferas de C4-HD y C4-HI en comparación con células creciendo en plástico. Luego, se midió la expresión de los receptores de hormonas esteroides y los receptores del FGF (FGFRs) por *Western Blot*, comparando las condiciones de cultivo de mamoesferas respecto de las células creciendo adheridas al sustrato. No se observaron diferencias significativas en la expresión de los receptores hormonales, pero sí un aumento (p<0,05) en la expresión de los FGFRs 2 y 4 en las mamoesferas de ambos tumores. Por inmunofluorescencia se observó además marcación nuclear para el FGFR-2 y no para FGFR-4. Nuestros resultados sugieren que las células con fenotipo troncal expresarían receptores hormonales y altos niveles de FGFR. La sobreexpresión de FGFR-4 es exclusiva del crecimiento en mamoesferas y por lo tanto podría tratarse de un marcador de células troncales. Falta determinar si la mayor expresión se debe a una adaptación fenotípica al crecimiento independiente de anclaje o si es propio del fenotipo troncal. Asimismo concluimos que las células troncales en este modelo serían células progenitoras que expresan receptores hormonales.

**284. (751) MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN TISULAR ASOCIADOS CON LA REGRESIÓN PROVOCADA POR DIFERENTES TRATAMIENTOS ANTITUMORALES EN CÁNCER DE MAMA**

Polo M.<sup>1</sup>; Riggio M.<sup>2</sup>; Lanari C.<sup>3</sup>; Novaro V.<sup>4</sup>  
 Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 3 4</sup>  
 polo@dna.uba.ar

En el modelo de carcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) existe una variante tumoral C4-HD que requiere del MPA para crecer y otra variante denominada C4-HI que crece en presencia o ausencia de MPA. Los tumores C4-HI presentan un fenotipo diferenciado con estructuras de tipo ductal, mientras que los tumores C4-HD son más indiferenciados. El objetivo de este trabajo fue evaluar los mecanismos moleculares que se disparan durante la regresión provocada por diferentes tratamientos antitumorales y analizar el comportamiento de ambos tumores *in vivo* e *in vitro*, utilizando un sistema de cultivo tridimensional (3D) en Matrigel. Por inmunofluorescencia e inmunohistoquímica se detectó *in vitro* e *in vivo* respectivamente, una mayor expresión del marcador luminal citoqueratina 8 en los tumores C4-HI y del marcador basal citoqueratina 14 en los tumores C4-HD. Luego del tratamiento con antagonistas endócrinos (RU486, Tamoxifeno e ICI182780) y con el inhibidor de la vía PI3K/AKT Wortmannin, los tumores C4-HI regresionaron con un mayor grado de reorganización tisular y un aumento en la expresión de marcadores de diferenciación citoqueratina 8, MUC1 y el factor de transcripción GATA-3. Comparando la regresión del tamaño tumoral, los tumores C4-HD son más sensibles (p<0.01) al tratamiento con antagonistas hormonales, mientras que los tumores C4-HI presentaron una mayor sensibilidad (p<0.01) a la inhibición de quinasas. Los cultivos 3D de células tumorales C4-HD y C4-HI reprodujeron la sensibilidad diferencial que los tumores presentaron *in vivo* frente al tratamiento con antagonistas endócrinos e inhibidores de la vía PI3K/AKT. La caracterización de los eventos implicados en la regresión de los tumores C4-HD y C4-HI permitirá diseñar tratamientos óptimos para cada variante tumoral. El uso de cultivos 3D representa una herramienta útil y simplificada para la caracterización molecular de los tumores mamarios y para el ensayo de nuevas terapias.

### FARMACOLOGÍA 3

**285. (66) NEUTROPENIA Y FILGRASTIM EN PACIENTES POST-TAMO: ELEVACIÓN DEL RECUENTO DE NEUTRÓFILOS CON DOS MARCAS DIFERENTES**

Fajreldines A.<sup>1</sup>; Valerio M.<sup>2</sup>; Davide L.<sup>3</sup>; Bazzano M.<sup>4</sup>  
 Hospital Austral<sup>1 2 3 4</sup>  
 afajreldin@cas.austral.edu.ar

**Introducción:** Los pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, son pacientes inmunocomprometidos que pueden sufrir neutropenia. Mediante la administración de factores estimulantes de formación de colonias de granulocitos, se busca una rápida respuesta en el incremento del número de neutrófilos para hacer frente a posibles infecciones que comprometan la vida del paciente. **Objetivo:** Evaluar el recuento de neutrófilos en 5 pacientes neutropénicos post trasplante de médula ósea heterólogo a las 24hs de haber recibido filgrastim de dos marcas diferentes; uno de laboratorio multinacional con investigación biotecnológica (laboratorio 1) y otro nacional (laboratorio 2). **Materiales y Métodos:** Análisis retrospectivo y prospectivo de los 5 pacientes. Evaluación del recuento de neutrófilos en los pacientes del estudio, monitoreo de la evolución. **Resultados:** La media de edad de los pacientes es de 41 años. La distribución de sexos fue la siguiente: n=4 hombres, n=1 mujeres. Motivos de ingreso: neutropenia con recuento de neutrófilos menor a 500/mm<sup>3</sup>; n = 2 con recuento de neutrófilos entre 500 y 1000/mm<sup>3</sup>. Sintomatología febril: dos o más registros de temperatura axilar de 38,1°C o más en 24hs; un solo paciente con registro mayor o igual a 38,5°C.

Tabla 1: Recuento de neutrofilos en la población de pacientes con ambas marcas

Filgrastim de laboratorio	Media días de n	neutrófilos tratamiento	neutrófilos por mm <sup>3</sup> por mm <sup>3</sup> (24hs tto) (7 días tto)
1	5 16 (vía SC)	n=5: 5000 -10000  n=3: < o = 500	Todos alcanzaron los niveles esperados a las 24hs de tratamiento.  n=0: < o = 500
2	5 18 (vía SC)	n=1: 1500 - 5000 n=1: > 5000	n=0: 1500 - 5000 n=5: > 5000

**Conclusiones:** Los casos fueron acotados pero elocuentes en su respuesta dada la gravedad del estado de los pacientes y sus posibles complicaciones

**286. (600) DESARROLLO DE NUEVOS PROTOTIPOS FARMACOLÓGICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA HUMANA: ESTUDIO DEL MECANISMO MOLECULAR PRO-APOPTÓTICOS DE 7,8-DIHIIDROXI-4-METILCUMARINA.**

Alonso E.<sup>1</sup>; Vazquez R.<sup>2</sup>; Gomez N.<sup>3</sup>; Shayo C.<sup>4</sup>; Davio C.<sup>5</sup>

Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IBYME <sup>1 2 3 4</sup>; Cátedra de Química Medicinal, FFYB, UBA <sup>1 2 3 5</sup> alonsoeliam@yahoo.com.ar

Muchas células cancerígenas son capaces de evadir la apoptosis logrando sobrevivir, a pesar de haber sufrido transformaciones genéticas y morfológicas. Por esta razón la inducción de apoptosis es un enfoque importante para la terapia contra el cáncer. Previamente hemos descrito que la 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (DHMC) induce apoptosis en la línea celular promonocítica U937 mediada por la activación de la vía JNKs y la inhibición de las vías ERK1/2 y PI3K/Akt, pero las bases moleculares que subyacen al mecanismo de muerte celular programada son aún desconocidos. El presente estudio se centra en dilucidar la vía apoptótica implicada en la muerte celular inducida por DHMC en células leucémicas U937. El tratamiento con DHMC (250 µM) provocó la activación proteolítica de la caspasa-9 a las 6 hs (Western Blot), característico de la activación de la vía intrínseca. Confirmando la participación de caspasa-9 en el proceso apoptótico, el pretratamiento con inhibidores específicos de caspasa 9 disminuyeron la actividad de caspasa 3 en un 66% (ensayo colorimétrico en placa). Además, la expresión de las proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub> se mantienen sin cambios en respuesta a DHMC (Western Blot). Los niveles de radicales libres de oxígeno (ROS) intracelulares aumentan a partir de 1 hora de tratamiento (fluorescencia con DFC-DA) mientras que los de anión superóxido lo hacen a partir de las 6 h (Citometría con DHE). El pretratamiento con el antioxidante N-acetil-L-cisteína 1 mM retrasó el incremento de ROS por más de

6 hs. Asimismo, las células tratadas con DHMC experimentan una disminución del potencial de membrana mitocondrial a las 14 hs (Citometría con DiOC<sub>2</sub>). Estos resultados demuestran que el efecto pro-apoptótico de DHMC en la línea celular U937 está mediada por la vía intrínseca de apoptosis.

**287. (68) MODULACIÓN MUSCARÍNICA DE LA PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS SCA-9. PARTICIPACIÓN DE LOS ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS, ARGINASAS Y CICLOOXIGENAS**

Español A.<sup>1</sup>; Schweizer J.<sup>2</sup>; Sales M.<sup>3</sup>

CEFYBO<sup>1 2 3</sup>

aespan\_1999@yahoo.com

Se ha descrito la importancia de las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS), arginasa (A) y ciclooxigenasa (COX) en la biología tumoral. Decidimos estudiar la participación de las NOS, A y COX así como su regulación recíproca, en el efecto del agonista muscarínico carbacol (Carb) sobre la proliferación de células tumorales de glándula submaxilar murina, SCA-9. La proliferación se determinó por MTT; la actividad de NOS por el reactivo de Griess; la actividad de A por un método colorimétrico que detecta urea y la actividad de COX por RIA de PGE<sub>2</sub>. El tratamiento con Carb aumentó la proliferación con una concentración efectiva máxima de 10<sup>-9</sup>M (31±2% vs. basal p<0,001). Dicho efecto se revirtió en todos los casos por la preincUBación con el antagonista muscarínico atropina (AT) (10<sup>-5</sup>M) o con los inhibidores enzimáticos: de COX, indometacina (INDO) (10<sup>-6</sup>M), de NOS, L-NMMA (10<sup>-4</sup>M) o de A, NOHA (10<sup>-4</sup>M) (n=8 p<0,001 vs Carb). También observamos que el Carb estimuló la actividad de NOS, siendo la concentración efectiva máxima 10<sup>-9</sup>M (72±26% vs. basal p<0,001). Este efecto fue revertido por la preincUBación con L-NMMA e INDO, e incrementado por la preincUBación con NOHA (n=5 p<0,001 vs. Carb). El Carb estimuló la actividad de A a una concentración de 10<sup>-9</sup>M (171±16% vs basal p<0,001) y este efecto se incrementó en presencia de L-NMMA lo que confirma que NOS y A comparten el mismo sustrato. Además la preincUBación con INDO potenció el efecto del Carb sobre la A revelando una modulación negativa de los productos de COX (n=6 p<0,001 vs Carb). Al estudiar la actividad de COX, observamos que el Carb produjo un efecto estimulante a la concentración de 10<sup>-9</sup>M (85±6% vs basal p<0,001) que fue revertido al preincUBAr las células con NOHA, e incrementado al preincUBAr las con L-NMMA (n=6 p<0,001 vs. Carb). Concluimos que la estimulación muscarínica promueve la proliferación de células SCA-9 mediante un mecanismo complejo de "cross talk" entre las enzimas NOS, A y COX.

**288. (405) REDUCCIÓN POR LANTANA GRISEBACHII DE LA LINFOTOXICIDAD INDUCIDA POR ARSÉNICO**

Soria E.<sup>1</sup>; Quiroga P.<sup>2</sup>; Goleniowski M.<sup>3</sup>; Bongiovanni G.<sup>4</sup>

UNC<sup>1 2</sup>; CONICET<sup>1 3 4</sup>

elioandres@yahoo.es

La respuesta inmune puede ser interferida por diferentes condiciones inmunosupresoras, tal como la exposición tóxica a arsénico induciendo estrés oxidativo en linfocitos. Dado que antioxidantes dietarios podrían ser tener actividad fitorremediadora, el objetivo de este trabajo fue identificar ex vivo un extracto vegetal bioactivo frente As. Se evaluaron extractos (hexano, agua TA, agua 95°C: hw) de M. pentlandiana (MP) y L. grisebachii (LG) en cultivos linfocitarios (provenientes de bazo de rata Wistar) tras determinar el contenido de polifenoles de cada uno, estudiándose sus efectos en la viabilidad celular y la formación de oxidantes celulares (ANOVA, p<0,05). La extracción con hw permitió obtener un extracto con 20% de contenido polifenólico a partir de los tejidos aéreos de ambas plantas, superando a los otros solventes (p<0,05). Tras descartar los extractos hexánicos por ser tóxicos (p<0,0001), se determinó que LG(hw) fue el extracto con mayor capacidad antioxidante que MP(hw), reduciendo la formación de nitritos y radicales en linfocitos T y B provenientes de animales control y crónicamente expuestas a arsénico (p<0,05). Se encontró que la concentración de arsénico tenía relación directa con el nivel de oxidantes en la serie T (p<0,05; R<sup>2</sup>=0,33), mientras que B era

menos sensible a dicho efecto ( $p=0.08$ ;  $R^2=0.19$ ). La reducción de la viabilidad linfocitaria (% respecto a control) por  $1 \mu\text{M}$  de arsenito sódico fue prevenida por LG(hw) de manera dosis-dependiente ( $p<0.0001$ ):  $10.5\pm 0.7$ ,  $30.2\pm 1.5$ ,  $19.9\pm 1.4$ ,  $60.6\pm 1.0$  (linfocitos T),  $61.3\pm 4.3$ ,  $36.8\pm 1.8$ ,  $79.5\pm 5.6$ ,  $67.5\pm 1.1$  (linfocitos B), 0, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/mL}$  de extracto, respectivamente. En conjunto, los resultados indican que el extracto acuoso de *L. grisebachii* es antioxidante y linfoprotector frente al efecto deletéreo del arsénico, pudiendo estar esto asociado a su alto contenido polifenólico.

**289. (598) EL RANELATO DE ESTRONCIO REVIERTA LOS EFECTOS DELETÉREOS CAUSADOS POR LOS AGE SOBRE OSTEOBLASTOS EN CULTIVO. ROL DE LOS CANALES DE CALCIO.**

Fernandez J.<sup>1</sup>; Molinuevo. M.<sup>2</sup>; Sedlinsky. C.<sup>3</sup>; Schurman. L.<sup>4</sup>; Mccarthy. A.<sup>5</sup>

Grupo de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral. Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de La Plata.<sup>1 2 3 4 5</sup>  
jmfernandez33@yahoo.com.ar

En pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 la acumulación de productos de glicación avanzada (AGE) está implicado en el desarrollo de complicaciones crónicas tales como las óseas. Previamente hemos demostrado que los AGE inhiben el crecimiento y la diferenciación de los osteoblastos. Recientemente se ha demostrado que el ranelato de estroncio (RaSr) actúa como un agente anabólico y anti-resortivo sobre el hueso. Sin embargo no se ha reportado hasta ahora el efecto de este fármaco sobre complicaciones esqueléticas causadas por la diabetes. En el presente trabajo hemos evaluado si el RaSr es capaz de revertir los efectos deletéreos de la albúmina (ASB) modificada por AGE, sobre osteoblastos en cultivo MC3T3E1 de ratón, así como el rol del calcio en su mecanismo de acción. Encontramos que los AGE causan inhibición de la proliferación osteoblástica (efecto máximo a 200  $\mu\text{g/mL}$  de AGE:  $63\pm 6\%$  vs. ASB control,  $p<0.01$ ). Por otro lado, el RaSr 0,1mM estimula la proliferación celular ( $121\pm 6\%$  vs. ASB,  $p<0.05$ ), mientras que su co-incUBación con AGE revierte completamente la inhibición de la proliferación causada por AGE ( $152\pm 3\%$  vs. AGE,  $p<0.01$ ). Cuando evaluamos la diferenciación celular, encontramos que RaSr 0,1mM produce un incremento en la actividad de fosfatasa alcalina (FAL,  $125\pm 7\%$  vs. ASB,  $p<0.01$ ) y en la producción de colágeno tipo 1 (Col1,  $118\pm 3\%$  vs. ASB,  $p<0.05$ ); mientras que 100  $\mu\text{g/mL}$  de AGE produce una disminución significativa en ambos parámetros (FAL:  $65\pm 5\%$  vs. ASB,  $p<0.001$ ; Col1:  $66\pm 7\%$  vs. ASB,  $p<0.001$ ). El co-tratamiento de RaSr con AGE revierte los efectos deletéreos de los AGE (FAL:  $213\pm 14\%$  vs. AGE,  $p<0.01$ ; Col1:  $126\pm 3\%$  vs. AGE,  $p<0.05$ ). Por otro lado la co-incUBación con nifedipina bloquea los efectos del RaSr, pero no los de los AGE. Estos resultados muestran que el RaSr actúa como un agente anabólico sobre osteoblastos en cultivo, y que es capaz de revertir efectos deletéreos inducidos por AGE, por mecanismos que implican la activación de canales de calcio.

**290. (199) LA CANTIDAD DIARIA DE VITAMINA D2 Y D3 RECOMENDADA ES SUFICIENTE PARA ALCANZAR LOS NIVELES DESEABLES DE 25OHD?**

Gonzales Chaves M.<sup>1</sup>; Marotte C.<sup>2</sup>; Pellegrini G.<sup>3</sup>; Friedman S.<sup>4</sup>; Zeni S.<sup>5</sup>

Sección Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas José de San Martín.<sup>1 2 3 5</sup>; Cat. Bioquímica Gral. y Bucal. Foba.<sup>1 2 3 4 5</sup>  
macagch@yahoo.com.ar

Existen controversias acerca de si la vitamina D2 (D2) es tan efectiva como la vitamina D3 (D3) respecto de los niveles de 25hidroxivitamina D (25OHD) al administrarlas en dosis equivalentes. Objetivo: determinar en un modelo de insuficiencia de vitamina D (vitD) y osteopenia establecida si la administración diaria de D2 y D3 en dos dosis diferentes (100 y 200IU%) son igualmente efectivas para aumentar los niveles de 25OHD. Se ovariectomizaron (OVX) 64 ratas Wistar (200 $\pm$ 50g) las que durante 15 días

postcirugía recibieron una dieta comercial (Granave SA, Bs As) con aporte de vitD. Luego por 45 días adicionales recibieron una dieta semisintética según AIN93 sin aporte de vitD (0UI%). A los 60 días se las dividió en 2 grupos que recibieron: A 100IU% de D2 ó D3 y B 200IU% de D2 ó D3. El nivel basal sanguíneo de 25OHD (ng/ml) se determinó al azar en 8 animales de cada grupo ( $n=16$ ) y luego en todas las ratas a los tiempos: 60, 85 y 105 días de experiencia. Se utilizó un equipo comercial que en la actualidad se considera que detecta por igual a 25OHD3 y 25OHD2 (<sup>125I</sup>RIA Kit, DiaSorin, Stillwater, MN, USA). Resultados de los niveles de 25OHD (ng/ml) ( $x \pm \text{ES}$ ): Basal:  $19.2\pm 0.3$  ng/ml

Grupo A	T=60	T=85	T=105
OVXD3	6.0 $\pm$ 0.7a	12.9 $\pm$ 2.5c	14.5 $\pm$ 2c
OVXD2	6.4 $\pm$ 0.5a	8.9 $\pm$ 1.0b	8.7 $\pm$ 0.9b
Grupo B			
OVXD2	5.0 $\pm$ 0.9a	16.6 $\pm$ 1.5b	15.5 $\pm$ 0.3b
OVXD3	5.0 $\pm$ 0.6a	15.1 $\pm$ 0.6b	15.9 $\pm$ 1.0b

Letras diferentes indican un  $p<0.05$

A T=60 la 25OHD no presentó diferencias entre los grupos; en el grupo B no se observaron diferencias desde el día 85 hasta el final de la experiencia; contrariamente, en el grupo A los niveles alcanzados por aquellos animales que recibieron D3 fueron significativamente mayores que aquellos que recibieron D2. Por otro lado, no se lograron los niveles basales de 25OHD en ninguno de los dos grupos. Conclusiones: Bajo nuestras condiciones experimentales, la D3 en la cantidad recomendada es más efectiva que la D2, pero dicha diferencia desaparece cuando la cantidad administrada duplica a la cantidad recomendada. PIP 6483

**291. (728) DESARROLLO BIOTECNOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE TELOMERASA Y SUS VARIANTES DE SPLICING EN CÁNCER DE COLON.**

Gomez L.<sup>1</sup>; Adi J J.<sup>2</sup>; Bertani D.<sup>3</sup>; Roque M.<sup>4</sup>

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM, Facultad de Ciencias Médicas, Uncuyo<sup>1 4</sup>; Servicio de Gastroenterología del Hospital Lagomaggiore Mendoza.<sup>2</sup>; Servicio de Cirugía del Hospital Lagomaggiore Mendoza<sup>3</sup>  
lgomez@fcm.uncu.edu.ar

Una de las características tumorales estudiadas como posible marcador precoz del cáncer de colon es el ARNm de la subunidad proteica de telomerasa (hTERT). Esta enzima presenta 2 sitios de splicing más frecuentes (a y b). Basándonos en estos datos, nuestro objetivo fue desarrollar un sistema cuali/cuantitativo para la detección sensible y específica de las 4 variantes más frecuentes de splicing de la ribonucleoproteína telomerasa ( $\alpha+\beta+$ ,  $\alpha-\beta+$ ,  $\alpha+\beta-$  y  $\alpha-\beta-$ ). El desarrollo biotecnológico se basó en la estrategia "Reverse-Transcripted Multiplex Ligation dependent Probe Amplification" (RT-MLPA). Se comenzó con una retrotranscripción del ARN total obtenido de la línea celular HeLa y de tumores colonicos mediante tres primers distintos para telomerasa (hTERT total, variantes  $\beta+$  y  $\beta-$ ) y uno para  $\beta 2$ -microglobulina ( $\beta 2$ -M) como control "housekeeping". Luego, el ADNc fue incubado con distintos pares de sondas ( $\beta 2$ M, hTERT total, y la variante  $\alpha+$ ), posteriormente ligadas, y amplificadas con el mismo set de primers marcados. Los productos fueron resueltos por electroforesis convencional en geles de poliacrilamida y luego por electroforesis capilar en un secuenciador ABI3130 y analizados con el programa GenMarker v1.75. Una vez verificado su buen funcionamiento, se realizó una retrotranscripción en conjunto (multiplex) para  $\beta 2$ M y hTERT total y el ADNc obtenido fue hibridado con una mix de pares de sondas ( $\alpha 2$ M, hTERT total). En segunda instancia se realizó un primer ensayo aislado para  $\alpha+\beta+$  y otro para  $\alpha+\beta-$  y luego se realizaron a ensayos con mezclas de primers y sondas para  $\beta 2$ M y las variantes  $\alpha+\beta+$  y  $\alpha+\beta-$ . Los resultados obtenidos nos permiten confirmar que el diseño es eficiente y específico para detectar  $\beta 2$ M, hTERT total y las 2 combinaciones de las variantes de splicing ( $\alpha+\beta+$ ,  $\alpha+\beta-$ ) en tumores de colonicos y células HeLa.

## REPRODUCCIÓN 3

**292. (104) NORADRENALINA MODULA LA LIBERACIÓN DE GNRH, P4 BAX Y BCL2 Y LA EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS 3 $\beta$ -HSDY 20 $\alpha$ -HSD EN INCUBACIONES DE OVARIO.**

Bronzi C.<sup>1</sup>; Daneri Becerra C.<sup>2</sup>; Vega O. A.<sup>3</sup>; Mohamed F.<sup>4</sup>; Sosa Z.<sup>5</sup>; Rastrilla A.<sup>6</sup>

Labir-Universidad Nacional de San Luis<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
cdbronzi@hotmail.com

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un decapeptido que juega un rol endocrino en la regulación de los procesos reproductivos siendo un regulador autocrino y paracrino en el ovario. El objetivo del trabajo fue: a) Evaluar si noradrenalina (NA) en incubaciones de ovario obtenidos de ratas en diestro II (DII) influyen en el contenido de GnRH, P<sub>4</sub> y en la actividad y expresión de sus enzimas de síntesis 3 $\beta$ -HSD y degradación 20 $\alpha$ -HSD, b) Si el neurotransmisor modifica la expresión de los marcadores de apoptosis Bax y Bcl<sub>2</sub> y c) Evaluar los posibles cambios histológico que puedan producirse durante los periodos de incubación. Para el trabajo se utilizaron incubaciones de ovario con NA (10<sup>-6</sup>M) en solución Krebs Ringer, pH: 7,4 en baño metabólico a 37<sup>o</sup> C. Se extrajo líquido de incubación a los 60 y 120 min. Las determinaciones de P<sub>4</sub> y GnRH se realizaron por RIA, las actividades enzimáticas por método espectrofotométrico y la expresión de las enzimas por RT-PCR. Un p<0,05 fue de significado estadístico. Cuando se adicionó NA aumentó GnRH (p<0.001), disminuyó P<sub>4</sub> (p<0.001) y la actividad y expresión génica de 3 $\beta$ -HSD (p<0.001) mientras, aumentó la actividad y expresión de 20 $\alpha$ -HSD (p<0.001) con respecto al control. La expresión de Bax aumentó y Bcl<sub>2</sub> disminuyó. En el estudio histológico se observaron cambios en la histoarquitectura ovárica en el periodo de incubación. Conclusiones: a) por primera vez se demuestra NA produce incremento de GnRH a nivel ovárico; b) NA influye sobre la fisiología ovárica, regulando la actividad y expresión génica de las enzimas responsables de la liberación de P<sub>4</sub>; c) Modula la expresión génica de los marcadores de apoptosis Bax y Bcl<sub>2</sub>. d) NA produjo alteraciones histológicas ováricas compatibles con procesos atretogénicos. Estos eventos muestran que el aumento del tono catecolaminérgico podría ser responsable de los desordenes reproductivos en clínica endocrinológica.

**293. (129) ANOMALÍAS GÉNERO-DEPENDIENTES EN EL METABOLISMO LÍPIDICO, FORMACIÓN DE NO Y EXPRESIÓN DE PPARALFA EN EL PULMÓN DE FETOS DE RATAS DIABÉTICAS.**

Kurtz M.<sup>1</sup>; Sosa M.<sup>2</sup>; Capobianco E.<sup>3</sup>; Jaberbaum A.<sup>4</sup>

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos<sup>1 2 3 4</sup>  
melisa\_kurtz@yahoo.com.ar

La diabetes materna afecta el desarrollo fetal y se asocia a mayor riesgo de patologías perinatales como el distrés respiratorio, vinculado a la disfunción del pulmón fetal. La activación del receptor activado por proliferadores peroxisomales  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) modula parámetros vinculados con el metabolismo lipídico y la homeostasis nitridérgica durante el desarrollo. Objetivo: evaluar el efecto de la diabetes experimental sobre los niveles de lípidos, la producción de NO y la expresión de PPAR $\alpha$  en el pulmón de fetos a término de ratas controles (C) y diabéticas (D). La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina (90 mg/kg). En el día 21 de gestación, se explantaron y sexaron fetos de ratas C y D para evaluar en el pulmón fetal la producción de NO (dosaje de nitros-nitritos), los niveles de lípidos (TLC y posterior densitometría) y la expresión de PPAR $\alpha$  (PCR). Resultados: Los niveles de fosfolípidos fueron similares en el pulmón de fetos hembra de ratas C y D, y fueron mayores en el pulmón de fetos macho de ratas D en relación a C (38%, p<0.001). El contenido de triglicéridos fue mayor en los pulmones de fetos hembra (88%, p<0.01) y macho (144%, p<0.001) de ratas D respecto a C. Los niveles de colesterol y ésteres de colesterol fueron similares en los pulmones de los fetos de ratas C y D. La producción de NO fue mayor en el pulmón de fetos hembra (21%, p<0.05) y macho

(13%, p<0.01) de ratas D en relación a C. La expresión de PPAR $\alpha$  fue similar en el pulmón de fetos hembra de ratas C y D y fue menor en el pulmón de fetos macho de ratas D en relación a C (0,93  $\pm$  0,04 vs 0,72  $\pm$  0,03 unidades relativas, p<0.001). Conclusiones: Es evidente la sobreacumulación lipídica y sobreproducción de NO en el pulmón de fetos de ratas diabéticas, alteraciones que en el macho se acompañan de una menor expresión de PPAR $\alpha$  y que podrían condicionar el normal desarrollo y función del pulmón en el período perinatal.

**294. (141) RATONES HIPERSECRETORES DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA PRESENTAN PROBLEMAS DE FERTILIDAD Y DEFECTOS EN LA EXPANSIÓN DE LAS CÉLULAS DEL COMPLEJO CÚMULUS-OVOCITO.**

Ratner L.<sup>1</sup>; Gonzalez B.<sup>2</sup>; Poutanen M.<sup>3</sup>; Huhtaniemi I.<sup>4</sup>; Calandra R.<sup>5</sup>; Rulli S.<sup>6</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental-CONICET<sup>1 2 5 6</sup>; Departamento de Fisiología, Universidad de Turku<sup>3</sup>; Imperial College of London, Reino Unido<sup>4</sup>; ratner@dna.uba.ar

Hemos demostrado previamente que ratones transgénicos que sobreexpresan la hormona gonadotropina corionica humana (hCG) presentan alteraciones en la ovulación y problemas de fertilidad (SAIC, 2009). El objetivo del presente trabajo fue estudiar un paso clave en el proceso de ovulación, como es la expansión del complejo cúmulus-ovocito (COC) en hembras inmaduras que sobreexpresan niveles moderados (hCG $\beta$ +) y elevados de hCG (hCG $\alpha\beta$  +), y en la cepa salvaje (wt). Estudios *in vivo* mostraron la falta de expansión de las células del COC en folículos de ovarios hCG $\alpha\beta$  + post-eCG/hCG en comparación con la correcta expansión vista en wt y hCG $\beta$ +. Se incubaron *in vitro*, COC provenientes de folículos antrales de hembras inmaduras hCG $\beta$ +, hCG $\alpha\beta$  + y wt en presencia de distintos estímulos capaces de activar la expansión del COC: FSH 5 UI/ml, dibutilil-AMPC 2 mM, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 1  $\mu$ M y forskolina 10  $\mu$ M. Tanto los COC de las hembras wt como de las hCG $\beta$  + expandieron correctamente con todos los tratamientos utilizados. En cambio, los COC de hCG $\alpha\beta$  + no respondieron con FSH, pero sí lo hicieron con el resto de las drogas. Como los COC de ovarios hCG $\alpha\beta$  + respondieron correctamente a PGE<sub>2</sub> *in vitro*, se intentó lograr la ovulación de hembras hCG $\alpha\beta$  + por inyección con PGE<sub>2</sub>. Sin embargo, no se consiguió la ovulación en las condiciones estudiadas. Dado que las hembras hCG $\beta$  + son capaces de ovular ante una inducción hormonal con eCG/hCG, se intentó revertir la infertilidad estimulándolas hormonalmente y apareándolas con machos wt a las 5, 6 y 8 semanas de edad. Se logró la preñez de las hembras hCG $\beta$  + sólo a las 5 semanas de edad. En conclusión, estos resultados demuestran que en hembras hCG $\alpha\beta$  + ocurriría un desacople entre los receptores de LH/FSH y la maquinaria de señalización de la vía de AMPC-PKA, provocando un defecto en la expansión del COC y la ovulación. En las hembras hCG $\beta$  +, en cambio, se logró revertir la infertilidad por inducción hormonal de la ovulación sólo en animales jóvenes.

**295. (183) LA LEPTINA MODULA LA ESTEROIDOGÉNESIS OVÁRICA A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN DEL CITOCROMO P450 11A1**

Bilbao M.<sup>1</sup>; Di Yorio M.<sup>2</sup>; Faletti A.<sup>3</sup>

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos CONICET Facultad de Medicina UBA<sup>1 2 3</sup>  
guillerminabilbao@hotmail.com

La leptina, proteína codificada por el gen de obesidad, es capaz de modular la función ovárica. En estudios previos encontramos que el tratamiento agudo con leptina inhibía el proceso ovulatorio de la rata con disminución de los niveles de progesterona (P<sub>4</sub>) sérica. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la leptina sobre la esteroidogénesis ovárica, especialmente sobre la proteína reguladora de la esteroidogénesis (STAR), responsable del acceso del colesterol al interior de la mitocondria, y del citocromo P450 11A1 (CYP11A1), que cataliza la formación

de pregnenolona, precursor de la P4. Para ello, utilizamos ratas inmaduras estimuladas con gonadotropinas (eCG/hCG) y tratadas con vehículo (C) o 5 dosis de leptina (L) (5 mg c/u) para mantener altos niveles de leptina plasmática. Determinamos la expresión ovárica del ARNm y de la proteína de StAR y de CYP11A1 por RT-PCR y Western blot, respectivamente. Ni el ARNm ni la proteína de StAR fueron alterados por el tratamiento agudo con leptina. Sin embargo, y consistente con la disminución de P4 sérica (C: 53±5 ng/ml, L: 32±3 ng/ml) determinada por radioinmunoensayo, este tratamiento causó disminución del contenido proteico de CYP11A1 (53%,  $P<0.01$ ). 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 o presencia de leptina (0.3-500 ng/ml). StAR no fue alterada por la presencia de leptina, pero la expresión proteica de CYP11A1 mostró un aumento (128%,  $P<0.01$ ) a bajas y una disminución (41%) a altas concentraciones de leptina, aunque este último resultado no fue significativo. La P4 en el medio de incubación mostró un patrón similar (C: 18±2, L1-10: 30±2, L300: 8±2;  $P<0.05$ ). Estos resultados sugieren que la leptina es capaz de modular los niveles de progesterona, al menos en parte, por modificar el contenido proteico de CYP11A1 en el ovario de rata.

**296. (194) ACIDO ÚRICO: POSIBLE MARCADOR DIFERENCIAL EN LOS SÍNDROMES HIPERTENSIVOS DEL EMBARAZO.**

Corominas A.<sup>1</sup>; Balconi S.<sup>2</sup>; Dietrich V.<sup>3</sup>; Maskin B.<sup>4</sup>; Damiano A.<sup>5</sup>

*Hospital Posadas*<sup>1 2 4</sup>; *Lab. De Biología de la Reproducción, Cat. Biología Celular, Dpto. Cs. Biológicas. Fac. Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires*<sup>3 5</sup>  
ana\_corominas@yahoo.com.ar

*Introducción:* La preeclampsia (PE) es un desorden hipertensivo específico del embarazo, cuya etiología es aún desconocida. Es responsable de 12% de muertes maternas en el mundo. Se diagnostica por la presentación de hipertensión y proteinuria en la segunda mitad de la gestación. La eclampsia (E) constituye la fase más severa de la PE y causa convulsiones que pueden llevar hasta la muerte de la madre y el bebé. La hipertensión gestacional (HG) se define como el desarrollo de hipertensión en una mujer embarazada de más de 20 semanas de gestación sin proteinuria. La predicción de riesgo de desarrollo de PE/E es complicada. *Hipótesis:* Los niveles de ácido úrico plasmático durante el curso del embarazo podrían diferenciar mujeres con HG en mayor riesgo de desarrollo de PE/E. *Diseño del estudio:* Estudio retrospectivo caso control de 138 mujeres (49 con embarazos sin complicaciones, 62 con PE, 17 con E y 10 con HG). *Resultados:* Se analizaron los valores del ácido úrico, proteinuria, urea y creatinina medidos antes y después de la semana 20 de gestación. A partir de la comparación de todos los grupos no encontramos diferencias significativas en los niveles de ácido úrico antes de la semana 20 de gestación. Sin embargo, luego de la semana 20 de gestación los niveles de ácido úrico de los grupos con PE/E fueron mayores que los niveles de mujeres con HG ( $p<0.05$ ). Los niveles de urea y creatinina séricas de todos los grupos no fueron significativamente diferentes y las proteinurias fueron normales hasta que la sintomatología se presentaba completa en el grupo PE/E. *Conclusiones:* Un aumento en los niveles de ácido úrico, documentado por dos medidas secuenciales entre las semanas 20 y 30 de gestación, puede ser útil para definir y diferenciar un grupo de riesgo con requerimientos de controles más frecuentes, dieta específica y tratamiento adecuado para detectar a tiempo los cambios clínicos involucrados en la aparición de estos desórdenes hipertensivos en el embarazo.

**297. (332) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN OVÁRICA ACTIVADAS POR UN TRATAMIENTO CRÓNICO CON LEPTINA**

Di Yorio M.<sup>1</sup>; Bilbao M.<sup>2</sup>; Faletti A.<sup>3</sup>

*Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CONICET), Facultad de Medicina (UBA)*<sup>1 2 3</sup>  
paula\_diyorio@yahoo.com.ar

Leptina, proteína codificada por el gen de obesidad, es capaz de modular la función ovárica. El tratamiento agudo con leptina inhibe el proceso ovulatorio de la rata, regulando negativamente la vía de la proteína quinasa de activación mitogénica ERK 1/2, sin alterar la vía de STAT3 (transductores de señal y activadores del camino de transcripción tipo 3). Sin embargo el tratamiento diario con bajas dosis de leptina estimula el proceso ovulatorio y la esteroidogénesis. Por lo tanto, en este trabajo estudiamos los caminos de señalización activados por leptina después de este tratamiento. Para ello, ratas inmaduras fueron estimuladas con gonadotropinas (eCG/hCG) y tratadas diariamente con vehículo (C) o 3 µg de leptina (L) a partir del destete durante 12 días. Para estudiar la respuesta inmediata y a largo plazo, se sacrificaron los animales 1 y 5 h después de la última inyección de leptina y se determinó: i) la expresión proteica total y fosforilada del ERK1/2 por Western blot (Wb); y ii) la expresión proteica y el ARNm del supresor del camino de señalización de las citoquinas tipo 3 (SOCS3) por Wb y RT-PCR, respectivamente. Los animales tratados con L expresaban mayores (49%,  $P<0.05$ ) niveles proteicos de la forma fosforilada de ERK1/2 a 1 h de la inyección de leptina, sin alterar la expresión proteica total, ambas comparadas con los C. Los niveles de SOCS3 se mostraron levemente disminuidos respecto a los C pero las diferencias no fueron significativas. Sin embargo después de 5 h de la última administración de leptina, el contenido proteico de SOCS3 era significativamente menor (45%,  $p<0.05$ ), sin observarse cambios en su ARNm, ambos comparados con los C. Estos resultados nos sugieren que un tratamiento diario con bajas dosis de leptina, que causa estimulación de la función ovárica, parece ser mediado, al menos en parte, por una activación de la vía de señalización del ERK1/2 con simultánea inhibición de su principal regulador.

**298. (452) LA EXPOSICIÓN PRENATAL/POSTNATAL A BISFENOL A (BPA) MODIFICA LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DE GRANULOSA EN RESPUESTA A LH**

Jacob A.<sup>1</sup>; Santamaría C.<sup>2</sup>; Durando M.<sup>3</sup>; Muñoz De Toro M.<sup>4</sup>; Luque E.<sup>5</sup>; Rodríguez H.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral*<sup>2 3 4 5 6</sup>  
anallajcb@yahoo.com.ar

Previamente demostramos que la exposición perinatal (prenatal/postnatal) de ratas hembras Wistar 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. En el presente trabajo evaluamos los efectos a bajas dosis de BPA sobre la expresión de moléculas que intervienen en la regulación de la dinámica ovárica. Ratas hembras Wistar preñadas fueron tratadas por vía oral desde el día 9 de gestación (D9) hasta el día posnatal 21 (DPN21), con BPA50 µg/kg-día (BPA50), BPA0.5 µg/kg-día (BPA0.5) o vehículo (aceite de maíz). En DPN21 se procedió al destete de las crías, obteniéndose los ovarios en DPN90 (n=8). A otro grupo de hembras del grupo control y de BPA50 se les administró, a partir de DPN30, una dosis diaria de PMSG de 10UI/ml por vía sc durante 3 días; al cuarto día se les suministró una dosis de hCG de 25UI/ml por vía ip. Los ovarios se obtuvieron a las 0 y 7 horas post-hCG. En cortes seriados de los ovarios se evaluó, por inmunohistoquímica la expresión de receptores de estrógeno alfa (REα) y beta (REβ), receptor de progesterona (RP), receptor de andrógenos (RA) y p27 (asociado a la activación folicular e inducción de atresia). La expresión de REα, REβ, RP, RA y p27 en DPN90 no fue modificada por ninguna de las dosis ensayadas de BPA (BPA50 y BPA0.5). En los ovarios obtenidos 7 horas post-hCG (tratamiento superovulatorio), observamos un incremento en la expresión de RP en las células de la granulosa. Los resultados nos permiten concluir que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA no induce cambios en la expresión de receptores esteroides o p27, mientras que la exposición a la dosis definida como segura (BPA50), modifica el patrón de diferenciación de células de la granulosa en respuesta a LH.

**299. (543) EXPRESIÓN DEL COACTIVADOR DE RECEPTOR DE ESTEROIDES 3 (SRC-3) EN OVARIOS BOVINOS NORMALES Y CON ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA (COD).**

Alfaro N.<sup>1</sup>; Salvetti N.<sup>2</sup>; Rodríguez F.<sup>3</sup>; Panzani C.<sup>4</sup>; Velázquez M.<sup>5</sup>; Ortega H.<sup>6</sup>

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.<sup>1 2 3 4 5 6</sup>

natoalfaro@hotmail.com

Los correguladores son proteínas que interactúan con factores de transcripción y modulan positiva o negativamente su actividad, y que desde el punto de vista funcional se clasifican en dos tipos: coactivadores o correpresores. SRC-3 pertenece a la familia de la proteína p160. En la actualidad se ha comprobado una variación en los patrones de expresión en las distintas estructuras foliculares ováricas en cerdas y ovejas. Por otra parte, las investigaciones realizadas en humano han mostrado una sobreexpresión de SRC-3 en pacientes con tumores ováricos. No hemos encontrado antecedentes sobre su expresión en el ovario bovino bajo condiciones patológicas tales como COD. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el patrón de expresión de SRC-3 en las distintas estructuras foliculares de ovarios sanos y con COD. Se tomaron muestras de quistes (>2cm) en animales con COD, y de folículos antrales grandes (>1 cm), medianos (0,5-1 cm) y pequeños (<0,5 cm) de ovarios sanos. Se evaluó la expresión de ARNm de SRC-3 mediante RT-PCR utilizando GAPDH como normalizador. Por inmunohistoquímica se analizó la expresión de SRC-3 en células de la granulosa y teca de folículos primarios, secundarios, terciarios, atrésicos en ovarios normales y quistes de animales con COD. No se encontraron diferencias en la expresión de ARNm de SRC-3 en la capa granulosa de los folículos quísticos en relación a los folículos antrales normales, y pudo observarse un aumento en la expresión en la teca de los quistes en relación a los folículos normales (p<0,05). Por otro lado, mediante inmunohistoquímica se encontró un aumento de la expresión de SRC-3 en la capa de células de la granulosa de los quistes en relación a las otras categorías estudiadas, sin diferencias en la teca interna (p<0,05). Podemos inferir que las alteraciones en la expresión de SRC-3 podrían modificar los mecanismos de regulación de la transcripción en las células foliculares ováricas, y participar en la patogenia de esta enfermedad.

**300. (582) ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE BAX Y BCL2 EN FOLÍCULOS PROVENIENTES DE RATAS CON OVARIOS POLIQUÍSTICOS INDUCIDO POR DEHIDROEPIANDROSTERONA.**

Bas D.<sup>1</sup>; Abramovich D.<sup>2</sup>; Hernandez F.<sup>1</sup>; Tesone M.<sup>2</sup>  
IBYME-CONICET<sup>1</sup>, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA<sup>2</sup>  
dbas@dna.uba.ar

El síndrome de ovario poliquístico (PCOS) es un desorden caracterizado por hiperandrogenemia, hirsutismo, oligo o amenorrea, resistencia a insulina y anovulación. Sin embargo, la ausencia de una etiología clara ha llevado a múltiples tratamientos no siempre eficaces para tratar la infertilidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el balance entre los niveles ováricos de las proteínas BAX y BCL2 se encuentra alterado en un modelo de PCOS en rata obtenido por la administración de dehidroepiandrosterona (DHEA). Para ello, se inyectaron ratas prepúberes con DHEA durante 15 días, se sacrificaron el día 16 y se extrajeron los ovarios (ovarios PCOS). El grupo control se inyectó con vehículo. Uno de los ovarios fue fijado y procesado para cortes histológicos. Del otro ovario se extrajeron proteínas que fueron utilizadas para Western blot. Además, se obtuvo suero de los animales y se midió progesterona circulante. Los estudios histológicos mostraron presencia de quistes, folículos atrésicos y ausencia de cuerpos lúteos en los ovarios PCOS. Además, la expresión de la proteína proapoptótica BAX fue mayor en folículos preantrales y antrales de ovarios PCOS comparados al control. La proteína antiapoptótica BCL2 mostró una marca intensa en folículos antrales de ovarios

control y una marca débil en folículos antrales de ovarios PCOS. Por Western blot se observó que los niveles de BCL2 estaban disminuidos en los ovarios PCOS. No se observaron diferencias significativas en los niveles de BAX entre ambos grupos. Sin embargo, la relación BAX/BCL2 fue significativamente mayor en los ovarios PCOS respecto a los controles. Por otro lado, los niveles de progesterona en suero fueron menores en el grupo PCOS. *Conclusión:* Un aumento en la apoptosis debido a un desbalance entre los miembros de la familia de BCL2 podría estar involucrado en la transformación de los folículos en crecimiento a folículos quísticos en los ovarios PCOS inducidos en ratas por tratamiento con DHEA.

**301. (677) PROTEÍNAS DE GOLPE TÉRMICO (HSPs) INVOLUCRADAS EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA: SUS PERFILES DE EXPRESIÓN.**

Velazquez M.<sup>1</sup>; Alfaro N.<sup>1</sup>; Stangaferro M.<sup>1</sup>; Salvetti N.<sup>1</sup>; Ortega H.<sup>1</sup>

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral<sup>1</sup>  
melisavel@gmail.com

En el contexto de la reproducción, las proteínas de golpe térmico (Heat Shock Proteins: HSPs) participan en dos procesos claves de la fisiología del ovario: la proliferación/apoptosis y la acción de hormonas esteroides mediada por sus receptores. La comprensión de los mecanismos y patrones de expresión de dichas proteínas en estructuras foliculares de ovarios normales, proporcionaría datos relevantes para el estudio y comparación posterior de los mismos parámetros, en ovarios con alteraciones, como por ejemplo enfermedad quística ovárica (Cystic Ovarian Disease: COD). Es por ello que en el presente trabajo se estudió la expresión de las HSP10, HSP27, HSP40 (HSPs pequeñas, small HSPs: sHSPs), HSP60, HSP70 y HSP90 $\alpha$  y  $\beta$  mediante RT-PCR. Se trabajó con muestras de quistes (>2cm) provenientes de animales con COD, y con folículos antrales grandes (>1 cm), medianos (0,5-1 cm) y pequeños (<0,5 cm) de ovarios sanos. Para el caso de HSP10 y HSP40, la expresión fue significativamente menor en folículos quísticos, tanto en la teca como en la granulosa (p<0.05). Para HSP27, los niveles de expresión en teca fueron superiores en folículos medianos. Por otro lado, la mayor expresión de ARNm de HSP60 fue detectada en granulosa de folículos medianos y en teca de quistes foliculares (p<0.05). La menor expresión de HSP70 fue detectada en células de la granulosa de folículos grandes, y en la teca de los quistes (p<0.05). Las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de HSP90 mostraron niveles de expresión similares entre estructuras foliculares normales, tanto en teca como en granulosa. En los quistes, los niveles cuantificados de HSP90 $\beta$ , fueron significativamente menores que los detectados en el resto de las estructuras, excepto en comparación con la granulosa de folículos grandes. Nuestros resultados, junto con observaciones previas sugerirían que una expresión aberrante de HSPs podría asociarse a un componente intraovárico en la patogenia de la COD.

**302. (720) CONTRIBUCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA.**

Stangaferro M.<sup>1</sup>; Silva M.<sup>1</sup>; Summa M.<sup>1</sup>; Salvetti N.<sup>1</sup>; Ortega H.<sup>1</sup>

Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral<sup>1</sup>  
mstangaferro@fcv.unl.edu.ar

La enfermedad quística ovárica (COD) es un desorden reproductivo que ocasiona importantes pérdidas económicas. Se ha determinado que la progresión a través de los sucesivos estadios de desarrollo folicular requiere de una estrecha comunicación entre las distintas células y muchas de las moléculas implicadas pertenecen a la superfamilia del TGF- $\beta$ . Una alteración en la expresión de este factor podría afectar el normal desarrollo folicular, siendo parte de la patogenia de la COD. Se utilizaron 10 vaquillonas las que se dividieron en dos grupos. A un grupo se le indujo la COD mediante la administración de ACTH y el otro permaneció como



control. Además se obtuvieron quistes ováricos en frigorífico. Sobre muestras de ovario se realizó inmunohistoquímica para la determinación de TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 y se cuantificó, mediante análisis digital de imágenes, la marcación en granulosa y teca interna para los folículos en crecimiento y atresicos en ambos grupos, y quísticos inducidos y de frigorífico. Se observó, para el TGF- $\beta$ 1, una elevada expresión en la granulosa de los folículos primarios de ambos grupos, la que fue disminuyendo en relación al desarrollo folicular, mostrando los quistes inducidos una disminución ( $p < 0,05$ ). En la teca se observó que los folículos terciarios de ambos grupos presentaron la mayor expresión ( $p < 0,05$ ). Para el TGF- $\beta$ 2, en la granulosa se observó la menor expresión en los folículos atresicos del grupo control mientras que en la teca se evidenció una elevada expresión en los quistes de frigorífico y baja en los folículos atresicos ( $p < 0,05$ ). El TGF- $\beta$ 3 mostró la mayor expresión en la granulosa de los folículos quísticos obtenidos en frigorífico en relación a los folículos en crecimiento y atresicos controles y quistes inducidos ( $p < 0,05$ ). En la teca se observó un patrón similar. Considerando la gran cantidad de acciones del TGF- $\beta$  a lo largo de la foliculogénesis, las variaciones en su expresión podrían contribuir a la patogenia de la COD.

- 303. (753) EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE MELANOCORTINAS Y EFECTOS DIRECTOS DE ACTH SOBRE LA SECRECIÓN DE ESTEROIDES EN EL OVARIO BOVINO**  
 Amweg A.<sup>1</sup>; Paredes A.<sup>2</sup>; Salvetti N.<sup>1</sup>; Lara H.<sup>2</sup>; Ortega H.<sup>1</sup>  
*Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral<sup>1</sup>; Laboratorio de Neurobioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile<sup>2</sup>.*  
 ayelenamweg@yahoo.com

Los receptores de melanocortinas (MCRs) están implicados en las respuestas fisiológicas de ACTH y  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -hormonas estimulantes de melanocitos ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -MSH). Su expresión ha sido previamente analizada en diferentes tejidos bovinos detectándose los 5 tipos existentes; sin embargo no existen estudios sobre su localización en el ovario. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de los MCRs en ovarios bovinos usando RT-PCR y comprobar si la ACTH afecta los componentes foliculares alterando la secreción esteroide normal. Se realizó el diseño de los primers mediante el programa Lasergene. Se utilizaron muestras de diferentes estructuras ováricas (folículos antrales pequeños, medianos y grandes, cuerpo lúteo y estroma) sobre las cuales se realizó RT-PCR para detectar los distintos tipos de MCRs. Por otro lado, se cultivaron fragmentos de pared de folículos antrales medianos y grandes con ACTH (1 nM; 10 nM y 100 nM) en medio libre de suero. Pudo observarse expresión de MCRs en células de la teca en los folículos antrales de diferentes diámetros, mientras que solamente el MC3R se expresó débilmente en células de la granulosa. Los MCR 1, 2 y 3 se localizaron en cuerpo lúteo. El MCR2 fue el único que se encontró en el estroma ovárico. En los ensayos de cultivo, pudo observarse un incremento significativo en la concentración de 17 $\beta$ -estradiol y de cortisol en respuesta a ACTH en folículos medianos así como un incremento de la testosterona y el cortisol en folículos grandes. Estos resultados confirman resultados anteriores en otras especies y demuestran que los MCRs están presentes en ovarios bovinos. El hecho de que la ACTH fue capaz de inducir la secreción de esteroides desde el ovario *in vitro* sugiere que los péptidos de melanocortinas pueden estar implicados en mecanismos regulatorios relacionados a funciones ováricas tales como ovulación, esteroideogénesis y función luteal.

- 304. (759) INFLUENCIA DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A IGF (IGFBP)-2 Y -3 EN QUISTES FOLICULARES DE BOVINOS CON ENFERMEDAD QUISTICA OVÁRICA (COD)**  
 Rodríguez F.<sup>1</sup>; Panzani C.<sup>1</sup>; Salvetti N.<sup>1</sup>; Barbeito C.<sup>2</sup>; Ortega H.<sup>1</sup>; Rey F.<sup>1</sup>  
*Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral<sup>1</sup>; Instituto de Patología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata<sup>2</sup>*  
 fernandamrodriguez@hotmail.com

Los quistes ováricos constituyen uno de los principales factores que afectan la fertilidad en bovinos. Se acepta que se desarrollan a partir de folículos preovulatorios que fallaron en ovular, persisten en el ovario e interfieren con su funcionalidad. Se ha postulado la participación de diversos factores de crecimiento en el desarrollo de la COD, entre ellos, IGF-I e IGF-II, cuya biodisponibilidad es influenciada por las IGFBPs presentes. Las IGFBP-3 e IGFBP-2 son, en ese orden, las proteínas de unión más importantes en líquido folicular en bovinos. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión de ARNm y proteica de ambas IGFBPs en las diferentes poblaciones celulares de folículos provenientes de animales sanos y con COD. Se realizó RT-PCR sobre muestras de pared folicular completa de folículos antrales y quísticos, e hibridación *in-situ* sobre cortes histológicos para evaluar los niveles y la localización de ARNm. La expresión proteica se evaluó por inmunohistoquímica en las células somáticas de folículos en diferentes estadios de desarrollo. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias en los niveles de ARNm de ambas IGFBPs en pared folicular completa. Sin embargo, al estudiar la localización se demostró que sólo las células de la granulosa expresaron el ARNm. Además, se determinó una disminución significativa en la expresión de IGFBP-2 e IGFBP-3 en todas las estructuras foliculares de animales con COD respecto a folículos provenientes de animales sanos ( $p < 0,05$ ). A nivel proteico, se observó que las IGFBPs se expresaron principalmente en células de la granulosa, en relación a los niveles determinados en las tecas ( $p < 0,05$ ) sin mantener las diferencias observadas en el ARNm, entre los diferentes folículos de animales con COD respecto a los controles sanos. Los resultados obtenidos permiten establecer la importancia del rol de las IGFBPs en la regulación de la disponibilidad de IGF y su actividad diferencial en la patogenia de la enfermedad.

- 305. (776) EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE MELANOCORTINAS Y EFECTOS DIRECTOS DE ACTH SOBRE LA SECRECIÓN DE ESTEROIDES EN EL OVARIO BOVINO.**  
 Amweg A.<sup>1</sup>; Paredes A.<sup>2</sup>; Salvetti N.<sup>1</sup>; Lara H.<sup>2</sup>; Ortega H.<sup>1</sup>  
*Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral<sup>1</sup>; Laboratorio de Neurobioquímica. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile<sup>2</sup>*  
 ayelenamweg@yahoo.com.ar

Los receptores de melanocortinas (MCRs) están implicados en las respuestas fisiológicas de ACTH y  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -hormonas estimulantes de melanocitos ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -MSH). Su expresión ha sido previamente analizada en diferentes tejidos bovinos detectándose los 5 tipos existentes; sin embargo no existen estudios sobre su localización en el ovario. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de los MCRs en ovarios bovinos usando RT-PCR y comprobar si la ACTH afecta los componentes foliculares alterando la secreción esteroide normal. Se realizó el diseño de los primers mediante el programa Lasergene. Se utilizaron muestras de diferentes estructuras ováricas (folículos antrales pequeños, medianos y grandes, cuerpo lúteo y estroma) sobre las cuales se realizó RT-PCR para detectar los distintos tipos de MCRs. Por otro lado, se cultivaron fragmentos de pared de folículos antrales medianos y grandes con ACTH (1 nM; 10 nM y 100 nM) en medio libre de suero. Pudo observarse expresión de MCRs en células de la teca en los folículos antrales de diferentes diámetros, mientras que solamente el MC3R se expresó débilmente en células de la granulosa. Los MCR 1, 2 y 3 se localizaron en cuerpo lúteo. El MCR2 fue el único que se encontró en el estroma ovárico. En los ensayos de cultivo, pudo observarse un incremento significativo en la concentración de 17 $\beta$ -estradiol y de cortisol en respuesta a ACTH en folículos medianos así como un incremento de la testosterona y el cortisol en folículos grandes. Estos resultados confirman resultados anteriores en otras especies y demuestran que los MCRs están presentes en ovarios bovinos. El hecho de que la ACTH fue capaz de inducir la secreción de esteroides desde el ovario *in vitro* sugiere que los péptidos de melanocortinas pueden estar implicados en mecanismos regulatorios relacionados a funciones ováricas tales como ovulación, esteroideogénesis y función luteal.

## METABOLISMO Y NUTRICION 3

**306. (176) LAS MODIFICACIONES EPIGENETICAS DE HISTONAS SE ASOCIAN A NIVELES PLASMATICOS DE HOMOCISTEINA Y PESO CORPORAL EN NEONATOS.**

Fernandez Gianotti T<sup>1</sup>; Gemma C.<sup>1</sup>; Alvarías J.<sup>1</sup>; González C.<sup>3</sup>; Sookoian S.<sup>1</sup>; Pirola C.<sup>1</sup>

Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas. Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari. IDIM. UBA-CONICET<sup>1</sup>; Policlínico Bancario<sup>2</sup>; Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>  
tfgianotti@yahoo.com.ar

Los factores epigenéticos se han asociado a cáncer pero casi se desconoce su papel en enfermedades prevalentes como los componentes del Síndrome Metabólico (SM). Recientemente hemos reportado que la metilación del DNA de genes que participan en la biogénesis mitocondrial en neonatos con peso anormal al nacer, rasgo asociado a SM en la vida adulta, y en adolescentes con insulino resistencia, podrían explicar la disminución del DNA mitocondrial observada en estas situaciones. En este trabajo exploramos las modificaciones de histona 3 asociadas a la activación y represión de genes (trimetilación de lys4, H3K4Me3, y lys9, H3K9Me3, respectivamente) en cromatina extraída de cordón umbilical de 17 neonatos de bajo peso (<percentilo 25 por edad gestacional), 17 de peso elevado (>percentilo 75), y 16 de peso normal. Se amplificaron dos segmentos del promotor del gen factor de transcripción mitocondrial (Tfam) mediante PCR en tiempo real (en cromatina precipitada mediante anticuerpos específicos vs el DNA input). La relación en los dos segmentos (-512 y -930 pb del TSS) mostró excelente correlación (Spearman R, H3K4Me3: 0.89, p<0.0000001 y H3K9Me3: 0.79, p<0.0000001), por lo que los análisis posteriores se realizaron con el primer fragmento. Un análisis discriminante mostró que la H3K4Me3 está asociada al peso al nacer (Wilks: 0.60, p<0.014) independientemente del BMI de la madre o la homocisteína plasmática del neonato, a pesar que la H3K4Me3 correlacionó con la homocisteinemia del neonato (Pearson R: 0.31, p<0.03). Conclusiones: la modificación H3K4Me3 que muestra un pico en el promotor del Tfam (UCSC browser) y está presente en el aproximadamente 10% de la cromatina de cordón (0.10±0.02) es un rasgo variable asociado al peso al nacer y podría depender de factores ambientales como el metabolismo de metilos, en este caso los niveles de homocisteína. La H3K4Me3 sería uno de los elementos de la reprogramación fetal que conlleva a enfermedades durante la vida adulta.

**307. (257) CORRELACION ENTRE EL CONTENIDO DE HIERRO TISULAR Y EL DAÑO OXIDATIVO EN HÍGADO, RIÑÓN Y CEREBRO DE RATAS EXPUESTAS A DOSIS CRECIENTES DEL BIOMETAL.**

Saporito Magriñá C.<sup>1</sup>; Musacco Sebio R.<sup>1</sup>; Ferraroti N.<sup>1,2</sup>; Massot F.<sup>3</sup>; Torti H.<sup>3</sup>; Repetto M.<sup>3</sup>

Cátedra de Química General e Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Físicoquímica.<sup>1</sup>; Cátedra de Análisis Clínicos I, Inmunología Clínica, Bioquímica Clínica.<sup>2</sup>; Cátedra de Física, Departamento de Fisicomatemática<sup>3</sup> FFYB, UBA  
aspo\_48@hotmail.com

El daño oxidativo (DO) por toxicidad aguda con hierro (Fe) está asociado a oxidación de biomoléculas mediante especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. El objetivo de este trabajo fue comparar la correlación entre el contenido de Fe hepático y renal con el DO tisular, en hígado (H), riñón (R) y cerebro (CE) por dosis crecientes de FeCl<sub>2</sub> (0-60 mg/kg, ip) a ratas Sprague Dowley (200-250 g) y a diferentes tiempos (0-48 h). Se evaluó curva dosis-respuesta y tiempo de daño máximo observado (tm) respecto al control (C) (p<0.01), mediante: Quimioluminiscencia de órgano in vivo (QI), Quimioluminiscencia por terbutilo (QI-BOOH), especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); metabolitos del NO (NO<sub>2</sub>), carbonilos (CO), glutatión (GSH/GSSG); actividad de NADPHoxidasas, superóxido dismutasa (SOD), catalasa

(Cat), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión transferasa (GT). La concentración tisular de Fe (cFe) en H y R se determinó por absorción atómica. Se observó: correlación positiva entre dosis y cFe en H (r<sup>2</sup>:0,9604, C: 107±3mg/g) y R (r<sup>2</sup>:0,9604, C:46±4mg/g); en H correlación positiva entre QI (r<sup>2</sup>:0,8946), QI-BOOH (r<sup>2</sup>:0,8149), TBARS (r<sup>2</sup>:0,6153), CO (r<sup>2</sup>:0,9631), NADPHox (r<sup>2</sup>:0,7754); R: QI-BOOH (r<sup>2</sup>:0,6392), TBARS (r<sup>2</sup>:0,6142), CO (r<sup>2</sup>:0,6908), SOD (r<sup>2</sup>:0,9646) y cFe; correlación lineal hasta tm: H, QI (r<sup>2</sup>:0,7577, tm:16h) aumentó(+) 6 veces(v) (C:31±2x10<sup>4</sup>cps/g), QI-BOOH (r<sup>2</sup>:0,9412, tm:6h) + 2,3v (C:5,8±0,6x10<sup>6</sup>cpm/g), TBARS (r<sup>2</sup>:0,8733, tm:6h) +30v (C:23±2nmol/g), NO<sub>2</sub> (r<sup>2</sup>:0,9872, tm:4h) +43% (C:0,58±0,03mmol/g), NADPHox (r<sup>2</sup>:0,9385, tm:6) 71% (C:87±8nmol/min.g), SOD (r<sup>2</sup>:0,9872, tm:16h)+2,5v (C:372±30U/g).R, QI-BOOH (r<sup>2</sup>:0,9310, tm:6h) +3v (C:0,9±0,1x10<sup>6</sup>cpm/g), TBARS (r<sup>2</sup>:0,9561, tm:16h) +1,8v (C:47±4nmol/g). En CE, tm :2h, +46% NO<sub>2</sub> (C:0,79±0,04mmol/g), tm:16h, +4,5v QI-BOOH (C:42±1x10<sup>3</sup>cpm/g), +15v TBARS (C:17±1nmol/g), +3,4v SOD (C:339±36U/g), +3v Cat(16±9pmol/g); tm:24h, (-) 60% NADPHox (0,15±0,01nmol/min.g), (-) 90%GSH/GSSG (0,64±0,07). DO es proporcional a cFe, y DO a lípidos y proteínas es mayor en H que en R y CE.

**308. (259) DAÑO OXIDATIVO Y ALTERACIÓN SECUENCIAL DE BIOMOLÉCULAS EN HÍGADO Y CEREBRO DE RATA EXPUESTAS A CONCENTRACIONES TÓXICAS DE COBRE.**

Musacco Sebio R.<sup>1</sup>; Saporito Magriñá C.<sup>1</sup>; Ferraroti N.<sup>2</sup>; Torti H.<sup>3</sup>; Massot F.<sup>3</sup>; Repetto M.<sup>1</sup>

Cátedra de Química General e Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Físicoquímica.<sup>1</sup>; Cátedra de Química General e Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Físicoquímica; Cátedra de Análisis Clínicos I, Inmunología Clínica, Bioquímica Clínica.<sup>2</sup>; Cátedra de Física, Departamento de Fisicomatemática<sup>3</sup>. FFYB, UBA  
rosario02@hotmail.com

El cobre (Cu) es un biometal esencial, la exposición a altas dosis genera daño oxidativo (DO) a biomoléculas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la secuencia de cambios oxidativos en hígado (H) y cerebro (CE) de ratas Sprague Dowley (200-250g) por exposición (0-48h) a CuSO<sub>4</sub> (0-30mg/kg, ip), para establecer el rol del Cu en el DO. Se evaluó: dosis-respuesta, tiempo inicial (ti) de alteración de marcadores de daño oxidativo respecto al control (C, p<0,01), y el tiempo para el cambio máximo (tm) de Quimioluminiscencia de órgano(QI), Quimioluminiscencia por terbutilo(QI-BOOH), especies reactivas al ácido tiobarbitúrico(TBARS), metabolitos del NO(NO<sub>2</sub>), carbonilos(CO), glutatión(GSH/GSSG); antioxidantes hidrosolubles(TRAP), NADPHoxidasas, superóxido dismutasa(SOD), catalasa(Cat), y glutatión peroxidasa(GPx), Fe hepático por absorción atómica. Resultados: 75% supervivencia, dosis<sub>50%</sub> 10 mg/kg. En H: ti:2h aumentó 100% NO<sub>2</sub> (C:0,58±0,03mmol/g), 2,5 veces TBARS (C:23±2nmol/g, tm:16h), 63% cat (C:573±47pmol/g), y disminuyó 77% TRAP (C:1881±185nmol/g) y 80% NADPHox(C:87±0,9nmol/min.g, tm:16h). Ti:4h aumentó 8 veces el Cu (C:7,3±0,5mg/g, tm:16 h), 7 veces QI-BOOH (C:5,8±0,6x10<sup>6</sup>cpm/g) y 27% CO (C:0,22±0,01mmol/g) y disminuyó 2 veces GSH/GSSG (C:3,8±0,5x10<sup>-3</sup>, tm:16h). Ti:16h, QI aumentó 87% (C:31±2x10<sup>4</sup>cps/g, tm:24h), 60% SOD (C:372±31U/g), y 3,6 veces GPx (C:5,6±0,9nmol/min.g). En CE, ti:2h: aumentó 15% NO<sub>2</sub>(C:0,79±0,04mmol/g, tm:16h) y disminuyeron 53% GSH/GSSG(C:0,64±0,04), 57% CO(C:383±33mmol/g,tm:4h), y 71% NADPHox (C:0,14±0,9nmol/min.g). Ti:4h aumentó 95% QI-BOOH(C:42±1x10<sup>3</sup>cpm/g, tm:16 h), y 2,3 veces Cat (C:14±5 pmol/g, tm:16h). Ti:16h, SOD aumentó 78% (C:339±36 U/g), y Ti:48h, TBARS 47% (C:25±5 nmol/g).La secuencia de DO en H sugiere que la generación de NO, consumo de antioxidantes y peroxidación de lípidos son previos a la oxidación de proteínas y daño hepático irreversible por Cu. En CE, producción de NO y consumo de GSH serían previos a la peroxidación lipídica.

**309. (261) SECUENCIA DE PROCESOS OXIDATIVOS EN HÍGADO DE RATA MEDIADOS POR TOXICIDAD AGUDA CON NIQUEL.**

Ferrarotti N.<sup>1,2</sup>; Musacco Sebío R.<sup>1</sup>; Saporito Magriña C.<sup>1</sup>; Repetto M.<sup>1</sup>

Cátedra de Química General E Inorgánica. Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica<sup>1</sup>; Cátedra de Análisis Clínicos I, Inmunología Clínica, Departamento de Bioquímica Clínica. FFYB, UBA<sup>2</sup>  
nidiaferrarotti@yahoo.com.ar

Uno de los mecanismos involucrados en el daño hepático por toxicidad aguda por níquel (Ni) es la respuesta inflamatoria y la generación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta secuencial al daño oxidativo en hígado generado por la exposición a dosis crecientes de NiSO<sub>4</sub> (0-10mg/kg) a ratas Sprague Dowley (200-250 g, ip) y NaCl (0.9%, ip) al grupo control (C). Se evaluó: dosis-respuesta, tiempo inicial (ti) de alteración de marcadores de daño respecto a C (p<0,01), y el tiempo para el cambio máximo (tm) (2-48 h, dosis 7,5 mg/kg) por Quimioluminiscencia de órgano(QI), especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), metabolitos del NO(NO<sub>2</sub>), carbonilos(CO), actividad NADPHoxidasas, glutatión transferasa(GT), superóxido dismutasa (SOD), y catalasa (Cat) en homogeneizados de hígado (H); y antioxidantes solubles (TRAP) y TBARS en plasma(P). Se observó: correlación positiva entre QI y tiempo (r<sup>2</sup>:0,9400), y NADPHox y dosis (r<sup>2</sup>:0,6966). En H: ti:2 h: 38% de aumento (+) de NADPHox (tm:24h, (+)138%, C:88±8nmol/min.g), (+)37% GT (tm:16h, (+)100%, C:0,73±0,07U/g), (+)3 veces SOD (tm:6h, (+)3,5 veces, C:372±31U/g); ti:4h, (+)67% NO<sub>2</sub> (C:0,58±0,03µmol/g); ti:16h, (+)7 veces QI (tm:24h, (+) 8,5 veces, C:31±2 x10<sup>4</sup>cps/g), disminución(-) 22% Cat (C:657±31 pmol/g); ti:24h, (-) 15% TBARS (C:21±2 nmol/g), (-) 20% CO (C:0,22±0,1µmol/g). En P, ti:2h, TRAP (-) 44% (tm:24h, (-)75%, C:391±52µM), y ti:6h TBARS (+) 3 veces (C:2,7±0,2 µM). El daño hepático aumenta con el tiempo de tratamiento y con la dosis de Ni. En H, el aumento de la actividad de NADPHox, GT y SOD, la generación de metabolitos de NO y consumo de antioxidantes endógenos solubles en plasma, son eventos previos a la oxidación de lípidos, proteínas y daño hepático determinados por QI. Estos resultados sugieren respuesta inflamatoria (2h), mediada por NO y anión superóxido, consumo de antioxidantes (4 y 16h) y daño oxidativo (16 y 24h) por toxicidad con Ni.

### 310. (285) ROL DEL FIBRINÓGENO EN LA FISIOPATOGENIA DE LAS LESIONES CUTÁNEAS MICROANGIOPÁTICAS EN LA DIABETES TIPO 2

Carrera L.<sup>1</sup>; D'arrigo M.<sup>2</sup>; Colombini M.<sup>1</sup>; Continí L.<sup>3</sup>; D'ottavio A.<sup>4</sup>

Escuela de Cs. Médicas UNL; Fac. de Cs. Médicas UNR<sup>1</sup>; Fac. de Cs. Bioq. y Farmaceuticas UNR<sup>2</sup>; Escuela de Cs. Médicas UnP<sup>3</sup>; Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas UnB<sup>4</sup>; Ciunr; Fac. de Cs. Médicas UNR<sup>4</sup>  
carreralarisa@hotmail.com

Trabajos previos indicaron la posible importancia del fibrinógeno en la fisiopatogenia de las complicaciones diabéticas (ej. retinopatía) tanto por comprometer la viscosidad de la sangre y la agregación eritrocitaria como por ocasionar un aumento del shear stress a nivel endotelial. Avanzando en tal sentido, este estudio relaciona la fibrinogenemia con las manifestaciones cutáneas microangiopáticas de la diabetes tipo 2 (DM2), escasamente analizadas. Fueron evaluados 99 pacientes con DM2 de similares edades e IMC y mal control metabólico (32 con lesiones cutáneas microangiopáticas -PCL- y 67 sin ellas-PSL) y 30 controles sanos (C), dosándose la fibrinogenemia por el método de Clauss. Estadísticamente se emplearon ANOVA, test T y Odds Ratio (OR).

Tabla N° 1 Promedios y desvíos estándar de la fibrinogenemia

Grupo	Media ± Desvío típico (mg %)
PSL	312.7 ± 64.9
PCL	355.9 ± 60.4
C	207.6 ± 26.8

Los grupos tuvieron comportamiento normal (p > 0,200) y varianzas no homogéneas (p=0,003). Hubo diferencias significativas entre los tres grupos (ANOVA; p = 0,0008) (Tabla N° 1) y entre PCL y PSL particularmente (varianza similar; p=0,531) (Test T; p = 0,019). Además, pacientes con fibrinogenemia mayor a 295 mg% revelaban 4 veces más posibilidades de desarrollar lesiones cutáneas; OR=4,25 (IC 95%=1,17; 15,45). Dada las correlaciones directas entre fibrinogenemia y viscosidad de sangre entera y entre fibrinogenemia y agregación eritrocitaria reportadas en anteriores trabajos, sumado al aumento del riesgo de desarrollar lesiones cutáneas cuando su nivel supera los 295 mg%, se podría señalar la relevancia de indagar la fibrinogenemia en los pacientes con DM2 por su eventual intervención en el desarrollo de complicaciones; más aún, dado el rol asignado al fibrinógeno en la disfunción endotelial según la bibliografía especializada. Finalmente, las lesiones cutáneas microangiopáticas, aquí estudiadas, pueden constituir un modelo a tener en cuenta en el seguimiento clínico de estos pacientes.

### 311. (307) EFECTOS DEL FITOESTEROL GENISTEÍNA SOBRE LAS BASES MOLECULARES DE LA ADHESIÓN LEUCOCITARIA

Rauschemberger M.<sup>1</sup>; Sandoval M.<sup>1</sup>; Agriello E.<sup>2</sup>; Massheimer V.<sup>2</sup>

Cát. Bioquímica Clínica II Dto. Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. CONICET. Unidad Básica Química, Dto. Ciencias Básicas, UTN-FRBB<sup>1</sup>; Laboratorio de Especialidades Bioquímicas<sup>2</sup>  
mbrausch@criba.edu.ar

Siendo la genisteína (Gen) un fitoestrógeno (FE) con potencial acción cardioprotectora, nuestro objetivo fue evaluar los efectos de Gen en la interacción monocito (mf)-endotelio vascular, evento crucial en la respuesta vascular a una injuria inflamatoria. Se usaron cultivos primarios de células endoteliales (CE) aisladas de aorta de rata. En CE tratadas 24h con Gen se observó que el FE disminuye los niveles de expresión del ARNm (RT-PCR) de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1. La unión de ICAM-1 a integrinas leucocitarias media la adhesión de monocitos al endotelio vascular. Demostramos que el agente proinflamatorio lipopolisacárido bacteriano (LPS) aumentó la expresión de ICAM-1 (2 veces/basal). La acción inductora de LPS se suprime en presencia de Gen 10 nM, agregada antes o después del LPS. Usando citometría de flujo estudiamos la expresión de las integrinas a: CD11b y CD11c y b: CD18 en mf de sangre entera tratados con Gen. El tratamiento con el FE (24 h) disminuyó la expresión de las integrinas (57, 67 y 45% s/c, CD11b, CD11c y CD18 respect., p<0,01), mientras que el LPS las incrementó en un 30%. Semejante a lo observado en CE, el pretratamiento de los mf con Gen anuló el efecto del LPS. Estos resultados fueron consistentes con lo determinado en ensayos de adhesión de mf a CE en monocapa. Comparado con el control, el número de mf adheridos/campo aumentó en el grupo LPS (21±3,1 vs 34±1,7 cel/cpo, CvsLPS, p<0,01) y disminuyó un 43% con Gen. Dado que resultados previos sugirieron la posible participación del receptor de estrógenos (RE) en el mecanismo de acción de Gen, se midió el efecto del FE sobre la expresión del ARNm de ER a y ERb. En CE tratadas 24 h con Gen 10 nM no se registraron diferencias significativas en los niveles de ARNm de ambos ER. Los resultados sugieren que Gen previene la adhesión de mf al endotelio vascular a través de una acción directa sobre ambos tipos celulares (CE y mf) regulando la expresión de moléculas de adhesión.

### 312. (353) EL CEREBRO COMO BLANCO DE DAÑO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE GLAUCOMA.

Ferreira S.<sup>1</sup>; Reides C.<sup>1</sup>; Moranchel C.<sup>1</sup>; Grillo M.<sup>1</sup>; Lerner F.<sup>1</sup>; Llesuy S.<sup>1</sup>

Cátedra de Química General e Inorgánica. FFYB, UBA<sup>1</sup>  
smferrer@ffyb.uba.ar

El glaucoma es una patología óptica caracterizada por atrofia del nervio óptico y pérdida del campo visual; sin embargo el daño

se extiende a la corteza cerebral y al núcleo geniculado. El objetivo fue evaluar la variación de parámetros de estrés oxidativo en el cerebro en un modelo experimental de glaucoma. Se utilizaron ratas Wistar, a un grupo se le cauterizan dos venas espesclerales del ojo izquierdo (GG n= 9) y a otro grupo se lo sometió al mismo protocolo quirúrgico sin cauterización (GC n= 9). Las determinaciones se realizaron en homogeneizados de cerebro al séptimo día postquirúrgico. Los parámetros evaluados fueron: contenido de ácido ascórbico (AA), vitamina E (VE), glutatión (GSH), nitritos (NT) y las actividades de las enzimas NADPH oxidasa (NAOX), Glucosa-6P deshidrogenasa (G6PD), tioredoxina reductasa (TR), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidasa (GPX). Todos los parámetros se determinaron por técnicas espectrofotométricas. El AA para GG fue  $67 \pm 26 \mu\text{M}$  (GC  $275 \pm 22 \mu\text{M}$   $p < 0,001$ ), la VE para GG fue  $0,58 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$  (GC  $1,10 \pm 0,06 \mu\text{mol/g}$   $p < 0,01$ ), el GSH  $1,98 \pm 0,13 \mu\text{mol/g}$  para el GG (GC  $8,19 \pm 0,71 \mu\text{mol/g}$   $p < 0,001$ ). Los NT fueron  $11,5 \pm 2,9 \mu\text{M}$  en GG (GC  $5,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$   $p < 0,01$ ). La NAOX en GG fue  $0,114 \pm 0,015 \text{ U/mg prot}$  (GC  $0,046 \pm 0,015 \text{ U/mg prot}$   $p < 0,01$ ). TR en GG  $0,19 \pm 0,04 \text{ nmol/min.mg prot}$  (GC  $0,42 \pm 0,03 \text{ nmol/min.mg prot}$   $p < 0,05$ ). La actividad de GR en GG  $6,0 \pm 0,10 \text{ mmol/min.mg}$  (GC  $10,2 \pm 0,4 \text{ mmol/min.mg}$   $p < 0,05$ ). G6PD para GG fue  $0,03 \pm 0,01 \text{ U/mg prot.min}$  (GC  $0,15 \pm 0,04 \text{ mmol/min.mg}$   $p < 0,05$ ). GPX para GG fue  $0,067 \pm 0,008 \text{ U/mg prot.min}$  (GC  $0,042 \pm 0,003 \text{ U/mg prot.min}$   $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren que las especies prooxidantes se encuentran incrementadas y los antioxidantes no enzimáticos disminuidos en el glaucoma. Las actividades de enzimas asociadas al metabolismo del glutatión se encuentran disminuidas a excepción de la GPX que está incrementada sugiriendo una respuesta adaptativa al aumento del daño oxidativo.

### 313. (363) PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL HUMOR VÍTREO DE PERROS CON GLAUCOMA.

Grillo M.<sup>1</sup>; Ferreira S.<sup>1</sup>; Reides C.<sup>1</sup>; Moranchel C.<sup>1</sup>; Weischler N.<sup>1</sup>; Llesuy S.<sup>1</sup>  
*Cátedra de Química General e Inorgánica. FFYB, UBA<sup>1</sup>*  
*marueg3@hotmail.com*

El objetivo de este trabajo fue evaluar el daño oxidativo del humor vítreo en perros con glaucoma (GG), glaucomatosos suplementados con melatonina (GM) o vitamina E (GE), y comparar estos grupos frente a perros controles (GC). Para llevar a cabo dicho objetivo se determinaron: la concentración de ácido ascórbico, los niveles de nitritos y parámetros de peroxidación lipídica (TBARS). Todas las determinaciones se realizaron por técnicas espectrofotométricas, en el humor vítreo de perros controles (n=6), con glaucoma (n=6), con glaucoma suplementados con melatonina (n=4) y con glaucoma suplementados con vitamina E (n=4). La concentración de ácido ascórbico en GG fue  $50 \pm 5 \mu\text{M}$  y en GC  $175 \pm 24 \mu\text{M}$ ; ( $p < 0,001$ ). Para GE  $187 \pm 20 \mu\text{M}$  (GE versus GC ns, GE versus GG  $p < 0,01$ ) y para GM  $158 \pm 44 \mu\text{M}$  (GM versus GC ns, GM versus GG  $p < 0,05$ ). La concentración de nitritos en GG fue  $6,42 \pm 0,39 \mu\text{M}$  (GC  $1,82 \pm 0,19 \mu\text{M}$ ;  $p < 0,001$ ). Para GE  $1,91 \pm 0,07 \mu\text{M}$  (GC ns, GG  $p < 0,001$ ) y para GM  $0,67 \pm 0,11 \mu\text{M}$  (GC  $p < 0,05$ , GG  $p < 0,001$ ). Los TBARS en perros GG  $0,23 \pm 0,03 \text{ nmoles/mg de proteína}$  (GC  $0,67 \pm 0,07 \text{ nmoles/mg de proteína}$ ;  $p < 0,001$ ). Para GE  $0,31 \pm 0,09 \text{ nmoles/mg de proteína}$ ; (GE versus GC  $p < 0,01$ , GE versus GG ns) y para GM  $0,46 \pm 0,03 \text{ nmoles/mg de proteína}$ ; (GM versus GC ns, GM versus GG  $p < 0,05$ ). Se observa una disminución significativa en los niveles de ácido ascórbico y de los TBARS en perros con glaucoma. La suplementación con vitamina E mejora los niveles de ácido ascórbico y disminuye los niveles de nitritos, pero no se observa protección en la peroxidación lipídica. La suplementación con melatonina mejora los niveles de ácido ascórbico, disminuye la peroxidación de lípidos y disminuye los niveles de nitritos. 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. La suplementación con antioxidantes podría utilizarse en la terapéutica del glaucoma en perros.

### 314. (367) EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE PLANTAS DE LA FAMILIA VERBENACEAE UTILIZADOS EN MEDICINA POPULAR.

Reides C.<sup>1</sup>; Lasagni Vitar R.<sup>1</sup>; Ferreira S.<sup>1</sup>; Ricco R.<sup>2</sup>; Carballo M.<sup>3</sup>; Llesuy S.<sup>1</sup>  
*Cátedra de Química General e Inorgánica. FFYB, UBA<sup>1</sup>;*  
*Cátedra de Farmacobotánica. FFYB, UBA<sup>2</sup>;*  
*CIGETOX-INFIBIOQ. FFYB, UBA<sup>3</sup>*  
*creides@ffyb.uba.ar*

La familia Verbenacea se caracteriza por incluir especies aromáticas muy utilizadas en la medicina tradicional y popular. El presente estudio incluyó las siguientes especies *Aloysia citrodora* (AC), *Aloysia gratissima* var. *gratissima* (AG), *Aloysia gratissima* var. *schulziana* (AS) y *Aloysia polystachya* (AP). Todas presentan un uso en común que corresponde al tratamiento de desordenes gastrointestinales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antioxidante, el efecto sobre la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas de infusiones (5% m/v) de AC, AG, AS y AP. Para la determinación de la capacidad antioxidante total in vitro, se realizaron los ensayos de TRAP, DPPH y ABTS. El efecto sobre la oxidación de lípidos y de proteínas fue evaluado mediante TBARS y la técnica de los grupos carbonilos (PO) previa incubación de homogeneizados de cerebro de rata durante 2 horas a 37 °C en un medio conteniendo ABAP 50 mM y 50 mg/mL de la infusión. Todos los parámetros se determinaron por técnicas espectrofotométricas, a excepción del TRAP que se evaluó por quimioluminiscencia. Los valores de la capacidad antioxidante total fueron a- TRAP ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $362 \pm 18$  AC,  $214 \pm 11$  AG,  $380 \pm 18$  AS y  $186 \pm 10$  AP; b- DPPH ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $230 \pm 10$  AC  $211 \pm 13$  AG,  $240 \pm 14$  AS y  $147 \pm 7$  AP; c- ABTS ( $\mu\text{mol/g}$ ):  $358 \pm 14$  AC,  $219 \pm 42$  AG,  $351 \pm 50$  AS y  $217 \pm 20$  AP. Los TBARS disminuyeron 54% AC, 42% AG, 49% AS y 37% AP, (valor control:  $0,92 \pm 0,10 \text{ nmoles/mg proteína}$ ,  $p < 0,001$ ). Los PO disminuyeron un 90% (AC), 48% (AG), 68% (AS) y 34 % (AP) (valor control:  $1,15 \pm 0,18 \text{ nmol/mg proteína}$ ,  $p < 0,001$ ). Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que todos las infusiones poseen propiedades antioxidantes siendo las de mayor valor de capacidad antioxidante total e inhibición de la oxidación de lípidos y proteínas AC y AS. La marcada actividad antioxidante estaría avalando el empleo de estas infusiones para el tratamiento de patologías asociadas al estrés oxidativo.

### 315. (569) ACCIÓN DE AMARANTHUS HYPOCHONDRIACUS SOBRE GENES MARCADORES DEL ESTADO OXIDATIVO CELULAR EN RATAS INTOXICADAS CON ALCOHOL

Lucero López R.<sup>1</sup>; Razzeto G.<sup>1</sup>; Giménez M.<sup>1</sup>; Escudero N.<sup>1</sup>  
*Universidad Nacional de San Luis IMIBIO-SL-CONICET<sup>1</sup>*  
*vrllop@unsl.edu.ar*

El estrés oxidativo generado por el metabolismo de etanol, mediante producción de especies activas del oxígeno (EAO) y reducción en la eficiencia de sistemas antioxidantes celulares, es un factor clave para el desarrollo de patologías hepáticas. Los amarantus poseen relevantes propiedades nutricionales y nutraceuticas. Estudios previos en nuestro laboratorio mostraron en semilla de *Amaranthus hypochondriacus* (Ah) adecuados contenidos de antioxidantes dietarios e importante actividad de barrido de radicales libres. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de Ah sobre la expresión génica de enzimas involucradas en el estado oxidativo celular en hígado de ratas intoxicadas con etanol. Dieciséis ratas macho Wistar fueron divididas en cuatro grupos. Se empleó dieta AIN-93 M con variación de la fuente proteica: en los grupos I y II (Ah) y en III y IV (caseína). En los grupos II y IV se administró etanol 20% v/v en el agua de bebida, durante 4 semanas. Se amplificaron mediante RT-PCR los genes de las principales enzimas antioxidantes: Cu, Zn-superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa-1 (GPx-1) y de una de las fuentes endógenas primarias de EAO: NADPH oxidasa (NOX-2). En el grupo II respecto al IV se observó up-regulation de Cu,Zn-SOD (II:  $0,51 \pm 0,05$ ; IV:

0,45 ± 0,04 P<0,05). Los niveles de transcritos de CAT y GPx no mostraron diferencias significativas. Según mediciones previas de actividad enzimática existen aparentes discordancias entre la expresión y la actividad biológica, lo cual sugiere regulación a diferentes niveles por múltiples factores. El grupo II en comparación al IV mostró down-regulation de NOX-2 (II: 1,89 ± 0,23; IV: 2,71 ± 0,17 P<0,05), esto indicaría menor generación de EAO. Los experimentos muestran que los componentes biológicamente activos de Ah estarían modulando los sistemas antioxidantes celulares desempeñando una importante función en la protección contra los efectos adversos del etanol.

**316. (656) EFECTOS DE LA SOBRECARGA ORAL DE FRUCTOSA SOBRE ESTRUCTURAS FILOGENÉTICAMENTE ANTIGUAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA.**

Puyó A.<sup>1</sup>; Masciotra L.<sup>2</sup>; Carranza A.<sup>3</sup>; Torres M.<sup>1,4</sup>  
*Cátedra de Anatomía Humana Macro y Microscópica FFyB, UBA<sup>1</sup>; Instituto de Investigaciones Cardiológicas (ININCA), Facultad de Medicina (UBA)<sup>2</sup>; Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA)<sup>3</sup>; Instituto de Morfología JJ Naón, Facultad de Medicina (UBA)<sup>4</sup>*  
 anapuyo@gmail.com

El hipotálamo al igual que el hipocampo y el giro dentado son partes filogenéticamente antiguas del sistema nervioso central (SNC) y sus características se han mantenido relativamente constantes en los vertebrados terrestres a lo largo de la evolución, siendo centros relacionados con las funciones homeostáticas y cognitivas. Dietas ricas en fructosa (F) en la rata producen alteraciones metabólicas y hemodinámicas similares al síndrome metabólico humano. Previamente encontramos cambios morfológicos en el SNC en este modelo. Nuestro objetivo fue analizar las regiones filogenéticamente ancestrales en el cerebro de animales con sobrecarga oral de F. Se utilizaron 2 grupos de ratas Sprague-Dawley macho: control (C, n=4, agua para beber) y fructosa (F, n=4, solución de F 10% P/V para beber) durante 9 semanas. Sus cerebros fueron coloreados con la técnica de Nissl. Se analizó el hipocampo (áreas CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub>, CA<sub>3</sub>), el giro dentado y el hipotálamo (zona medial y lateral) en 46 preparados histológicos. En el hipotálamo se efectuó el conteo celular por campo. La F aumentó la presión arterial (mmHg, F: 132±3 vs. C: 116±3, p<0.001) y la trigliceridemia (mg/dl, F: 231±28 vs. C: 50±3, p<0.005); mientras que la glucemia no se modificó (mg/dl, F: 94±4 vs. C: 78±17, NS). El análisis histológico mostró en el grupo F alteraciones neuronales presentando células con bordes irregulares y corpúsculos de Nissl pequeños a nivel del hipocampo y giro dentado con agrupamientos lineales de las neuronas, lo que indicaría deterioro en la estructura de las células. A nivel hipotalámico este grupo presentó una disminución del 55.71% de neuronas por campo (F= 36.8±2.1 vs. C: 83.2±2.6, p<0.001). En conclusión el tratamiento con F en la rata produjo a nivel de estructuras del SNC relacionadas con la regulación de la homeostasis del medio interno, memoria y neurogénesis alteraciones morfológicas y disminución del número de células evaluadas desde la histología.

**317. (721) EFECTO DEL VANADATO Y LA VITAMINA E SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA CATALASA EN UN MODELO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE**

Nicolas D.<sup>1</sup>; Oliveri L.<sup>2</sup>; Varela L.<sup>3</sup>; Batlle A.<sup>4</sup>; Gerez E.<sup>5</sup>  
*Centro de Investigaciones sobre Porfirias y Porfirias<sup>1</sup>*  
 danu1986@hotmail.com

La porfiria aguda intermitente (PAI) se caracteriza por una disminución en la actividad de la PBG-deaminasa asociada a un marcado incremento en la expresión de la  $\delta$ -aminolevulinato sintetasa (ALAS). Previamente, en un modelo de diabetes murino, demostramos que el vanadato (V), y la vitamina E (vit E) regulan *in vivo* la transcripción del ALAS. Uno de los efectos tóxicos del V se relaciona con su capacidad de alterar el sistema de defensa antioxidante acompañado por la inhibición de la superóxido dismutasa y catalasa (CAT). Se ha demostrado el control de la expresión de la CAT por SP1 y su interacción con EGR1, y por FOXO1. El

objetivo fue investigar la acción del V y la vit E sobre la regulación de la CAT en un modelo de PAI inducido con alilisopropilacetamida (AIA). Los animales se dividieron en 4 grupos: Control (C), AIA, AIA+V y AIA+vit E. El V se administró en el agua de bebida (0,3 mg/ml) y la vit E en una dosis diaria (60 mg/kg *ip*) durante 6 días. El AIA (357 mg/kg) se administró *ip.*, 16 hs antes del sacrificio. El grupo C se trató solo con vehículo. En el grupo AIA+V la actividad de CAT disminuyó 51% (VC: 91,36±13,15  $\mu$ mol/mg seg; VT: 46,41 ±8,7  $\mu$ mol/mg seg p<0,05) y el contenido de proteína cayó un 46% respecto al C. En el grupo AIA y AIA+vit E, la actividad y el contenido de proteína de la enzima no se modificaron con respecto al C. En el grupo AIA+V los niveles de expresión de Sp1 y EGR1 cayeron un 48% y 56% respectivamente respecto al C, sin variar en los grupos AIA y AIA+vit E. En el grupo AIA y el grupo AIA+V los niveles de proteína de FOXO1 disminuyeron un 75 % y 74 % respectivamente. Sin embargo, en el grupo AIA+vit E dichos niveles aumentaron significativamente respecto al grupo AIA. Conclusión: La vit E no tuvo efecto sobre la CAT. La caída en la actividad y en los niveles de proteína de ésta enzima provocado por el V puede ser el reflejo de la disminución de los niveles de expresión del factor de transcripción Sp1.

### NEUROCIENCIAS 3

**318. (415) DESARROLLO DE APTÁMEROS QUE RECONOCEN DIFERENTES CONFORMACIONES DE LA PROTEÍNA PTEN EN EL NÚCLEO Y EL CITOPLASMA DE NEURONAS**

Moncalero V.<sup>1</sup>; Conzanzo R.<sup>2</sup>; Perandones C.<sup>1,2</sup>; Farini V.<sup>1</sup>; Sipowicz P<sup>1</sup>; Alvarez Heduan F.<sup>1</sup>; Radrizzani M.<sup>1</sup>  
*Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Escuela de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de San Martín.<sup>1</sup>; Fundación Leloir<sup>2</sup>*  
 vemoncalero@hotmail.com

El gen de PTEN (Phosphatase and Tensin homolog, deleted on chromosome 10) se encuentra involucrado en muchos procesos celulares. Las mutaciones de este gen se asocian con diversos cánceres esporádicos y al desarrollo de desórdenes cerebrales. La proteína PTEN es una fosfatasa con actividad dual capaz de desfosforilar el fosfatidil inositol (3,4,5)- trifosfato. En el núcleo celular esta proteína está asociada con la regulación de expresión de genes, pero el rol de la proteína en el núcleo aún no está dilucidado. Los aptámeros son una herramienta utilizada como alternativa a los anticuerpos. Son oligonucleótidos de ADN o ARN sintéticos que tienen la capacidad de unirse a diferentes moléculas blanco con alta afinidad y especificidad. El objetivo del trabajo es desarrollar aptámeros que sean capaces de reconocer a la proteína PTEN en el citoplasma y/o en el núcleo celular. En este trabajo se desarrollaron aptámeros de ADN utilizando el procedimiento de SELEX. Los aptámeros fueron desarrollados a partir de una biblioteca combinatoria y seleccionados con un péptido sintético y la proteína recombinante. La especificidad de los aptámeros fue demostrada en cortes histológicos de cerebelos murino y con la técnica de *Western blot* en homogenatos del tejido. Dos aptámeros hechos contra el péptido sintético fueron seleccionados debido a su propiedad de reconocer diferencialmente a la proteína en el núcleo o en el citoplasma de las neuronas. Cada aptámero reconoció a la proteína PTEN en precipitaciones hechas a partir de fracciones subcelulares, demostrando su selectividad. Utilizando anticuerpos se pudo demostrar que ambos aptámeros reconocen al péptido sintético en extremos diferentes. De acuerdo con la estructura cristalina de la fosfatasa y la posición del péptido blanco, nuestros resultados sugieren que la proteína PTEN tiene un plegamiento diferente al de la fosfatasa en el núcleo, proponiendo un mecanismo de acción diferente a los descriptos para este gen.

**319. (526) LONG LASTING MOLECULAR CHANGES UNDERLYING SENSITIZATION TO COCAINE ARE ABSENT IN NUCLEUS ACCUMBENS AND STRIATUM FROM PRE-PROENKEPHALIN KNOCK OUT MICE.**

Mongi Bragato B.<sup>1</sup>; Assis M.<sup>1</sup>; Bartos M.<sup>1</sup>; Zimmer A.<sup>2</sup>; Cancela L.<sup>1</sup>

*Departamento de Farmacología Facultad de Ciencias Químicas UNC<sup>1</sup>; Laboratory of Molecular Neurobiology, Department of Psychiatry, University of Bonn, Germany<sup>2</sup>*  
bethaniamongbragato@hotmail.com

Repeated administration of cocaine induces psychomotor sensitization, characterized by an augmented locomotor response to a subsequent cocaine challenge. Among the enduring neuronal changes responsible for the expression of cocaine sensitization, alterations in glutamate and dopamine signaling, as well as plasticity within the nucleus accumbens and striatum play a critical role. However, it has been described that not only the glutamatergic and dopaminergic system are involved in this phenomenon but also the enkephalinergic system. The main goal of this study was to demonstrate the involvement of the enkephalinergic system in cocaine-induced behavioral sensitization, and to determine long lasting associated molecular changes, such as the ERK activity and the surface AMPA receptor expression in mesocorticolimbic brain areas. Male C57B/6J wild type and preproenkephalin knockout (Penk -/-KO) mice were daily treated with cocaine (15mg/Kg i.p.) and vehicle for 9 days followed by a cocaine challenge (7,5mg/Kg) on days 15 and 21 of the treatment. The locomotor activity was measured on days 15 and 21. On day 21, mice were killed for biochemical analysis. The nucleus accumbens, striatum, hippocampus and prefrontal cortex were dissected and GluR1, dopamine transporter and ERK levels measured by western blot. Penk-/- KO mice did not show sensitization to the behavioral effects induced by cocaine and failed to show the cocaine-induced increases in ERK activity and AMPA cell surface expression evidenced in the wild type mice. However, the locomotor activity in response to an acute injection of the drug and the levels of dopamine transporter were similar in both KO and wild-type mice. These results indicate that preproenkephalin-derived opioid peptides did not interfere with the primary action of cocaine on the dopaminergic system, although they seem to be strongly involved in the long-term plastic changes underlying behavioral sensitization to cocaine. Financial support Foncyt, Secyt, Agencia Córdoba Ciencia, CONICET

### 320. (615) ACCIÓN DE LA ERITROPOYETINA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLIA

Wenker S.<sup>1</sup>; Chamorro M.<sup>1</sup>; Hauk V.<sup>1</sup>; Pérez Leirós C.<sup>1</sup>; Vittori D.<sup>1</sup>; Nesse A.<sup>1</sup>

*Departamento de Química Biológica. FCEN-UBA. CONICET<sup>1</sup>*  
swenker@qb.fcen.uba.ar

La importancia terapéutica de la eritropoyetina (Epo), originalmente definida por su rol en la eritropoyesis, se expandió a partir del hallazgo de receptores específicos en tejidos no hematopoyéticos. En trabajos previos observamos que la Epo ejerce un efecto anti-apoptótico sobre células de origen neuronal expuestas a hipoxia, staurosporina o TNF- $\alpha$ . Dado que diferentes modelos experimentales han sugerido un efecto anti-inflamatorio de la Epo, nos propusimos como objetivo analizar si la Epo puede presentar un efecto modulador en cultivos de microglia. Se sabe que, en procesos neurodegenerativos y accidentes cerebrovasculares, el desarrollo de un microambiente pro-inflamatorio generado por la activación de la glia representa uno de los principales efectores de muerte neuronal. En este trabajo se caracterizó la activación de células de microglia murina (EOC-2) por exposición (24 h) a diferentes efectores: LPS (100 ng/ml), TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) y CoCl<sub>2</sub> (100  $\mu$ M), observándose un incremento en la producción de nitritos (Método de Greiss: C 5,8 $\pm$ 2,0; LPS 16,5 $\pm$ 8,5; TNF- $\alpha$  17,7 $\pm$ 5,0; CoCl<sub>2</sub> 32,0 $\pm$ 3,1 nmol/ml; LPS o TNF- $\alpha$  vs. C P<0,05, N=3; CoCl<sub>2</sub> vs. C P<0,001, N=6). Por exposición a CoCl<sub>2</sub> se incrementó la proliferación celular (MTT: C 0,42 $\pm$ 0,06; CoCl<sub>2</sub> 0,89 $\pm$ 0,16; P<0,05 N=4). La presencia de Epo (25 U/ml) en cultivos de EOC-2 indujo un aumento en los niveles de nitritos (C 6,1 $\pm$ 1,9; Epo 13,3 $\pm$ 1,2 nmol/ml; P<0,05, N=5) y alteró la proliferación celular. El tratamiento con Epo (25 U/ml, 24 h) previo a la incubación con CoCl<sub>2</sub> inhibió el efecto de éste sobre la proliferación celular

(CoCl<sub>2</sub> 0,89 $\pm$ 0,16; Epo-CoCl<sub>2</sub> 0,35 $\pm$ 0,04; P<0,05, N=4) sin alterar la expresión de iNOS (*western blotting*) ni la producción de nitritos (CoCl<sub>2</sub> 30,8 $\pm$ 5,8; Epo-CoCl<sub>2</sub> 32,6 $\pm$ 6,0 nmol/ml; NS, N=5). Los resultados sugieren que si bien la Epo no impide la activación de la microglia, podría reducir el daño potencial implicado, contrarrestando la inflamación a largo plazo mediante una acción antiproliferativa.

### 321. (732) TRANSFERRINA, PRECURSORES NEURALES Y PRE-OLIGODENDROCITOS

Silvestroff L.<sup>1</sup>; Franco P.<sup>1</sup>; Pasquini J.<sup>1</sup>

*IQUIFIB - UBA - CONICET<sup>1</sup>*  
silver81@yahoo.com.ar

La Transferrina (Tf) es la principal glicoproteína transportadora de hierro en sangre de mamíferos y tiene efectos tróficos sobre diferentes tejidos de mamíferos. En el sistema nervioso central (SNC) la Tf posee efectos pro-madurativos sobre células del linaje oligodendroglial, pero se conoce poco sobre los mecanismos que participan en éste fenómeno. Decidimos entonces evaluar los efectos tróficos de la Tf sobre células inmaduras del SNC en desarrollo. Para ello, recurrimos al tratamiento con apoTransferrina (aTf) de cultivos primarios de zona periventricular de rata recién nacida y líneas celulares inmortalizadas de pre-oligodendrocitos (PreOL) de rata. Para los cultivos primarios, se disecó la zona periventricular de ratas de 2 días de edad y se disgregó a una suspensión de células únicas. Los PreOL son una línea celular inmortalizada con el virus SV40 que sobre-expresa el antígeno T inmortalizante. En ambos casos, elegimos cultivar las células como suspensiones de agregados celulares esféricos que denominamos neuroesferas (NEs) y oligoesferas (OEs), respectivamente. Luego del tratamiento con aTf durante una semana, observamos que el diámetro de las NEs y OEs era mayor respecto de la situación control. La utilización de Tf marcada con una sonda fluorescente permitió observar que las células comprometidas con el linaje oligodendroglial son capaces de incorporar Tf. Además, los PreOL demostraron proliferar más en presencia de aTf, mediante la evaluación de la incorporación bromodeoxiuridina, un análogo de la timidina. Nuestros resultados nos permiten concluir por primera vez que la aTf no sólo acelera la maduración de los oligodendrocitos, sino que promueve su proliferación durante estadios más inmaduros.

### 323. (744) TÉCNICA DE ANÁLISIS IN SITU DE LA COMPOSICIÓN DE GLICANOS EN TEJIDO NERVIOSO

Rinflerch A.<sup>1</sup>; Burgos V.<sup>1</sup>; Loresi M.<sup>1</sup>; Argibay P.<sup>1</sup>

*ICBME Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1</sup>*  
rinflerch@gmail.com

Las proteínas y lípidos presentes en todas las células son modificadas postraduccionalmente por la adición de azúcares (o glúcidos) en el Reticulo Endoplasmático y en Complejo de Golgi. Estas uniones pueden ser tipo N- si es una asparagina o tipo O- si es una Serina o treonina del péptido. Entre las glicosidaciones se encuentra la sialidación de glicolípidos y glicoproteínas, que se sabe en el SNC su ausencia es causante de enfermedades severas o letalidad. Los ácidos disialícos presenta un patrón particular de marcación en el SNC al ser identificados con el anticuerpo monoclonal anti disialícos S2-566. Para determinar si la inmunomarcación corresponde a O-glicanos o N-glicanos sialilados desarrollamos métodos de eliminación selectiva de estos epítopes en tejido, utilizando herramientas aplicadas a técnicas ya conocidas. Para determinar si existe selectividad por parte de la enzima respecto a su sustrato desarrollamos la Beta-eliminación alcalina, que hidroliza las uniones O-glicosídicas eliminando el epítope de la muestra, así como el tratamiento con N-glicanasa que elimina los epítopes N- en cortes de cerebro por congelación. Cortes de cerebros de ratones de 14  $\mu$ m fueron fijados y tratados con NaOH 0,1 M en etanol 70% v/v durante 6 días a 4°C y luego los vidrios inmunomarcados con S2-566. Partiendo de muestras similares, los vidrios fueron tratados con N-glicanasa a 37°C durante 24hs a °C. Por otra parte utilizamos la hidrólisis ácida, incubando el vidrio en ácido clorhídrico a 82°C durante 2hs, para eliminar los

ácidos siálicos. Los resultados fueron los esperados. Observamos una clara disminución de la marcación para ácidos disíalicos, con un patrón particular para cada tratamiento y la pérdida total de la marca cuando el vidrio es tratado con hidrólisis ácida, demostrando ser esta una técnica plausible de utilizar para identificar a que tipo de unión glicosídica corresponde la inmunomarcación.

**324. (790) DISPARIDAD DE EFECTOS DEL ETANOL E INICIO DE LA RESACA EVALUADO MEDIANTE TRES PARÁMETROS COMPORTAMENTALES EN EL RATON SWISS**

Karadayian A.<sup>1</sup>; Gobetto N.<sup>1</sup>; Cutrera R.<sup>1</sup>  
Laboratorio de Neurobiología y Ritmos Facultad de Medicina<sup>1</sup>  
analía11@hotmail.com

La resaca alcohólica es el estado que se presenta luego de una ingesta copiosa de alcohol, cuando éste desaparece de la circulación sanguínea. En humanos, durante este período, se presentan síntomas desagradables que comprometen el estado físico y anímico. En animales de experimentación, se observan alteraciones similares. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran, en el ratón, que al cabo de seis horas, la alcoholemia es menor al 10% del pico máximo alcanzado para una dosis de 3,8 gEtOH/Kg BW y la coordinación neuromuscular está deteriorada ( $p < 0.01$  resaca vs. control). Sin embargo, se desconoce si éste u otros comportamientos estarían alterados. Así, el objetivo de este trabajo fue estudiar la coordinación neuromuscular, el comportamiento símil-ansiedad y la actividad espontánea en el proceso previo e inicio de la resaca. Para ello, ratones macho adultos de la cepa Swiss recibieron una inyección i.p. de etanol (3,8 g/Kg) (grupo EtOH,  $n=10$ ) o salina (grupo control,  $n=10$ ). Se evaluó la coordinación neuromuscular (*tightrope test*), el comportamiento símil-ansiedad (*elevated-plus maze*) y la actividad espontánea (*t-maze*) a los 60, 180 y 360 minutos luego de la inyección. Los resultados muestran que la coordinación neuromuscular de los animales disminuye cuando el etanol está presente en el torrente sanguíneo ( $p < 0,001$  *t-student*: EtOH vs. control a los 60 y 180 min). Esto además es evidente al inicio de la resaca (360 min post-inyección  $p < 0,001$ ). Se observaron también aumentos en los niveles de ansiedad a 180 y 360 min ( $p < 0,05$ ). Por último, la actividad espontánea está conservada durante todo el período observado a pesar la dosis alta de etanol administrada. Estos resultados demuestran que el etanol ocasiona cambios en el comportamiento de los animales que comprometen la coordinación neuromuscular y los niveles de ansiedad. Esto persiste al inicio de la resaca. Futuros experimentos permitirán evaluar si éste patrón se conserva durante este período tan particular.

**325. (149) ASPECTOS NEUROENDÓCRINOS Y MORFOLÓGICOS DE CRIAS MACHO EXPUESTAS A ESTRÉS DURANTE LA GESTACIÓN**

Pallarés M.<sup>1</sup>; Gonzalez- Calvar S.<sup>2</sup>; Bourguignon N.<sup>3</sup>; Adrover E.<sup>1</sup>; Katunar M.<sup>1</sup>; Baier C.<sup>1</sup>; Lux-lantos V.<sup>3</sup>; Calandra R.<sup>2</sup>; Antonelli M.<sup>1</sup>  
IQUIFIB FFYB, UBA<sup>1</sup>; Laboratorio de esteroideos- IBYME<sup>2</sup>; Laboratorio de neuroendocrinología- IBYME<sup>3</sup>  
mpallares@ffy.uba.ar

Durante varios años nuestro laboratorio ha investigado los efectos del estrés prenatal (EP) sobre la maduración de la neurotransmisión dopaminérgica (DA) en áreas cerebrales límbicas, hallándose alteraciones luego de la adolescencia. En este período además, las hormonas gonadales actúan centralmente influyendo sobre la maduración final del cerebro. En este trabajo evaluamos parámetros del eje hipotálamo-hipófiso-gonadal (HHG) en machos de diferentes edades, expuestos a EP. El estrés consistió en tres sesiones diarias de 45 minutos de inmovilización durante la última semana de gestación. La distancia anogenital y el descenso testicular se evaluaron a partir del día postnatal (DPN) 21. Los niveles séricos de las hormonas luteinizante (LH), testosterona (T) y 5- $\alpha$  Androstane- 3- $\alpha$ , 17 $\beta$ - Diol (DIOL) fueron evaluados en crías de 28, 35, 45, 60 y 75 días de vida mediante la técnica de radioinmuno ensayo. Los testículos pertenecientes a ratas de 35

y 60 días fueron procesados histológicamente para mediciones de histomorfometría. Nuestros resultados mostraron que el EP redujo la distancia anogenital de los machos al DPN 21 e indujo un retraso de 2 días en el descenso testicular, en comparación con los controles (C). Además, el EP disminuyó los niveles de LH al DPN 28 y 75, redujo T en ratas de 75 días e incrementó los niveles de DIOL en DPN 28 y 45 en relación a lo observado en C. Por otra parte el EP aceleró el desarrollo de la espermatogénesis, incrementando también el diámetro tubular medio de los túbulos seminíferos. No obstante el número de células de Leydig se halló reducido en ratas EP. Nuestros resultados muestran que EP interfiere con parámetros del eje HHG de las crías macho. Siendo que las hormonas gonadales juegan un rol muy importante en la organización y maduración final del cerebro, la alteración en sus niveles, como consecuencia del EP podría estar involucrada con la disfunción en la maduración de las vías DA observada en nuestro laboratorio.

**326. (269) GALECTINA-3 CUMPLE UN ROL PRIMORDIAL EN LA MIELINIZACIÓN DEL SNC EN RATONES.**

Hoyos H.<sup>1</sup>; Pasquini L.<sup>1</sup>; Rabinovich G.<sup>2</sup>; Pasquini J.<sup>1</sup>  
Dpto. de Química Biológica-IQUIFIB, FFYB, UBA-CONICET<sup>1</sup>; Lab. de Inmunopatología IBYME-CONICET. Dpto. de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA<sup>2</sup>  
hernanchoyos@gmail.com

Los oligodendrocitos (OLGs) son los encargados de la formación de la mielina en el SNC y su desarrollo y diferenciación son un mecanismo de interés en la neurobiología. La Galectina-3 (Gal-3) es una proteína de 29-35 kDa y está constituida por una sola cadena polipeptídica y ha sido sugerida, entre otros roles, como un marcador de diferenciación algunos tipos celulares. En OLGs en cultivo hemos demostrado que la Gal-3 participa en la maduración de los OLG. Precursores de OLG tratados con Gal-3 recombinante, muestran un aumento significativo de células MBP+ (myelin basic protein) y una disminución de OPC marcados con A2B5 (marcador temprano). La Gal-3 tendría un papel preponderante en el proceso de diferenciación de los OLG y, consecuentemente, en el proceso de mielinización. En el presente trabajo, hemos evaluado el grado de mielinización por técnicas de inmunohistoquímica, Western Blot (WB) y microscopía electrónica (ME) en ratones, de la cepa C57BL/6 Gal-3+/+ y Gal-3-/-, a las 4 y 8 semanas de vida. Los ratones Gal-3-/- mostraron a nivel del cuerpo calloso y del cuerpo estriado, fallas en la inmunotinción para mielina. En concordancia, la inumoreactividad para la MBP y RIP está disminuida cuando se compara con sus respectivos controles. El WB muestra también una reducción en la MBP en los ratones Gal-3-/- vs. los ratones Gal-3+/+. La ME evidencia vainas de mielina con morfología distorsionada y algunos axones colapsados, al igual que una disminución en la cantidad de mielina, fundamentado en una reducción del número de vueltas de mielina y en un g-ratio menor en el caso de los ratones Gal-3-/- con respecto a los controles. El g-ratio es una relación del diámetro del axón con y sin su vaina de mielina. Podríamos decir entonces, que la falta de Gal-3 se traduce en una mielinización deficitaria, y que la Gal-3 cumpliría un rol primordial en la maduración oligodendroglial y, por ende, en la formación de la mielina.

**327. (305) LA ACTIVACIÓN DE RAGE Y NFKB DETERMINAN LA MUERTE NEURONAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE APNEA DEL SUEÑO POR HIPOXIA INTERMITENTE.**

Angelo M.<sup>1</sup>; Aviles-Reyes R.<sup>1</sup>; Villarreal A.<sup>1</sup>; Ramos A.<sup>1</sup>  
Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof. Eduardo De Robertis. Facultad de Medicina UBA - CONICET<sup>1</sup>  
floren.angelo@gmail.com

La apnea del sueño (AS) es una patología muy difundida que produce alteraciones neurocognitivas graves. En un modelo experimental de AS por hipoxia intermitente (HI), demostramos previamente una profusa gliosis reactiva y alteraciones neuronales que incluyen la disminución de prolongaciones y redistri-

bución del marcador del núcleo neuronal NeuN que anticipa la muerte neuronal (Aviles Reyes y col., 2010). Estas alteraciones se encontraron especialmente en hipocampo y corteza cerebral, áreas relacionadas con los problemas cognitivos evidenciados en pacientes con AS. Adicionalmente, determinamos la sobreexpresión del receptor para productos avanzados de glicosilación (RAGE) y del factor glial S100B acompañadas de una activación de NFκB en estas áreas. Ya que se reconoce que S100B-RAGE-NFκB podrían activar tanto genes relacionados a la sobrevida como a la muerte neuronal, realizamos estudios de pérdida de función utilizando anticuerpos neutralizantes anti-RAGE, anti-S100B o bloqueando de NFκB in vivo en animales expuestos a HI. Se administraron estos compuestos intrahipocámpalmente a ratas cepa Wistar y luego se expusieron a HI (6min 10% O<sub>2</sub> – 6 min 21% O<sub>2</sub>, 8hs/día, 3 días). Se analizó la sobrevida neuronal estudiando la morfología de los núcleos neuronales y la redistribución de NeuN. Nuestros resultados muestran que el bloqueo de RAGE disminuye la tasa de alteraciones neuronales en animales expuestos a HI mientras que en animales normóxicos no tiene un efecto significativo. La administración de anticuerpos anti-S100B no produce cambios significativos. El bloqueo de la activación de NFκB con sulfasalazina disminuye las alteraciones neuronales en animales HI, mientras que produce una mayor tasa de alteraciones en condiciones de normoxia. Concluimos que RAGE y NFκB estarían involucrados en la pérdida de neuronas inducida por la HI, mientras que la actividad de NFκB sería requerida para la sobrevida neuronal en condiciones normales. Subsidios: CONICET PIP1728, IBRO RHF

### 328. (362) EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA A<sub>2A</sub> SOBRE LA LIBERACIÓN EVOCADA DE ACETILCOLINA EN SINAPSIS NEUROMUSCULAR DE MAMÍFERO

Palma A.<sup>1</sup>; Losavio A.<sup>1</sup>  
Instituto de Investigaciones Médicas Lanari<sup>1</sup>  
idimneurofisio@gmail.com

Anteriormente encontramos que en preparaciones frénico-diafragma de ratones CF1 el agonista de los receptores (R) de adenosina A<sub>2A</sub> CGS-21680 (CGS) facilita la secreción de ACh evocada por K<sup>+</sup> por un mecanismo que involucra a los depósitos intracelulares sensibles a taspigargina (TG) y a los canales de calcio voltaje dependiente (CCVD) tipo L presinápticos. Desde que, tanto TG como nitrendipina (NIT), bloqueante de los CCVD tipo L, previnieron por completo la acción de CGS, sugerimos que los efectos del agonista A<sub>2A</sub> sobre ambos blancos están asociados. Cuando se evaluó si el influjo de Ca<sup>2+</sup> por los CCVD tipo L estimulaba la liberación de este ion desde el retículo endoplásmico (RE) a través del mecanismo *liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por Ca<sup>2+</sup>* (CICR), encontramos que el bloqueante universal de los CCVD Cd<sup>2+</sup> redujo la frecuencia de MEPPs en 15 mM K<sup>+</sup> (K<sup>+</sup>15 713.3±43.8% de los valores controles; K<sup>+</sup>15+Cd<sup>2+</sup> 149.6±10.9%) pero no modificó el efecto modulador de CGS (K<sup>+</sup>15+Cd<sup>2+</sup>+CGS 217.0±21.3%, p<0.05, n=4). Lo mismo se observó en 0Ca<sup>2+</sup>-EGTA-Cd<sup>2+</sup> (K<sup>+</sup>15 761.9±42.9%, K<sup>+</sup>15+0Ca<sup>2+</sup>-EGTA+Cd<sup>2+</sup> 41.6±4.2%, K<sup>+</sup>15+0Ca<sup>2+</sup>-EGTA-Cd<sup>2+</sup>+CGS 67.9±9.1%, p<0.05, n=4), sugiriendo que CIRC no está involucrado. Por otro lado, no se observó facilitación cuando los experimentos fueron realizados con NIT en 0Ca<sup>2+</sup>-EGTA-Cd<sup>2+</sup> (K<sup>+</sup>15 723.4±54.1%, K<sup>+</sup>15+NIT+0Ca<sup>2+</sup>-EGTA-Cd<sup>2+</sup> 47.9±6.9%, K<sup>+</sup>15+NIT+0Ca<sup>2+</sup>-EGTA-Cd<sup>2+</sup>+CGS 52.8±3.2%, n=4) o rianodina (RI), bloqueante de los RRI, canales liberadores de Ca<sup>2+</sup> del RE (K<sup>+</sup>15 860.8±79.8%, K<sup>+</sup>15+RI 901.6±12.7%, K<sup>+</sup>15+RI+CGS 721.5±83.9, n=4). Teniendo en cuenta que NIT, como DHP, inmoviliza las cargas de compuerta de los CCVD tipo L y que dichos canales podrían estar acoplados directamente a los RRI, se podría especular que ante la despolarización de las terminales por K<sup>+</sup>, el efecto modulador de CGS está asociado a una mayor activación de las compuertas, lo cual provocaría la apertura de los RRI y la salida de Ca<sup>2+</sup> desde el RE llevando a un aumento de la liberación del neurotransmisor.

### 329. (456) EL EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA SÍNTESIS Y RECAPTACIÓN DEL GLUTAMATO

Adrover E.<sup>1</sup>; Katunar M.<sup>1</sup>; Pallares M.<sup>1</sup>; Baier C.<sup>1</sup>; Acosta G.<sup>2</sup>; Waagepetersen H.<sup>3</sup>; Antonelli M.<sup>1</sup>  
IQUIFIB<sup>1</sup>; ININFA<sup>2</sup>; Faculty of Pharmaceutical Sciences University of Copenhagen<sup>3</sup>  
eadrover@ffyb.uba.ar

Episodios de estrés sufridos por la madre durante la preñez, generan cambios en el ambiente fetal que influyen en el desarrollo del sistema nervioso central de las crías. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que las ratas adultas estresadas prenatalmente tienen altos niveles de receptores glutamatérgicos, en comparación a los niveles de los controles. Estos animales también muestran hipertrofia astro-glial, reducida arborización dendrítica y pérdida de la función sináptica. Dado que el metabolismo de glutamato está ligado a la conexión entre las neuronas y las células gliales que las rodean, nuestros resultados sugieren que este sistema de neurotransmisión podría estar afectado por el estrés prenatal. Para evaluar el efecto del estrés prenatal (PS) sobre el metabolismo glutamatérgico, medimos con HPLC-masa el contenido de glutamato en distintas aéreas cerebrales de ratas PS a distintas edades. Para analizar el funcionamiento de los transportadores glutamatérgicos medimos la recaptación de este aminoácido en sinaptosomas y gliosomas (vesículas gliales reselladas) de ratas PS adultas. Los resultados obtenidos muestran que el contenido de glutamato, sintetizado de novo, en ratas PS macho de 60 días es significativamente menor que el de las ratas control de la misma edad. También encontramos que la recaptación de glutamato es mayor en las neuronas de machos PS adultos en comparación a las ratas control. Esto indicaría que el estrés prenatal produce cambios a largo plazo en el metabolismo del aminoácido glutamato modulando así la expresión de los receptores y alterando la normal transmisión sináptica de este sistema en el cerebro adulto.

### 330. (566) SISTEMA GABAÉRGICO NEURONAL EN LINFOCITOS HUMANOS

Dionisio L.<sup>1</sup>; De Rosa M.<sup>1</sup>; Bouzat C.<sup>1</sup>; Esandi M.<sup>1</sup>  
Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca<sup>1</sup>  
ldionisio@criba.edu.ar

Las células inmunes expresan receptores para moléculas neuroactivas que modulan su actividad. El ácido  $\alpha$ -amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. Nuestro objetivo fue identificar componentes del sistema GABAérgico y evaluar su funcionalidad en linfocitos humanos. Mediante RT-PCR detectamos en linfocitos sin activar y activados con fitohemaglutinina (PHA) ARNm de los siguientes componentes del sistema GABAérgico: i)GAD67, isoforma de la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), sintetizadora de GABA; ii)VIAAT, proteína vesicular encargada del almacenamiento de GABA; iii)GAT1 y GAT2, transportadores de GABA; iv)GABA-Transaminasa, enzima catabolizadora de GABA; y v) subunidades de los receptores ionotrópicos de GABA:  $\alpha$ 1,  $\beta$ 3,  $\gamma$ 2,  $\delta$  y  $\rho$ 2. Tras la estimulación con PHA, observamos mayor expresión de VIAAT por inmunocitoquímica y un aumento de 3 veces de la expresión de GABA-T mediante PCR en tiempo real (p<0.05). Nuestros resultados demostraron que los transportadores de GABA son funcionales, observándose un incremento de 5 veces en la recaptación de [<sup>3</sup>H]GABA en células activadas respecto a las no activadas (p<0.05). Mediante registros electrofisiológicos demostramos que los receptores ionotrópicos de GABA son funcionales ya que la aplicación rápida de GABA o muscimol, agonista específico de estos receptores, genera corrientes macroscópicas. Finalmente, determinamos que GABA y muscimol inhiben la respuesta proliferativa de linfocitos inducida por PHA (p<0.05). Nuestros resultados demuestran que los linfocitos poseen los elementos necesarios para constituir un sistema GABAérgico propio. La modulación farmacológica de este sistema puede ser útil en la creación de nuevas estrategias para la regulación de la respuesta inmune. Por otro lado, nuestro estudio abre la posibilidad de utilizar los linfocitos como modelo de fácil acceso para investigar alteraciones del sistema GABAérgico en enfermedades neuronales.



**331. (667) LA ELIMINACIÓN DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2 EN RATONES ADULTOS REVELA LA IMPORTANCIA FUNDAMENTAL DE ESTE RECEPTOR EN EL CONTROL EXTRAPIRAMIDAL DE LA ACTIVIDAD MOTORA.**

Bello Gay E.<sup>1</sup>; Noain D.<sup>1</sup>; Rodríguez V.<sup>1</sup>; Rubinstein M.<sup>1,2</sup>  
 INGEBI CONICET<sup>1</sup>; Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular, FCEyN, UBA<sup>2</sup>  
 estefania.bello@gmail.com

Las modificaciones genéticas en ratones resultan de gran utilidad para entender la función de cada gen en los sistemas fisiológicos de mamíferos y sus patologías asociadas. En muchos casos, sin embargo, la eliminación de un gen funcional (*knockout*) induce programas alternativos de desarrollo que compensa la falta del producto génico. Por ejemplo, ratones *knockout* del receptor dopaminérgico D2 (D2R) desarrollan compensaciones que se evidencian por un estado hipolocomotor mucho menos severo del que se observa por bloqueo farmacológico de los D2Rs en ratones normales. Para determinar el grado de participación del D2R en la neurotransmisión dopaminérgica de los ganglios de la base generamos ratones mutantes condicionales en donde la eliminación del gen del D2R (*Drd2*) se puede inducir en ratones adultos (*indD2KO*), evitando compensaciones tempranas. Para ello cruzamos ratones mutantes condicionales *Drd2<sup>lox/lox</sup>* con ratones Cre.ER<sup>TM</sup> que expresan la recombinasa Cre fusionada a un dominio del receptor de estrógenos. En ausencia de ligando, Cre.ER<sup>TM</sup> se mantiene en el citoplasma, pero análogos de estrógenos no fisiológicos como el tamoxifeno inducen la traslocación de Cre al núcleo en donde ejerce su actividad recombinasa. La administración de 50 mg/kg de tamoxifeno en ratones adultos durante 10 días disparó una delección de *Drd2* superior al 80%, observada en ensayos de *binding* e hibridaciones *in situ*. Los ratones *indD2KO* mostraron un fenotipo parkinsoniano caracterizado por temblor esencial primario, disminución marcada de la locomoción espontánea (menor número de inicios ambulatorios y menor velocidad de marcha) y dificultad en aprender durante 5 días un test de coordinación motora. La administración de anfetamina no modificó este fenotipo de manera significativa. En resumen, la eliminación genética de los D2Rs en ratones adultos produce un déficit motor severo que revela la importancia fundamental de estos receptores dopaminérgicos en el control motor extrapiramidal.

**332. (733) HIPOXIA-ISQUEMIA, LA ZONA SUBVENTRICULAR Y LA APOTRANSFERRINA**

Guardia Clausi M.<sup>1</sup>;  
 Depto de Química Biológica, FFyB, UBA, IQUIFIB<sup>1</sup>  
 mgclausi@yahoo.com.ar

La apo transferrina (aTf) es un factor trófico usado por nosotros en diferentes modelos de desmielinización para favorecer la remielinización. Hemos estudiado sus efectos sobre uno de los nichos de formación de oligodendrocitos (OL) como la zona subventricular (SVZ) en un proceso de hipoxia-isquemia (H/I). Utilizamos ratas Wistar de 7 días de edad (P7) cuya arteria carótida fue ligada de forma permanente y el animal luego sometido a 2 hs de hipoxia con una mezcla de 8% O<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>. A las 24 hs el animal fue inyectado intracranealmente (ICI) con 350 ng de aTf y estudiado a P10. Observamos una expansión de la SVZ con aumento de los precursores evaluados por nestina luego de la H/I. La aTf aumenta la proliferación celular, evaluada por un incremento en las células PCNA+, con un mayor compromiso con el linaje oligodendroglial (cél PDGFR-alfa). También observamos un aumento en células Shh+ (Sonic Hedgehog) después de la inyección de aTf como así también una mayor activación microglial y de los receptores de aTf. En la H/I había además un aumento en las células caspasa 3+ que desaparece por la ICI de aTf. En concordancia con estos resultados, neuroesferas obtenidas de la SVZ de estos animales sometidos a H/I e inyectados con Tf muestran al permitir diferenciarse un mayor número de células MBP/O4+ y O4+ respecto a aquellas obtenidas de animales H/I. Alentados por estos resultados y por previos estudios del laboratorio que muestran efectos benéficos de la Tf sobre la remielinización, decidimos evaluar una

via de administración alternativa menos injuriosa que la inyección intracraneal. Utilizando un animal transgénico que expresa GFP bajo el promotor de la CNPasa (una enzima oligodendroglial) pudimos observar que la aTf inhalada por vía intranasal es capaz de llegar al cerebro del animal en estudio y producir los mismos efectos que aquella inyectada intracranealmente prometiendo entonces su utilización con fines terapéuticos.

**333. (770) RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CD166 Y ST8SIALIII DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO**

Rinflerch A.<sup>1</sup>; Burgos V.<sup>1</sup>; Argibay P.<sup>1</sup>  
 CBME Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1</sup>  
 rinflerch@gmail.com

La proteína CD 166 o Molécula de adhesión celular de leucocitos activados (ALCAM) participa en la migración celular al interaccionar homofilicamente (ALCAM/ALCAM) o heterofilicamente (ALCAM/CD6); ambas moléculas se expresan en el cerebro. CD166 participa en la hematopoyesis, respuesta inmune, progresión tumoral y también se cree que participa en la neurogénesis. CD166 es una molécula de adhesión por lo que su interacción con otras moléculas impide la migración celular. Sin embargo, una modificación postraduccional en esta proteína, como la sialilación impide la unión tanto hemofílica como heterofílica. En experimentos *in Vitro*, ALCAM fue asociada a la extensión de las neuritas cuando está disialilada. Nosotros pretendemos corroborar estos resultados *in vivo*, analizando la expresión de CD166 y de ST8SialIII, la enzima responsable de disialilación en el cerebro. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa, en tiempo real, analizamos los niveles la expresión de ALCAM y ST8SialIII en hipocampo, corteza, bulbo olfatorio y cerebelo, de ratones neonatos, adultos y seniles. Observamos que CD 166 aumenta significativamente su expresión desde neonatos a adultos y a seniles en todas las estructuras analizadas. Por otro lado ST8SialIII se expresa constantemente en hipocampo, corteza y bulbo olfatorio mientras que disminuye progresivamente en cerebelo, de neonato a adultos y a seniles. Concluimos que CD166 podría participar *in vivo* en la migración neuronal cuando esta disialilada, y una vez establecida la estructura cerebral, incrementa su expresión para anclar las células migrantes a su posición final

**334. (804) DIMORFISMO SEXUAL DE LA INGESTA INDUCIDA DE SODIO: ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DEL COMPLEMENTO CROMOSÓMICO SEXUAL Y EL ESTATUS GONADAL.**

Dadam F.<sup>1</sup>; Caeiro X.<sup>1</sup>; Vivas L.<sup>1</sup>; Cambiasso M.<sup>1</sup>  
 Instituto de Investigación Médica M y M Ferreyra. INIMEC-CONICET<sup>1</sup>  
 fdadam@immf.uncor.edu

Diversos estudios indican un dimorfismo sexual en la ingesta inducida de sodio, siendo la ingesta en machos de mayor envergadura. Si bien no se puede negar el rol indiscutible de los esteroides gonadales en el dimorfismo sexual, una serie de estudios indican que algunas características sexualmente dimórficas no podrían ser explicadas en su totalidad como resultado de la acción de los esteroides gonadales sino que por lo contrario, podrían atribuirse a diferencias en el complemento cromosómico sexual (CCS). Con el propósito de estudiar el rol del CCS en el dimorfismo sexual observado en la ingesta inducida de sodio empleamos una cepa de ratón transgénico el cual combina una mutación del gen determinante de testículos (*Sry*) con la incorporación del mismo en un cromosoma autosómico. Los genotipos resultantes son: hembras XX, hembras XY<sup>-</sup> (sin *Sry* en el cromosoma Y), machos XX*Sry* y machos XY<sup>-</sup>*Sry* (ambos con el gen *Sry* en un cromosoma autosómico). Ratones gonadectomizados pertenecientes a los cuatro genotipos fueron sometidos a un tratamiento combinado de la furosemida (10 mg/kg) y dieta baja en sodio. Los grupos controles fueron administrados con solución vehículo y mantenidos con una dieta con contenido normal en sodio. Veintinueve horas más tarde se sometieron a un test de ingesta (agua destilada y 2% NaCl).

El análisis estadístico de la ingesta inducida de agua y NaCl 2% reveló una interacción significativa de los factores fenotipo x tratamiento x tiempo (H<sub>2</sub>O: F(5,205)=3,50; p< 0,01, NaCl 2%: F(5,205)=3,51 p< 0,01) no observándose un efecto del factor cromosómico. El tratamiento desencadenó una ingesta mayor de agua y NaCl 2% en los ratones machos (XY-Sry y XXSry) respecto a la reportada para el grupo de hembras (XX y XY-). Estos resultados permiten sugerir que las diferencias observadas entre machos y hembras respecto a la conducta dípica y apetitiva por el sodio estarían promovidas por el estatus gonadal y no por la acción del CCS. Subsidiado por: Roemmers, FUCIBICO, ANPCyT y CONICET.

### ENDOCRINOLOGÍA 3

#### 335a. (144) CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LA POBLACIÓN SOMATOTROPA INDUCIDOS POR TERAPIA GÉNICA NEONATAL CON EL VECTOR RAD-FTS EN RATONES NUDE.

Martines E.<sup>1,2</sup>; Reggiani P.<sup>1,3</sup>; Bracamonte M.<sup>3</sup>; Luna G.<sup>4</sup>; Goya R.<sup>3</sup>; Cónsole G.<sup>2,4</sup>  
*Universidad Adventista del Plata<sup>1</sup>; Cátedra B de Histología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP<sup>2</sup>; Cátedra B de Histología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP; INIBIOLP-CONICET<sup>3</sup>; Comisión de Investigaciones Científicas: CICPBA<sup>4</sup>*  
 evmartines@hotmail.com

**Introducción:** Se ha detectado un eje bidireccional timo-pituitario, hallándose receptores de GH en las células epiteliales tímicas. La GH estimularía la secreción de timulina y los niveles bajos de timulina circulante en período prenatal inducirían hipopituitarismo. **Objetivo:** Implementar una terapia génica mediante el vector adenoviral RADmet-FTS en ratones inmunodeficientes con el fin de prevenir cambios en la población somatotropa. **Material y métodos:** Se utilizaron ratones nude hembras-machos homocigotos y heterocigotos. El día 1 postnatal recibieron una única inyección bilateral i.m. de 10<sup>8</sup> unidades formadoras de placa de RADmet-FTS, un vector adenoviral que expresa el gen de la timulina, o de un vector control (RAD-GFP). El día 71 postnatal fueron sacrificados y se extrajeron las pituitarias bajo lupa. Se midió timulina sérica por bioensayo. La inmunomarcación se realizó con un sistema anti-GH-EnVision. Los parámetros morfológicos se registraron mediante un analizador de imágenes. **Resultados:** La terapia génica con timulina neonatal previno el descenso de la población somatotropa. Se detectó un ascenso significativo (p<0.01) en los niveles séricos de timulina (fg/ml) en ratones nude RAD-FTS vs controles: M: 278±26 vs 38±7 y H 279±43 vs 37±2. Se registró aumento de DC y DV en (p<0.01) en nu/nuRAD-FTS vs nu/nuRAD-GFP en hembras y machos, con dimorfismo según sexo.

Machos	nu/+ RAD-GFP	nu/nu RAD-GFP	nu/nu RAD-FTS
TC (µm <sup>2</sup> )	61,8 ± 2	58,4 ± 4	62,6 ± 5
DC (x10 <sup>-4</sup> )	45,3 ± 3	32,1 ± 2	46,7 ± 3 *
DV (x10 <sup>-2</sup> )	28,3 ± 2	19,4 ± 2	29,1 ± 3 *
Hembras	nu/+ RAD-GFP	nu/nu RAD-GFP	nu/nu RAD-FTS
TC (µm <sup>2</sup> )	60,2 ± 2	58,4 ± 4	61,4 ± 5
DC (x10 <sup>-4</sup> )	34,0 ± 2	26,2 ± 3	36,8 ± 4 *
DV (x10 <sup>-2</sup> )	22,1 ± 2	11,8 ± 1	23,6 ± 3 *

**Conclusión:** Nuestros hallazgos sugieren un efecto restaurativo de la terapia génica neonatal con timulina sobre la población somatotropa, pudiendo usarse como una estrategia eficaz para prevenir las deficiencias detectadas en el eje timo-somatotrofo de animales atímicos.

#### 336. (186) EL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA-1 REGULA LA TRANSCRIPCIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN CÉLULAS HIPOFISARIAS

Haedo M.<sup>1</sup>; Fuertes M.<sup>1</sup>; Gerez J.<sup>1</sup>; Renner U.<sup>2</sup>; Stalla J.<sup>2</sup>; Stalla G.<sup>2</sup>; Arzt E.<sup>1</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Dpto. FBMC, FCEN, IFIBYNE-CONICET, UBA<sup>1</sup>; Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania<sup>2</sup>*  
 mhaedo@fbmc.fcen.uba.ar

La hipófisis normal y tumoral se caracterizan por ser tejidos con baja concentración de oxígeno. El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) está conformado por las subunidades HIF-1α, regulado por la presencia de oxígeno, y HIF-1β. Constituye el factor de transcripción más importante en la respuesta adaptativa a hipoxia, y está documentada su expresión en adenomas de hipófisis. Dados estos antecedentes, y el hecho que está poco explorado el efecto de HIF-1α y de la hipoxia (HPX) sobre las hormonas secretadas por la hipófisis, estudiamos el efecto de éstos sobre la regulación transcripcional y la secreción de la hormona del crecimiento (GH). Mediante ensayos de transfección transiente de un gen reportero conteniendo al promotor de GH acoplado al gen de la luciferasa en células GH3 demostramos que la HPX (12 hs, 1% O<sub>2</sub>) estimula levemente al promotor de GH y a su secreción (157%, p<0,05). La sobre-expresión en forma transiente de HIF-1α en estas células tiene un efecto aún mayor sobre el promotor (224%, p<0,05), y tiene efectos aditivos con el cAMP (500 uM) (269%, p<0,05). Empleando distintos promotores truncados de GH (-344, -212 y -145 GH-LUC), demostramos que el efecto estimulador de la sobre-expresión de HIF-1α se pierde si se trunca al promotor a partir de la base -344. Esto podría deberse a que hay posibles elementos respondedores a HIF-1 en aproximadamente -310 y -268, o que HIF-1 afecte la expresión de algún factor de transcripción que se une al promotor de GH en ese sitio. Interesantemente, en las mismas células que también producen prolactina, no se observa un efecto de la HPX sobre la misma. Concluimos que la HPX, y particularmente HIF-1, modulan, a nivel transcripcional, la expresión de GH. Los resultados obtenidos presentan un nuevo nivel de regulación, especialmente teniendo en cuenta que la HPX representa la situación al que los adenomas de hipófisis están expuestos.

#### 337. (203) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES HEPÁTICOS DEPENDIENTES DE GH EN UN MODELO DE RATÓN KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DE DOPAMINA D2 (DRD2<sup>-/-</sup>) Y EN HEMBRAS ANDROGENIZADAS NEONATALMENTE.

Ramirez M.<sup>1</sup>; Ornstein A.<sup>1</sup>; Becu-Villalobos D.<sup>1</sup>  
 IBYME<sup>1</sup>  
 ramirez@dna.uba.ar

La hormona de crecimiento (GH) ejerce efectos sexualmente diferenciados en muchos genes hepáticos, en particular los genes que codifican para los enzimas citocromos P450 (Cyp). En trabajos previos describimos que la delección total del receptor de dopamina D2 (RD2) alteraba el eje GHRH-GH-IGFI. Los machos *Drd2<sup>-/-</sup>* eran enanos con menores niveles de GH que su contraparte salvaje. Por lo tanto, analizamos si el patrón sexualmente dimórfico de expresión génica en hígado se encontraba alterado en los ratones *Drd2<sup>-/-</sup>* y en un modelo de hembras androgenizadas neonatalmente con testosterona (hembras TP) que también tienen el eje GHRH-GH-IGFI alterado. Analizamos por qPCR la expresión de los siguientes genes hepáticos sexualmente dimórficos y dependientes de GH: *Cyp2b9*, *Cyp2a4*, *Cyp2d9* y *MUP 1/2/6/8*. Confirmamos la expresión específica de macho de *Cyp2d9* y *MUP 1/2/6/8* con una relación macho/hembra de 6.2 y 2.4 respectivamente. La androgenización neonatal no masculinizó la expresión de estos dos genes en los hígados de las hembras. Los citocromos *Cyp2a4* y *Cyp2b9* son expresados predominantemente en hembras, y la relación hembra/macho obtenida fue

de 7.7 y 11.6, respectivamente. La inyección neonatal de testosterona en hembras produjo una defeminización de ambos genes en los hígados de las hembras TP con la pérdida de la expresión sexo-específica del *Cyp2a4* ( $P=0.0034$  y  $0.41$ , para machos vs. hembras y vs. hembras TP, respectivamente) y una defeminización parcial del *Cyp2b9* ( $P=0.0068$  y  $0.026$ , hembras TP vs. hembras y machos, respectivamente). Por otro lado, no encontramos diferencias significativas entre los genotipos *Drd2<sup>-/-</sup>* y *Drd2<sup>+/+</sup>* en la expresión de estos genes. Concluimos que el *imprinting* neonatal con testosterona modifica la fisiología hepática en hembras, pero la ausencia del RD2 en cambio no produce alteraciones en las enzimas hepáticas a pesar del desbalance que presentan los *Drd2<sup>-/-</sup>* en el eje de crecimiento.

### 338. (209) TRATAMIENTO ANTIANGIOGÉNICO CON ANTI-VEGF-A MAB G6-31 SISTÉMICO EN PROLACTINOMAS EXPERIMENTALES

Luque G.<sup>1</sup>; Ornstein A.<sup>1</sup>; Pérez Millán M.<sup>1</sup>; Becú-Villalobos D.<sup>1</sup>  
IBYME<sup>1</sup>  
luque@dna.uba.ar

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más frecuentes y resultan 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 en general invasivos y agresivos. El ratón hembra carente del RD2 (*Drd2<sup>-/-</sup>*) es un modelo útil para estudiar terapias alternativas. Estos ratones desarrollan hiperplasia hipofisaria seguida de la formación de adenomas de lactotrofos a lo largo de la vida. Hemos descrito que el VEGF está aumentado en las hipófisis hiperplásicas de hembras *Drd2<sup>-/-</sup>*. En el presente trabajo evaluamos el efecto de un tratamiento anti-VEGF en el desarrollo de estos prolactinomas. Realizamos un protocolo de dos inyecciones por semana durante 6 semanas en forma sistémica con mAb G6-31, un anticuerpo que liga VEGF murino (5mg/kg, Genentech) o con vehículo, en ratones hembras *Drd2<sup>-/-</sup>*. Al finalizar el tratamiento el peso de las hipófisis disminuyó ( $p=0.036$ ) y la concentración de prolactina intrahipofisaria resultó menor en el grupo tratado respecto del control ( $p=0.010$ ). Por inmunohistoquímica (IHQ) observamos un descenso en el porcentaje de lactotrofos con el tratamiento ( $p=0.004$ ). El índice de proliferación en las hipófisis tratadas fue menor ( $p=0.008$ ), sin encontrarse diferencias en la expresión de VEGF. Por otro lado, el área vascular relativa (área positiva para CD31 respecto del área total), disminuyó en las hipófisis tratadas ( $p=0.009$ ), resultado de una caída en el número de vasos por área ( $p=0.003$ ) sin verse modificado el tamaño de los mismos. Como medida de maduración vascular, medimos por IHQ alfa actina de músculo liso. El área relativa ocupada por vasos maduros también disminuyó con el tratamiento. Estos datos en su conjunto indican que una terapia antiangiogénica disminuye la vascularización, la proliferación del adenoma y el contenido de prolactina intrahipofisario en un modelo de prolactinomas experimentales resistentes.

### 339. (213) INFLUENCIA DEL ESTRADIOL EN LA ACTIVACION DE LA VIA DEL NF-KAPPAB INDUCIDA POR TNF-ALFA Y LPS EN CELULAS ADENOHIPOFISARIAS

Eijo G.<sup>1</sup>; Zárate S.<sup>1</sup>; Jaita G.<sup>1</sup>; Ferraris J.<sup>1</sup>; Magri M.<sup>1</sup>; Radl D.<sup>1</sup>; Zaldivar V.<sup>1</sup>; Boti V.<sup>1</sup>; Pisera D.<sup>1</sup>; Seilicovich A.<sup>1</sup>  
Instituto de Investigaciones en Reproducción, UBA<sup>1</sup>  
geijo@fmed.uba.ar

El Factor Nuclear kappa B (NF $\kappa$ B), un factor de transcripción activado por diversos estímulos incluyendo el TNF- $\alpha$  y el lipopolisacárido bacteriano (LPS), es un mediador importante en los procesos inflamatorios. Los estrógenos poseen un reconocido efecto anti-inflamatorio en diversos tipos celulares, que puede ser ejercido por inhibición de la actividad del NF $\kappa$ B. La inhibición de la vía del NF $\kappa$ B por el BAY 11-7082 (BAY), un compuesto que inhibe la translocación nuclear del NF $\kappa$ B, sensibiliza a las células adenohipofisarias a estímulos proapoptóticos, como el TNF- $\alpha$  y el LPS. Dado que los estrógenos tienen un efecto proapoptótico en la adenohipofisis, analizamos mediante la técnica de TUNEL, la

acción conjunta del BAY y del 17 $\beta$ -estradiol (E2) sobre la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas (OVX). Tanto el BAY (1  $\mu$ M) como el E2 (10<sup>-9</sup>M) sensibilizaron a estas células a la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$ , mientras que la presencia simultánea de estos dos compuestos potenció sus efectos sensibilizadores en lactotrofos (C:4.1%, BAY:17.1%, E2:15.7%, E2+BAY:37.8%,  $p < 0.01$ ;  $\chi^2$ ) pero no en somatotrofos (C:2.3%, BAY:5.4%, E2:7.4%, E2+BAY:8.3%). Además, determinamos por Western blot, el efecto del E2 sobre la activación del NF $\kappa$ B/p65 inducida por LPS en adenohipofisis de ratas OVX que fueron inyectadas con E2 (200  $\mu$ g/Kg) durante dos días y LPS (1 mg/Kg) 4 hs. antes de ser sacrificadas. El E2 disminuyó el porcentaje de translocación nuclear del NF $\kappa$ B/p65 inducida por LPS (C:28%, LPS:50%, E2:25%, E2+LPS:25%). Estos resultados sugieren que el E2 sensibilizaría a las células adenohipofisarias a la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  y LPS disminuyendo la actividad del NF $\kappa$ B. La inhibición de la translocación del NF $\kappa$ B explicaría el efecto proapoptótico del E2 en somatotrofos, mientras que los efectos aditivos del E2 y BAY sugieren que otros mecanismos adicionales contribuirían al desencadenamiento de la apoptosis en lactotrofos.

### 340. (330) DOPAMINA Y ESTRADIOL REGULAN LA ACTIVACION DE TGFB1 EN HIPÓFISIS.

Recouvreux M.<sup>1</sup>; Becú Villalobos D.<sup>1</sup>; Díaz Torga G.<sup>1</sup>  
IBYME<sup>1</sup>  
recouvreux@dna.uba.ar

Ha sido descrito que estradiol inhibe la síntesis de TGF $\beta$ 1 en hipófisis mientras que dopamina la aumenta. Es más, se ha postulado a TGF $\beta$ 1 como mediador de los efectos inhibitorios de dopamina sobre la actividad del lactotrofo. La regulación de TGF $\beta$ 1 es compleja. Se sintetiza como pro péptido inactivo (LAP+TGF $\beta$ ) y, antes de ser secretado, este complejo se une a proteínas de latencia (LTBPs) que mantendrán unida la citoquina a la matriz extracelular hasta su activación. Recientemente demostramos que, los ratones deficientes en receptor dopaminérgico tipo 2 (*D2dr<sup>-/-</sup>*) poseen una marcada disminución de TGF $\beta$ 1 activo en la hipófisis, sin alteración del TGF $\beta$ 1 total (activo+latente). Nuestra hipótesis es que dopamina y estradiol regulan la activación de TGF $\beta$ 1 además de su síntesis. Nuestro objetivo fue analizar las alteraciones de TGF $\beta$ 1 hipofisario frente a tratamientos con estradiol (E2, 5ug, sc) y agentes dopaminérgicos: agonista (cabergolina, 2mg/kg, ip) y antagonista (sulpiride, 10mg/kg, ip) a tiempos de 30 min o 24hs. Se midió por ELISA TGF $\beta$ 1 activo y total en homogenatos de hipófisis de ratones hembra adultos salvajes (*D2dr<sup>+/+</sup>*) o *D2dr<sup>-/-</sup>*. Sulpiride disminuyó significativamente TGF $\beta$ 1 activo a los 30 min ( $p=0.0009$ ) en hipófisis *D2dr<sup>+/+</sup>*, sin efecto a los 24hs ni sobre TGF $\beta$ 1 total. No se observaron efectos de cabergolina a tiempos cortos. Si bien E2 no alteró la actividad de TGF $\beta$ 1 en hipófisis *D2dr<sup>+/+</sup>*, indujo un marcado incremento de TGF $\beta$ 1 activo en hipófisis *D2dr<sup>-/-</sup>* (260.7+14 *D2dr<sup>-/-</sup>* vs 507.7+63 *D2dr<sup>+/+</sup>*E2,  $p=0.0001$ ) sin observarse alteraciones sobre TGF $\beta$ 1 total. Nuestros resultados son la primera evidencia de la acción de dopamina y estrógenos sobre la activación de TGF $\beta$ 1 en hipófisis, probablemente regulando alguno de los activadores descriptos (TSP1, MMPs, integrinas). Queda por dilucidar el principal activador hipofisario y su regulación por dopamina y estrógenos. Con apoyo de CONICET y ANPCT.

### 341. (510) EL CADMIO ESTIMULA LA PROLIFERACION CELULAR Y LA EXPRESION DE PROLACTINA A TRAVES DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

Miller E.<sup>1</sup>; Cabilla J.<sup>1</sup>; Quinteros F.<sup>1</sup>; Ronchetti S.<sup>1</sup>; Nudler S.<sup>1</sup>; Duvilanski B.<sup>1</sup> IQUIFIB,  
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1</sup>  
emiler@ffyub.uba.ar

El Cadmio (Cd<sup>2+</sup>) es un contaminante ambiental con numerosos efectos adversos sobre la salud humana. En nuestro laboratorio demostramos que este metal es capaz de actuar como un disruptor endocrino modificando la secreción de prolactina (PRL) e induciendo la proliferación de las células adenohipofisarias en

cultivo (aumento de la incorporación de BrdU y de la expresión de las ciclinas (cyc) D1 y D3). El objetivo de este trabajo fue Investigar los mecanismos por los cuales el Cd<sup>2+</sup> manifiesta sus efectos xenoestrogénicos a nivel adenohipofisario. Se realizaron cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembras adultas jóvenes de la cepa Wistar en un medio libre de rojo fenol y con suero fetal bovino adsorbido. Se estudió el efecto del Cd<sup>2+</sup> (10<sup>-8</sup> M, 72 hs) en presencia o ausencia de un antagonista del receptor de estradiol (ICI 182,780, 10<sup>-7</sup> M) sobre la expresión del ARNm de la isoforma alfa del receptor de estradiol (RE $\alpha$ ) y de las cyc D1 y D3 y el efecto del Cd<sup>2+</sup> (10<sup>-8</sup> M, 8 y 24 hs) sobre la expresión del ARNm de PRL (PCR semicuantitativa). El 17 $\beta$ -estradiol (E $_2$ , 1 nM) fue usado como control positivo. El tratamiento con ICI impidió la disminución en la expresión del ARNm del RE $\alpha$  inducida por el Cd<sup>2+</sup> (expresión relativa del ARNm del RE $\alpha$ : control: 1,23  $\pm$  0,03; Cd<sup>2+</sup>: 0,72  $\pm$  0,02, p<0,05 vs. control; ICI: 1,36  $\pm$  0,14; Cd<sup>2+</sup> + ICI: 1,10  $\pm$  0,07, p<0,05 vs. Cd<sup>2+</sup>) e impidió el aumento en la expresión del ARNm de las cyc D1 y D3 inducido por el Cd<sup>2+</sup>. La expresión del ARNm de PRL aumentó a partir de las 8 hs de incubación en presencia del Cd<sup>2+</sup> (expresión relativa del ARNm de PRL: 8 hs: control: 0,53  $\pm$  0,04; Cd<sup>2+</sup>: 0,88  $\pm$  0,08, p<0,05 vs. control; 24 hs: control: 1,19  $\pm$  0,08; Cd<sup>2+</sup>: 2,44  $\pm$  0,17, p<0,05 vs. control. Estos resultados muestran que el Cd<sup>2+</sup>, a bajas concentraciones, aumenta la proliferación celular y la secreción de PRL en las células adenohipofisarias por un mecanismo que involucra a los RE $\alpha$ .

#### 342. (513) EL ARSÉNICO REDUCE LA LIBERACIÓN DE PROLACTINA Y MODIFICA MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN LA ADENOHIPOFISIS.

Ronchetti S<sup>1</sup>; Quinteros F<sup>1</sup>; Cabilla J<sup>1</sup>; Nudler S<sup>1</sup>; Miller E<sup>1</sup>; Gonsbatt M<sup>2</sup>; Duvilanski B<sup>1</sup>  
 IQUIFIB, FFYB, UBA<sup>1</sup>; Instituto de Investigaciones Biomédicas, México DF<sup>2</sup>;  
 sronchetti@ffyub.uba.ar

El arsénico es un elemento natural ampliamente distribuido en la naturaleza siendo su forma inorgánica (iAs) altamente tóxica y carcinogénica. La exposición a iAs constituye uno de los mayores problemas sanitarios a nivel mundial. Poco se conoce sobre sus efectos a nivel hipofisario. El objetivo del presente trabajo fue estudiar los efectos del iAs sobre la fisiología adenohipofisaria. Se utilizaron cultivos primarios de células adenohipofisarias obtenidos a partir de ratas macho adultas de la cepa Wistar. Se investigó la acción del iAs<sup>3+</sup> (arsenito de sodio) sobre la viabilidad celular (método del MTT, Abs. 600nm), la liberación de prolactina (PRL) (radioinmunoensayo) y la expresión de genes de respuesta a estrés (RT-PCR). La exposición al iAs<sup>3+</sup> durante 24h disminuyó la liberación de PRL de forma dosis dependiente: ([PRL] % del control (C): iAs 1  $\mu$ M: 55.5 8.9\*; iAs 10  $\mu$ M: 17.2 3.9\*\*; iAs 25  $\mu$ M: 12.4 3.\*\*; \*p< 0.05, \*\*p<0.01 vs.C); mientras que sólo la concentración 25  $\mu$ M disminuyó la viabilidad celular (Abs. 600nm, % del control: 25  $\mu$ M: 63.2 8\*; \*p<0.05 vs. C). El efecto del iAs (25  $\mu$ M) sobre la viabilidad celular se hace irreversible a partir de 9 h de exposición (Abs. 600nm, % del control: 9h: 73.9 4.1\*\*, 12h: 71.6 2.9\*\*, 24h: 54.8 4.6\*\*; \*\*p<0.01 vs.C); en cambio la reducción en la liberación de PRL se observa a partir de la tercera hora de incubación ([PRL] % del control (C): 3h: 60.67 4.19; \*p<0.05 vs.C). La exposición al iAs<sup>3+</sup> 25  $\mu$ M aumentó la expresión del ARNm de los genes de respuesta al estrés: hemo-oxigenasa 1 (3h: 9.8; 6h: 13.7; 9h: 21.2; 18h: 17.2% respecto de C), metalotioneína 1 (3h: 44.9; 6h: 75.2; 9h: 52; 18h: 51.8% de C) y óxido nítrico sintasa 1 (3h: 20.3; 6h: 47.8; 9h: 31.4; 18h: 39.4% de C). Estos resultados muestran que el As altera la fisiología adenohipofisaria disminuyendo la liberación de PRL y aumentando la expresión de genes de respuesta a estrés. Estos efectos parecen ser eventos tempranos indicativos de la citotoxicidad del metal.

#### 343. (550) ALTERACIONES EN LA REGULACIÓN DEL EJE GONADOTRÓFICO EN RATONES NEONATOS GABAB1KO

Di Giorgio N.<sup>1</sup>; Catalano P.<sup>1,2</sup>; Bettler B.<sup>3</sup>; Libertun C.<sup>1,5</sup>; Lux-lantos V.<sup>1</sup>

IBYME<sup>1</sup>; Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>2</sup>; Universidad de Basilea, Suiza<sup>3</sup>; Facultad de Medicina UBA<sup>5</sup> digiorgio@dna.uba.ar

En trabajos previos hemos demostrado que la ausencia del receptor GABAB funcional (ratones GABAB1KO) altera significativamente la fisiología del eje gonadotrófico y la expresión sexualmente dimórfica de GnRH y GABA en la adultez (Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010 Mar; 298(3): E683-96). Aquí nos propusimos evaluar si estas diferencias se encontraban a los 4 días de edad, momento posterior a la diferenciación sexual. Se sacrificaron animales de ambos sexos y genotipos [salvajes (WT) y GABAB1KO] a los 4 días postnatales y se recolectaron los hipotálamos (HT) e hipófisis para la determinación del contenido de GnRH y gonadotrofinas respectivamente (RIA) y contenido de GABA y glutamato (HPLC). También se midió la expresión del ARNm de GnRH por PCR en tiempo real. El contenido de GnRH en HT presentó dimorfismo sexual en los animales WT, siendo el contenido de los machos mayor que las hembras; esta diferencia sexual se invirtió en los GABAB1KO (p<0.01). La expresión del ARNm de GnRH en HT anterior no mostró diferencias entre los grupos mientras que en el HT medio basal se observó una diferencia sexual de la expresión sólo en los animales GABAB1KO, siendo este nivel mayor en las hembras que en los machos (p<0.03). GABA en HT mostró una diferencia sexual, el contenido en machos fue mayor que hembras (p<0.05), sin diferencias entre genotipos. No se observaron diferencias en el contenido de glutamato. El contenido hipofisario de LH se vio aumentado en los animales GABAB1KO de ambos sexos (p<0.02), mientras que FSH no mostró diferencias. Estos resultados indicarían que existen alteraciones en el eje gonadotrófico hipotálamo-hipofisario en ausencia del receptor GABAB ya a los 4 días de edad, tanto en el contenido y expresión hipotalámica de GnRH como en el contenido hipofisario de LH. Sin embargo estas alteraciones son diferentes a las encontradas en la adultez, sugiriendo que en etapas posteriores del desarrollo el eje se encuentra afectado por otros mecanismos de regulación.

#### 344. (716) CÉLULAS PROGENITORAS ASOCIADAS A LA VASCULARIZACIÓN DE LOS ADENOMAS HIPOFISARIOS

Cristina C.<sup>1,2</sup>; Pérez Millán M. <sup>1</sup>; Baricalla A.<sup>2</sup>; Berner S.<sup>3</sup>; Sevlever G.<sup>4</sup>; Becú D.<sup>1</sup>  
 IBYME<sup>1</sup>; Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires<sup>2</sup>; Servicio de Neurocirugía Htal Santa Lucía<sup>3</sup>; Dpto Neuropatología, Instituto Fleni<sup>4</sup>  
 carolina.cristina@nexo.unnoba.edu.ar

En los adenomas hipofisarios se han descrito alteraciones en la expresión de factores de crecimiento que contribuirían a desregular la proliferación celular. En hipófisis adulta de rata y humana se detectaron células indiferenciadas que expresan nestina. Nestina es una proteína del citoesqueleto expresada en el desarrollo. Originalmente se la identificó como marcador de células madre en sistema nervioso y se la detectó en distintas neoplasias. En el presente trabajo estudiamos la existencia de células progenitoras y su relación con la angiogénesis en adenomas hipofisarios humanos e hipófisis normales. Se determinó por inmunohistoquímica la expresión de nestina, marcador de células progenitoras, en cortes histológicos de tumores obtenidos por cirugía; y su grado de vascularización a través de los marcadores de endotelio CD31 y CD34. Los adenomas se clasificaron en prolactinomas (PRL), somatotropinomas (GH) y no funcionantes (NF) según la hormona producida. La expresión de nestina resultó mayor en los tumores respecto a los controles (N=6,13,7 y 5 para GH, NF, PRL y Normal respectivamente, P< 0,05 control vs. tumores). En los tumores nestina se encontró asociada a la vasculatura, como marca gruesa rodeando el vaso, o fina bordeándolo parcialmente. Los controles mostraron marca escasa o casi nula. El área vascular (área ocupada por vasos/área total) resultó mayor en los tejidos normales que en los tumores (CD34: N=6,19,11 y 5; CD31: N=5,16,5 y 5 en GH, NF, PRL y Normal P< 0,05 control vs. tumores). En las hipófisis normales hallamos un mayor % de vasos grandes (% vasos grandes /vasos chicos P<0,05 Normal vs

adenomas), y nestina en los tumores se encontró principalmente en los vasos chicos. Conclusión: la escasa inmunorreactividad para nestina en las hipófisis normales muy vascularizadas y con vasos de gran área se asociaría con la quiescencia del endotelio normal mientras que en los adenomas la expresión de nestina se vincularía a la activa angiogénesis tumoral.

## NEUROCIENCIAS 4

### 345. (170) PROGESTERONA (PROG) EJERCE ACCIONES PROMIELINIZANTES EN UN MODELO DE DESMIELINIZACIÓN POR LISOLECITINA (LIS)

Garay L.<sup>1,2</sup>; González Denisse M.<sup>1,2</sup>; Lima A.<sup>1</sup>; Roig P.<sup>1</sup>; De Nicola A.<sup>1,2</sup>

Laboratorio de Bioquímica Neuroendócrina, IBYME<sup>1</sup>; Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA.<sup>2</sup>  
laugaray@yahoo.com

La administración intraespinal de LIS permite evaluar la desmielinización/remielinización por una toxina sin intervención del sistema inmune sistémico. Considerando que PROG produce efectos promielinizantes en un modelo autoinmune de Esclerosis Múltiple, nuestro objetivo fue evaluar sus efectos en la desmielinización por LIS. Un grupo de ratones C57Bl6 recibieron un pellet s.c de PROG (LIS + PROG) previo a la inyección con lisolecitina en la médula espinal, mientras que otro grupo permaneció sin tratamiento (LIS). A los 7 días postinyección, se analizaron a nivel torácico espinal los siguientes parámetros: a) grado de desmielinización mediante histoquímica con Luxol Fast Blue (LFB) e inmunohistoquímica (IHQ) para la proteína básica de mielina (MBP), b) densidad de células precursoras de oligodendrocitos y oligodendrocitos maduros en el funículo lateral mediante IHQ para NG2 y CC1 respectivamente y c) reactividad microglial, determinando el ARNm para CD11b por PCR de tiempo real. Los resultados mostraron que PROG disminuyó en 50% el área desmielinizada evaluada tanto por LFB (LIS:  $21.6 \pm 3.8$  vs. LIS + PROG:  $11.9 \pm 1.4$ ;  $p < 0.05$ ), como por MBP (LIS:  $23.42 \pm 4.5$  vs. LIS + PROG:  $12.7 \pm 1.4$ ;  $p < 0.05$ ). Además, los animales tratados mostraron mayor densidad de células NG2+/mm<sup>2</sup> (LIS:  $263.6 \pm 15.8$  vs. LIS + PROG:  $330.2 \pm 16.6$ ;  $p < 0.05$ ), y menor número de oligodendrocitos maduros/mm<sup>2</sup> (LIS:  $494.5 \pm 49$  vs. LIS + PROG:  $312.4 \pm 40.6$ ;  $p < 0.05$ ). Por último, aumentó la expresión del ARNm para CD11b en el grupo LIS respecto del control (CTRL), parámetro que fue atenuado por PROG (LIS:  $7.7 \pm 0.5$  vs. LIS + PROG:  $4.9 \pm 0.5$ ;  $p < 0.001$ ). Estos resultados sugieren la acción directa de PROG sobre precursores de oligodendrocitos y células microgliales, mecanismos que serían en parte responsables de su acción promielinizante frente al ataque tóxico por LIS y la activación del sistema inmune espinal.

### 346. (286) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA COLINÉRGICO EN EL PROCESO APOPTÓTICO DE CÉLULAS ACINARES GLANDULARES HUMANAS. ROL DE ANTICUERPOS ANTI-MUSCARÍNICOS DEL SÍNDROME DE SJÖGREN

Reina S.<sup>1</sup>; Sterin-Borda L.<sup>1</sup>; Borda E.<sup>1</sup>

Cátedra de Farmacología Facultad de Odontología UBA CONICET<sup>1</sup> sreina@yahoo.com

El tejido epitelial está involucrado en los mecanismos inmunológicos de tolerancia y de mantenimiento frente a auto-antígenos y es el blanco principal en el Síndrome de Sjögren primario (SSp). La alteración de su función puede estar involucrada en el desarrollo y/o mantenimiento de reacciones autoinmunes crónicas. En el SSp está descrito un incremento del fenómeno apoptótico (FA) en el tejido epitelial tanto acinar como ductal. El objetivo de este trabajo fue investigar si las IgG séricas anti receptor muscarínico (mAChR) subtipo M<sub>3</sub> (IgG-M<sub>3</sub>) de sueros de pacientes con SSp disparan el FA en células acinares humanas (A-253). Asimismo, analizaremos la participación del AMP cíclico (AMPc) y de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) en este fenómeno. Utilizando técnicas de transferencia terminal de deoxidionucleótidos (TUNEL) y fragmentación del ADN determinaremos el FA. La producción de

AMPc y PGE<sub>2</sub>, serán analizadas por ensayos de ELISA. La IgG anti-peptido M<sub>3</sub> (IgG-M<sub>3</sub>), purificada por afinidad en presencia del péptido sintético correspondiente al 2do dominio extracelular del mAChR humano fue capaz de incrementar el FA en las células A-253 [media±ESM] IgG-M<sub>3</sub>  $60 \pm 0.5$ , n=8; IgG normal:  $10 \pm 0.08$ , n=7; y la fracción no anti-peptido (eluato):  $7 \pm 1$ , n=7. Los efectos de la IgG-M<sub>3</sub> fueron antagonizados por el J104129  $4.5 \times 10^{-9}$  M (antagonista mAChR M<sub>3</sub>). Por otro lado, la IgG-M<sub>3</sub> incrementó la producción de AMPc (IgG normal:  $1.3 \pm 0.01$ , n=6; IgG-M<sub>3</sub>:  $9.5 \pm 0.8$ , n=6), como así también la producción de PGE<sub>2</sub> (IgG normal:  $10 \pm 1$ , n=6; IgG-M<sub>3</sub>:  $65 \pm 1.5$ , n=7). Tanto el J104129 como el péptido sintético M<sub>3</sub> (10µg/ml) inhibieron el incremento en la producción de AMPc ( $2.4 \pm 0.2$ , n=6) y de PGE<sub>2</sub> ( $26 \pm 2$ , n=5), respectivamente. Nuestros resultados sugieren que las IgG-M<sub>3</sub> presentes en el suero de pacientes con SSp tienen la capacidad de incrementar el FA en las células epiteliales glandulares humanas con la participación del AMPc y de moléculas proinflamatorias, como la PGE<sub>2</sub>.

### 347. (453) LA NUCLEACIÓN CITOPASMÁTICA DE LA CHAPERONA HSP90 PARTICIPA EN LOS PROCESOS DE POLARIZACIÓN NEURONAL Y DESARROLLO AXONAL

Quintá H.<sup>1</sup>; Galigniana M.<sup>1,2</sup>

IBYME<sup>1</sup>; Departamento de Química Biológica de la FCEN-UBA<sup>2</sup>  
hquinta@leloir.org.ar

Hsp90 es una chaperona con funciones celulares pleiotrópicas. En neuronas indiferenciadas forma complejos intranucleares con la inmunofilina FKBP52 y la co-chaperona p23, los que se desensamblan y redistribuyen en el citoplasma al inicio del proceso de diferenciación (Quintá et al., J Neurochem 2010). Se cree que el crecimiento axonal podría direccionarse vía COMT (centro organizador de microtúbulos), complejo que incluye a los centriolos asociados a g-tubulina y sirve de sitio de nucleación de microtúbulos. En el presente estudio analizamos la posible participación del complejo FKBP52-hsp90-p23 en tal proceso. Al iniciarse la diferenciación, FKBP52 abandona el núcleo y se concentra en los terminales y varicosidades del axón, mientras que hsp90 forma cúmulos citoplasmáticos adyacentes al núcleo en el polo en el que luego se generará el axón. Tales cúmulos de hsp90 crecen en volumen durante las primeras 2 h de iniciada la diferenciación hasta alcanzar ~200 µ<sup>3</sup> (i.e. ~50% del volumen nuclear), desagregándose gradualmente a posteriori para desaparecer a las 72 h. Esta estructura colocaliza con los centriolos, los que se ubican en su centro según imágenes de reconstrucción 3D a partir de barridos confocales en el eje z. Hsp90 forma complejos con g-tubulina, con la que coimmunoprecipita. Mientras FKBP52-hsp90-p23 permanecen ensambladas en el núcleo, la polimerización de los microtúbulos es incompleta. Luego de 2 h de iniciada la diferenciación, los microtúbulos se ovillan alrededor de la supraestructura MTOC-hsp90, la que inicialmente se rodea de p23. Luego, esta co-chaperona forma filamentos que crecen y se insertan en el axón nascente, en donde colocaliza con filamentos intermedios. Avanzada la axiogénesis, la g-tubulina del centrosoma migra al axón junto con hsp90. Proponemos que hsp90 participa y es marcadora del proceso de polarización neuronal y subsecuente desarrollo axonal, y que junto con g-tubulina, p23 y FKBP52 modula la arquitectura del citoesqueleto.

### 348. (643) EFECTO DE ALLOPREGNANOLONA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA 3á-HOR EN RATAS HEMBRAS

Escudero C.<sup>1</sup>; Giuliani F.<sup>1</sup>; García S.<sup>1</sup>; Casas S.<sup>1</sup>; Bazzocchini V.<sup>1</sup>; Yunes R.<sup>1</sup>; Cabrera R.<sup>1</sup>

INBIOMED-FCS-UM; IMBECU-CONICET<sup>1</sup>  
carlaescudero@hotmail.com

Allopregnanolona (Allo) es un neuroesteroide modulador de la actividad neuronal. En estudios previos reportamos que la administración intrahipocámpal (AH) de Allo presenta efectos promnésicos en el test Step Down en ratas ovariectomizadas (OVX), dependiendo del perfil de impregnación con estradiol (E) sólo o combinado con progesterona (P); sc. Los objetivos

del presente trabajo fueron determinar la expresión génica y la actividad enzimática de la enzima de síntesis de Allo, 3 $\alpha$ -HOR (3 $\alpha$ -hidroxiesteroide oxido-reductasa), en los hipocampos dorsales obtenidos de dichos grupos experimentales. Los resultados fueron analizados vs control (ratas inyectadas AH con LCR) por t-test ( $p < 0.05$  se consideró significativo). No se observaron diferencias en la actividad de 3 $\alpha$ -HOR cuando ratas OVX recibieron la AH de Allo. La administración de Allo, no modificó la actividad enzimática después de la impregnación con E (0,1mg/kg, 48h previas al training), sin embargo en el grupo impregnado con E-P (0,1mg/kg y 4mg/kg, 48hs y 5hs previas al training, respectivamente) Allo incrementó la actividad enzimática significativamente. Por otra parte, la expresión de la enzima se vio disminuida tras la administración de Allo tanto para el grupo OVX como para el grupo OVX-E. Sin embargo para el grupo OVX-EP no se observaron diferencias significativas. Concluimos que Allo presenta un fuerte efecto modulador no-genómico sobre los mecanismos neurogliales hipocámpales involucrados en la adquisición de la memoria, a la vez esto nos sugiere que las acciones genómicas de E y P sobre la neuroesteroidogénesis hipocámpal es un condicionante de la acción de Allo.

**349. (768) PROGESTERONA MODIFICA DIFERENCIALMENTE EL PATRÓN DE LIBERACIÓN DE DOPAMINA DE LAS TERMINALES DOPAMINÉRGICAS NIGROESTRIATALES EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN POR 6 OH-DOPAMINA.**

Casas S.<sup>1</sup>; Garcia S.<sup>1</sup>; Nanfaro F.<sup>1</sup>; Yunes R.<sup>1</sup>; Cabrera R.<sup>1</sup>  
*Instituto de Investigaciones Biomédicas; Universidad de Mendoza; IMBECU; CONICET; INBIOMED-FCS-UM; FCM-UNCuyo'*  
 casas\_sebastian@hotmail.com

En trabajos previos demostramos que la administración sc de progesterona (P) ejerce un efecto neuromodulador positivo a largo plazo, sobre las terminales nigroestriatales dopaminérgicas. Los objetivos de este trabajo fueron 1) Evaluar si la administración aguda de P modifica la liberación de dopamina por las terminales nigroestriatales; 2) Estudiar si dichas modificaciones son revertidas por la administración *in vitro* de bicuculina (Bic), antagonista GABA<sub>A</sub>. Para inducir enfermedad de parkinson se utilizó el modelo de la 6-hidroxi-dopamina con el que se lesionó la vía nigroestriatal izquierda. Los grupos experimentales fueron: 1) SHAM 2) Lesionados sin tratamiento (G2) 3) Lesionados y tratados 7 días pos-lesión con P 4 mg/kg/día sc durante 3 días. A las 8 semanas post-lesión, los animales fueron inyectados con una única dosis de P 4 mg/kg sc 30 minutos previos a su sacrificio y se evaluó la actividad dopaminérgica, por superfusión dinámica de los cuerpos estriados (CE) izquierdo (I) y derecho (D) en forma individual. Bic fue agregada al buffer de superfusión a una dosis de 4,9  $\mu$ M. Los resultados se expresaron con la media  $\pm$  SD respecto a la liberación basal, comparando CEI vs CED, y se analizaron por "t" Test. Se observaron cambios significativos diferenciales en la liberación de <sup>3</sup>H-DA (SHAM 79,5 $\pm$ 14,1%; 68 $\pm$ 15%); (G2 1,7 $\pm$ 4%; 39,3 $\pm$ 8,1%); (G3 22,2 $\pm$ 5,7%; 26,7 $\pm$ 3,8%) ( $p < 0,05$ ) vs animales de los mismos grupos a los que no se les inyectó P. Mientras que Bic revirtió tales hallazgos. Concluimos que P modula positivamente la actividad de las terminales dopaminérgicas nigroestriatales de los diferentes grupos. Esta modulación diferencial podría ser debido a que el sistema dopaminérgico nigroestriatal presenta una reactividad genómica diferencial tanto sea por la lesión (G2) como por el tratamiento (G3). Asimismo, la administración de P 30 min previos al sacrificio marca una fuerte acción no genómica diferencial, en donde el sistema GABA sería el responsable del efecto modulador.

#### ENDOCRINOLOGÍA 4

**350. (58) MODIFICACIÓN DE LA REGULACIÓN DEL EJE REPRODUCTOR EN RATAS MACHO DE 70 DÍAS PROVOCADA POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL DISRUPTOR ENDÓCRINO NONILFENOL.**

Ale E.<sup>1</sup>; Deguiz M.<sup>1</sup>; Genovese G.<sup>2</sup>; Carbone S.<sup>1</sup>; Reynoso R.<sup>1</sup>; Scacchi P.<sup>1</sup>; Ponzo O.<sup>1</sup>

Laboratorio de Endocrinología Inst de Fisiología Fac de Medicina UBA<sup>1</sup>; Laboratorio de Embriología Animal, DBBE, FCEN, UBA & CONICET<sup>2</sup> oponzo@fmed.uba.ar

El nonilfenol (NP) es un disruptor endócrino con acción estrogénica y antiandrogénica, utilizado en la fabricación de productos de uso cotidiano como conservas de alimentos y cosméticos. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto a la exposición crónica a NP, sobre los distintos niveles de regulación del eje reproductor en ratas macho de 70 días de edad ( $n = 10-12$ ). Los animales recibieron diariamente el 4-NP disuelto en aceite de oliva por vía oral a través de una cánula orogástrica desde el día 21 de edad (postdestete) hasta el momento del sacrificio (70 días de edad), en dosis de 100 (NP100) y 200 (NP 200) mg/kg/d. Los controles solo recibieron el vehículo oleoso. Se analizó la liberación "ex vivo" hipotalámica de GnRH y adenohipofisaria de FSH y LH (RIA) y la concentración plasmática de testosterona (ELISA). El análisis histológico de las gónadas se realizó con la técnica de hematoxilina-eosina. Se consideró un  $p < 0.05$  como resultado significativo. Se observó una disminución significativa de testosterona plasmática en ambos tratamientos (Control:  $1.96 \pm 0.66$ , NP 100:  $0.69 \pm 0.44$ , NP 200:  $0.64 \pm 0.43$ ,  $p < 0.05$ ). En ambos tratamientos se observó aumento significativo en la liberación de las hormonas GnRH (Control:  $0.92 \pm 0.14$ , NP 100:  $3.68 \pm 0.71$ , NP 200:  $4.22 \pm 0.7$ ,  $p < 0.01$ ), FSH (Control:  $92.87 \pm 2.65$ , NP 100:  $111.12 \pm 1.4$ , NP 200:  $120.65 \pm 5.6$ ,  $p < 0.01$ ) y LH (Control:  $160.22 \pm 8.03$ , NP 100:  $260.0 \pm 34.93$ , NP 200:  $304.0 \pm 39.82$ ,  $p < 0.01$ ). El análisis histológico mostró una marcada disminución del epitelio germinal y persistencia de células germinales inmaduras presentes en la luz de los túbulos seminíferos. La exposición crónica a NP provoca una inhibición del eje reproductor masculino manifestada por el descenso de testosterona, acompañada por una pérdida de estructura histológica testicular. Esto llevaría a una disminución del control inhibitorio sobre la regulación neuroendocrina, con el consiguiente aumento de la liberación de GnRH y LH y FSH observadas.

**351. (98) EFECTO DEL SÍNDROME METABÓLICO SOBRE LAS ARRITMIAS DE REPERFUSIÓN Y EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO, PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN.**

Diez E.<sup>1</sup>; Renna N.<sup>2</sup>; Prado N.<sup>1</sup>; Lembo C.<sup>4</sup>; Ponce Zumino A.<sup>1</sup>; Miatello R.<sup>2</sup>

Área Fisiología Normal Facultad de Ciencias Médicas UNCuyo; IMBECU-CONICET<sup>1</sup>; IMBECU-CONICET<sup>2</sup>  
 emiradiez@gmail.com

El síndrome metabólico (SM) y la hipertensión arterial aumentan el riesgo de muerte súbita. El poscondicionamiento isquémico (PCI) es una estrategia cardioprotectora contra las arritmias de reperfusión. El objetivo fue determinar el efecto de estas patologías sobre la respuesta antiarrítmica del PCI en corazones aislados de ratas. Se indujo SM en ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) e hipertensas (SHR) por adición de fructosa al agua de bebida (10% p/v) (FFR y FFHR, respectivamente). Se determinaron los niveles de estrés oxidativo (EO) y marcadores inflamatorios. Los corazones aislados fueron sometidos a 15 min de isquemia regional. Al momento de la reperfusión se dividieron al azar en 8 grupos: 1) WKY ( $n = 13$ ); 2) WKY-PCI ( $n = 13$ ); 3) FFR ( $n = 11$ ); 4) FFR-PCI ( $n = 10$ ); 5) SHR ( $n = 13$ ); 6) SHR-PCI ( $n = 13$ ); 7) FFHR ( $n = 10$ ) y 8) FFHR-PCI ( $n = 10$ ). El PCI consistió en 3 ciclos de 30 s de reperfusión y 30 s de isquemia regional. Se evaluaron las arritmias en el ECG. La mayoría de los corazones desarrollaron taquicardia ventricular o fibrilación al inicio de la reperfusión (WKY 76,5%, FFR 85,5%, SHR 92%, FFHR 100%; ns). Luego de la maniobra de PCI estas arritmias se redujeron al 69% WKY v 31% WKY-PCI; 81% FFR v 30% FFR-PCI; 77% SHR v 31% SHR-PCI (todos  $p < 0,05$  analizado por  $\chi^2$ ) excepto en las ratas FFHR (70% FFR v FFHR-PCI 60%, ns). Los modelos patológicos presentan un aumento en los niveles de EO e inflamación (Tabla 1). El mantenimiento del efecto antiarrítmico del PCI en ratas con SM

o con hipertensión es un resultado prometedor. Sin embargo, el estrés oxidativo y la inflamación presente en el SM inducido en la hipertensión parece interferir con los mecanismos endógenos de protección. Tabla 1

Variable	WKY	FFR	SHR	FFHR
NADP(H)oxidasa (cpm/mg)	15,5 ± 3.3	66 ± 5*	154 ± 10*^	306 ± 30*^#
TBARS (mmol/L)	45 ± 3.3	108 ± 7*	98 ± 3.8*	160 ± 9*^#
PCRus (mg/dL)	1,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1*	4,0 ± 0,2*	5,8 ± 0,1*^#
INF-gamma (UA)	10 ± 1	46 ± 2.6*	45 ± 2*	57 ± 2*^#

\*p<0,05 v WKY; ^ p<0,05 v FFR; # p<0,05 v SHR y FFR por ANOVA

### 352. (432) CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MORBIMORTALIDAD MATERNO FETAL DE PACIENTES QUE PRESENTARON FEOCROMOCITOMA DURANTE EL EMBARAZO.

Salazar J.<sup>1,2</sup>; Levin G.<sup>1</sup>; Sansó G.<sup>1</sup>; Barontini M.<sup>1</sup>  
CEDIE-CONICET- Htal. de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez<sup>2</sup>;  
Htal. San Juan de Dios-Ramos Mejía<sup>2</sup>  
jorgeluismh@hotmail.com

El feocromocitoma (feo) es una causa infrecuente de hipertensión arterial (HTA) en el embarazo (emb); sin embargo, es el tumor adrenal más reportado durante la gestación. Se ha establecido su asociación con altas tasas de morbilidad fetal y materna, más aún en casos no identificados antes del parto. El objetivo de este trabajo fue caracterizar, tras un análisis retrospectivo, las variables clínicas y la morbilidad en un grupo de 13 pacientes afectadas por feo en el emb (edad 19-40 años, mediana 26). En todas, el cuadro clínico por hipersecreción de catecolaminas (CA) se manifestó durante la gestación; no obstante, la confirmación diagnóstica por dosaje de CA o sus metabolitos urinarios fue efectuada en tiempos diversos: durante el emb en 5/13 casos, puerperio en 3/13 o hasta varios años postparto en 5/13. La adrenalina se encontró aumentada (8.9-140ug/24h) en 9/13 pacientes, noradrenalina (102-284ug/24h) en 12/13 y ácido vanililmandélico (17-70 ug/24h) 12/13. Presentaron HTA 12/13 pacientes, de forma permanente (2/12), paroxística (6/12), o ambas (5/12). Los principales síntomas fueron: cefalea (11/13), diaforesis (10/13) y palpitaciones (8/13). Todas las pacientes diagnosticadas durante el emb terminaron la gestación por cesárea. En un caso se efectuaron cesárea y resección del feo simultáneamente, en otro el feo se resecó a las 12s de emb, con cesárea a las 38s. En el resto, el tratamiento quirúrgico se programó en tiempos variables post-parto (3/8) o post-cesárea (5/8). La mortalidad materna fue 1/13 y la fetal 1/13, tratándose de pacientes diferentes. En 4/13 pacientes se realizó el estudio genético hallándose mutaciones del proto-oncogen RET en 3/4 y del gen VHL en 1/4. Sólo 1/4 hijos presentó la mutación materna. En conclusión, pensar en feo durante el emb, y efectuar una prueba que confirme exceso de CA, pueden conducir al diagnóstico y tratamiento oportuno de una condición que, de otro modo, tendría un impacto ominoso en la salud maternofetal.

### 353. (446) ELEVADA EXPRESIÓN DE OCT 3/4 EN CÉLULAS GERMINALES (CG) DE PACIENTES CON DESORDENES DE DIFERENCIACIÓN SEXUAL (DSD) Y CON SÍNDROME DE INSENSIBILIDAD A LOS ANDRÓGENOS

Berensztein E.<sup>1,2</sup>; Costanzo M.<sup>2</sup>; Warman M.<sup>2</sup>; Ciaccio M.<sup>2</sup>; Vaiani E.<sup>2</sup>; Guercio G.<sup>2</sup>; Marino R.<sup>2</sup>; Saraco N.<sup>2</sup>; Baquedano S.<sup>2</sup>; Ramirez P.<sup>2</sup>; Perez Garrido N.<sup>2</sup>; Galeano J.<sup>2</sup>; Ponzio R.<sup>3</sup>; Davila M.<sup>4</sup>; Bailez M.<sup>5</sup>; Rivarola M.<sup>2</sup>; Belgorosky A.<sup>2</sup>  
Laboratorio de Cultivo Celular y Biología Molecular; Instituto de Investigaciones en Reproducción Facultad de Medicina UBA<sup>1</sup>; Servicio de Endocrinología Htal de Pediatría Garrahan<sup>2</sup>; Instituto de Investigaciones en Reproducción Facultad de Medicina Uba<sup>3</sup>; Servicio de Patología Htal de Pediatría Garrahan<sup>4</sup>; Servicio de Cirugía Htal de Pediatría Garrahan<sup>5</sup>; Servicio de Endocrinología Htal de Pediatría Garrahan<sup>2</sup>  
esperanzabb2004@yahoo.com.ar

El factor de transcripción OCT-3/4 de célula pluripotencial tiene un rol en la sobrevivencia de células germinales (CG) embrionarias. OCT-3/4 está presente en carcinoma in situ (CIS) y gonadoblastoma. El objetivo fue describir la expresión de OCT3/4 en gónadas humanas disgenéticas de distintas etiologías y de síndrome de insensibilidad a los andrógenos (CAIS) durante la prepubertad (PP) o la pubertad temprana (PUB). Se estudiaron diez pacientes DSD divididos en 5 Grupos (Gr) Gr1 (n=3): disgenesia testicular 46, XY con mutación en gen SF-1 (NR5A1). 1a: PUB (148 meses, m) con mutación heterocigota Y183X, 1b: PP (18m) con mutación heterocigota compuesta W279X / g3314-3317delTCTC (IVS 4 + 8), 1c: PP (33m) con mutación heterocigota pG146A asociada a mutación heterocigota de novo IVS1-2G> en gen StAR. Gr2 (n=1) PP 46, XY con disgenesia testicular sin mutación detectada (10m) Gr3 (n=2): PP 46, XX con ovotestis, 3a 21 m, 3b 34 m Gr4 (n=2); disgenesia gonadal mixta, 4a: PP (4m) 46, XY/45, X, 4b: PUB (144m) 46, XY Gr5 (n=2), CAIS, 5a: PP, 53 m, 5b: PP 15 m Como control se utilizaron 28 testículos PP y 5 PUB (GrC) Se contó el número de tubulos seminíferos con GC OCT3/4 positivas y se expreso como porcentaje de todos los tubulos seminíferos con GC. Se estudio expresión de MAGE-A4 (marcador de espermatogonia madura), receptor Andrógeno (AR), Aromatasa (ARO), ER $\alpha$  y ER $\beta$ . En todos los pacientes DSD de Grs 2 a 5 se observo fuerte expresión de OCT3/4 (rango 18-67%) en CG. En pacientes DSD Gr1 no se observo expresión de OCT3/4, igual que en GrC. En todos los Grs y GrC, excepto Gr3 se observó expresión de MAGE A4. No hubo correlación entre expresión de OCT3/4 y de AR, ARO, ER $\alpha$  y ER $\beta$ . Proponemos que la presencia de mutaciones génicas de SF1 podría proteger a GC de desarrollar CIS y que la expresión de OCT3/4 en CG de pacientes CAIS PP sugiere que la gonadectomía tardía en edad PU podría representar un riesgo.

### 354. (611) EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA PRL SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS DE CÉLULAS ADENOhipofisarias Y SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL PRLR DURANTE EL CICLO ESTRAL

Ferraris M.<sup>1</sup>; Radl D.<sup>1</sup>; Boti V.<sup>1</sup>; Seilicovich A.<sup>1</sup>; Goffin V.<sup>2</sup>; Pisera D.<sup>1</sup>  
Idir, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>; Inserm U 845 Faculte de Medicine Necker<sup>2</sup>; mferraris@fmed.uba.ar

La adenohipofisis (ADH) sufre un constante recambio celular. Durante el estro ocurre la mayor tasa de mitosis, mientras que en el proestro se observa la mayor tasa de apoptosis. En la tarde del proestro se produce un aumento de la secreción adenohipofisaria de prolactina (PRL) inducido por los altos niveles de estrógenos. Ratonos deficientes en el receptor de PRL (PRLR) desarrollan adenomas pituitarios, lo que sugiere que esta hormona podría estar involucrada en el control de la población de células adenohipofisarias. Existen varias isoformas del PRLR, las cuales difieren en su porción intracelular. Nuestra hipótesis es que la PRL participa en los procesos de renovación celular en la ADH que ocurren en cada ciclo estral, regulando la proliferación y/o apoptosis. Con el objeto de evaluar estas acciones estudiamos las tasas de apoptosis y proliferación adenohipofisarias de ratones de cepa salvaje (WT) y ratones transgénicos que expresan de manera constitutiva un antagonista del PRLR, (del 1-9) (TG). Además, evaluamos el efecto de del 1-9 sobre la expresión adenohipofisaria de las isoformas del PRLR y sus variaciones a lo largo del ciclo estral. El peso de la ADH no presentó variaciones significativas entre ratones WT y TG tanto macho como hembras. En machos, la proliferación (evaluada por incorporación de BrdU) fue mayor en TG que en WT (WT 0.013%, TG 0.19% p<0.05  $\chi^2$ ), mientras que en hembras, la proliferación fue mayor en WT (WT 1.28%, TG 0.57% p<0.05  $\chi^2$ ). Estas observaciones sugieren la participación de la PRL en la renovación celular adenohipofisaria. La expresión adenohipofisaria del PRLR a lo largo del ciclo estral fue evaluada en hembras WT y TG por PCR en tiempo real. Las hembras TG presentaron alteraciones del ciclo con diestros prolongados. Observamos diferencias en la expresión de las isoformas del PRLR tanto a lo largo del ciclo como entre las hembras TG y las WT, lo que sugiere que la misma PRL puede modular la expresión de PRLR en la adenohipofisis.

### TRANSDUCCION DE SEÑALES 3

#### 355. (475) UN NUEVO ROL DEL SISTEMA ANGIOTENSINÉRGICO: SU PARTICIPACIÓN EN LA INVOLUCIÓN MAMARIA POST-LACTANCIA.

Nahmod K.<sup>1</sup>; Cambados N.<sup>2</sup>; Meiss R.<sup>3</sup>; Simian M.<sup>4</sup>; Raffo D.<sup>4</sup>; Alvarez C.<sup>5</sup>; Geffner J.<sup>5</sup>; Kordon E.<sup>2</sup>; Schere Levy C.<sup>2</sup> *Sección Inmunología Academia Nacional de Medicina*<sup>1</sup>; *LEGMA, IFIBYNE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA*<sup>2</sup>; *Sección Patología. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires*<sup>3</sup>; *Área de Investigación. Instituto de Oncología Angel H Roffo*<sup>4</sup>; *Sección Inmunología, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires*<sup>5</sup>  
karennahmod@hotmail.com

El sistema angiotensinérgico (RAS) se expresa en todos los tejidos del organismo, cumpliendo una multiplicidad de funciones biológicas. Hasta el momento, se desconocía el rol del RAS en la glándula mamaria (GM). La GM atraviesa ciclos de proliferación, diferenciación y apoptosis. La involución mamaria (IM) es un proceso por el cual la GM lactante readquiere las características morfológicas de la glándula virgen y se caracteriza por apoptosis masiva del epitelio acompañada de intenso remodelado tisular. Previamente reportamos que angiotensina II (AII) induce activación de STAT3 en el epitelio mamario *in vivo* y que dicha activación se correlaciona con un incremento en la apoptosis. Demostramos además que losartán, un antagonista del R-AT1, induce un retardo en la IM. En el presente trabajo intentamos dilucidar el mecanismo subyacente al retardo en la IM inducido por el tratamiento con losartán en ratones de la cepa Balb-c. Mediante qRT-PCR, estudiamos si existe una cinética de expresión de los componentes del RAS en distintos estadios de desarrollo de la GM. Observamos que durante la IM existe un incremento significativo en la expresión de la enzima convertidora de angiotensina, los receptores AT1 y AT2 y el angiotensinógeno. Mediante microscopía confocal, definimos la localización tisular de dichos componentes. Estudiamos luego el impacto del bloqueo del R-AT1 sobre la IM. Para ello administramos losartán por vía sistémica a hembras en fase de IM. Demostramos que losartán indujo: a) un aumento significativo en los niveles de pAKT, b) una disminución del porcentaje de células epiteliales apoptóticas (48±5 vs 18±6, p<0.01 n=3, vehículo vs losartán), c) una marcada inhibición en la actividad de metaloproteasas 9 y 2, y d) una disminución en el depósito de fibras de colágeno y reticulina en la matriz extracelular de la GM. Estos resultados sugieren que el RAS se activa durante la fase de IM y que AII cumpliría un rol relevante en dicho estadio.

#### 356. (404) LA ANGIOTENSINA-(1-7) INDUCE LA INTERNALIZACIÓN DEL RECEPTOR MAS

Gironacci M.<sup>1</sup>; Corradi G.<sup>1</sup>; Adamo H.<sup>1</sup> *IQUIFIB-CONICET, Dpto. Qca. Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*<sup>1</sup>  
mgironacci@yahoo.com.ar

La unión del agonista al receptor acoplado a proteína G (RAPG) no sólo provoca su activación sino que también desencadena eventos celulares que conducen a una rápida atenuación de la respuesta, llamado desensibilización, con la consecuente endocitosis del receptor (R). Una vez internalizado, el R puede ser reciclado a la membrana plasmática, permanecer internalizado o ser direccionado a los lisosomas para su degradación. El RAPG Mas media importantes respuestas cardiovasculares. La estimulación continua con Ang-(1-7), el ligando del R Mas, produce una disminución en la respuesta. Nuestra hipótesis es que el receptor Mas se desensibiliza e internaliza frente a la estimulación por su ligando Ang-(1-7). Para comprobarlo, células HEK293T fueron transfectadas con el plásmido que contiene la construcción que codifica para la quimera R Mas fusionado a la proteína fluorescente YFP a través de su extremo C-terminal, y se evaluó la internalización y tráfico del R por colocalización con diferentes efectores que participan en la endocitosis y tráfico de R. La microscopía confocal demostró que las células expresaron la quimera Mas-YFP en la membrana plasmática. Se evaluó la

funcionalidad del R Mas-YFP través de a) ensayos de unión ligando-R, donde se observó que tanto la Ang-(1-7) como el antagonista del R desplazaron la unión de <sup>125</sup>I-Ang-(1-7) a las células (IC50: 8.6±5.0 x10<sup>-8</sup> M y 8.3±2.8.10<sup>-9</sup> M), y b) de la liberación de <sup>3</sup>H-ácido araquidónico (<sup>3</sup>H-AA), el cual aumentó en presencia de Ang-(1-7) 100 nM (208±15% respecto del control, P<0.05). Para investigar la internalización del R Mas-YFP, se evaluó la endocitosis de <sup>125</sup>I-Ang-(1-7) unida al R, la cual fue de 23±5 % a los 10 min. El R Mas-YFP colocalizó con: AP-2, un componente esencial de la endocitosis por cubiertas de clatrina; antígeno de endosomas temprano y Rab 5, marcadores de endosomas temprano; y Rab 11, marcador de vesículas de reciclado lento a membrana plasmática. Por el contrario, no colocalizó con Rab4, marcador de vesículas de reciclado rápido a membrana plasmática. Nuestros resultados demuestran que el R Mas-YFP es endocitado por cubiertas de clatrina, de allí es dirigido a los endosomas temprano, siendo luego reciclado a la membrana plasmática. Este mecanismo explicaría la desensibilización de la respuesta que se produce frente a la estimulación persistente o con altas concentraciones de Ang-(1-7).

#### 357. (57) LA INMUNOFILINA FKBP52 ESTIMULA LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-KAPPAB

Erlejman A.<sup>1</sup>; Molinari A.<sup>1</sup>; Mazaira G.<sup>1</sup>; Vecchione M.<sup>1</sup>; Galigniana M.<sup>1</sup> *Departamento de Química Biológica FCEN UBA*<sup>1</sup>  
erlejman@qb.fcen.uba.ar

El factor de transcripción NF-κB (RelA/p50) participa en la regulación de genes involucrados en la inflamación, la diferenciación y la muerte celular. Su activación es mediada por la fosforilación del inhibidor IκB mediante la quinasa IKK, y luego transloca al núcleo. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la inmunofilina (INM) de alto peso molecular FKBP51 (FK506-binding protein 51) inhibe la actividad transcripcional de NF-κB. Las INMs FKBP51 y FKBP52 participan en el retrotransporte de receptores de esteroides regulando su actividad transcripcional de forma mutuamente excluyente. El objetivo de este trabajo fue estudiar a FKBP52 como posible modulador de la actividad transcripcional de NFκB. Utilizando proteínas purificadas, demostramos que GST-FKBP52 coimmunoprecipita con HA-RelA, sugiriendo que ambas proteínas pueden formar complejos. Luego se evaluó por ensayos de EMSA la capacidad de unión de NF-κB al DNA inducida por el éster de forbol PMA; y se observó que mientras FKBP52 incrementó tal propiedad, FKBP51 la inhibió. Se transfectaron células HEK-293T con un gen de reporte cuyo promotor responde a NF-κB, y se cuantificó la respuesta transcripcional en presencia de cantidades crecientes de FKBP52 (0,1-3 µg). FKBP52 estimuló la actividad de luciferasa de forma concentración-dependiente, incrementando hasta 8 veces la activación inducida por PMA. Este efecto fue abolido tanto en células HEK-293 que sobreexpresan de manera estable a FKBP51, como en células HEK-293 convencionales cotransfectadas con ambas INMs. Estos resultados sugieren que ambas INMs estarían actuando en forma contrapuesta. Por último, se estudió la cinética de translocación nuclear de NF-κB por IFI, observándose que FKBP52 aumenta el tiempo de permanencia de NF-κB en el núcleo. Concluimos que FKBP52 actúa estimulando la actividad transcripcional de NF-κB. Especulamos este efecto de FKBP52 podría tener lugar tanto a nivel de la translocación de NF-κB y/o en su sitio promotor

#### 358a. (300) LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CANAL DE CL-, CFTR, POR ALTAS DOSIS DE IL-1BETA, EN CÉLULAS CACO2, ESTARÍA MEDIADA POR LA ACTIVIDAD DE JNK.

Pagano E.<sup>1</sup>; Valdivieso A.<sup>1</sup>; Clazure M.<sup>1</sup>; Massip Copiz M.<sup>1</sup>; Sanchez F.<sup>1</sup>; Taminelli G.<sup>1</sup>; Schulman G.<sup>1</sup>; Teiber M.<sup>1</sup>; Santa Coloma T.<sup>1</sup> *Programa de Investigaciones Biomédicas. UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina*<sup>1</sup> www.uca.edu.ar/pib ; pib@uca.edu.ar

El CFTR es el gen involucrado en la fibrosis quística (FQ). Codifica un canal de Cl-. Trabajos previos de este laboratorio



demonstraron que el tratamiento de células T84 con interleuquina-1 beta (IL-1 $\beta$  0.50 ng/ml) incrementa la expresión del CFTR mientras que dosis más altas ( $\leq 2.5$  ng/ml) la inhiben. El aumento de la expresión está mediado por la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Dado que la IL-1 $\beta$  resulta elevada en el esputo de pacientes FQ, el objetivo de este trabajo es estudiar el mecanismo en la fase inhibitoria. Se estimularon células CaCo-2 con IL-1 $\beta$  (0, 1 y, 2,5 ng/ml) por 4 hs y luego se determinó la expresión relativa del mRNA de CFTR, por Real Time PCR. La misma se incrementó en respuesta a 1 ng/ml de IL-1 $\beta$  (1,5  $\pm$ 0,03 veces con respecto al control,  $p < 0.001$ ) y disminuyó 0,6  $\pm$ 0,03 veces con respecto al control ( $p < 0.001$ , a 2,5 ng/ml de IL-1 $\beta$ ). Para determinar si esta fase de la curva ocurre vía JUN, se trató las células por 1 hora con el inhibidor específico de la quinasa de JUN, SP600125, a distintas concentraciones (0, 5, 10 y 20  $\mu$ M) y, luego con IL-1 $\beta$ , a baja y alta dosis. La expresión de CFTR, determinada por Real Time PCR, en presencia del inhibidor SP600125 (5  $\mu$ M) no sólo no disminuye a 2,5 ng/ml de IL-1 $\beta$  sino que aumenta casi 4 veces con respecto al control ( $p < 0.001$ ). Los resultados obtenidos apoyan la participación de la vía de JNK en la fase inhibitoria de la acción de IL-1 $\beta$  sobre la expresión del CFTR. Actualmente se encuentra en estudio la participación de las vías de las quinasas, MAPK y p38, utilizando sus respectivos inhibidores, U0126 y SB203580, así como la expresión de JUN y FOS. Agradecimientos: Subsidios ANPyCT (PICT 00628) y CONICET (PIP 11220080102551). Becas CONICET (AGV, MMC) y UCA (GLT).

### 358b. (64) PÉRDIDA DE FUNCIÓN DEL RECEPTOR P2X7 POR HETEROMERIZACIÓN CON LA VARIANTE POLIMÓRFICA GLN460ARG

Aprile García F.<sup>1</sup>; Liberman A.<sup>1</sup>; Senin S.<sup>1</sup>; Paez-pereda M.<sup>2</sup>; Stadler H.<sup>3</sup>; Acuña M.<sup>1</sup>; Gerez J.<sup>1</sup>; Hoijman E.<sup>4</sup>; Refojo D.<sup>5</sup>; Mitkovski M.<sup>6</sup>; Panhuysen M.<sup>2</sup>; Sillaber I.<sup>2</sup>; Stühmer W.<sup>6</sup>; Holsboer F.<sup>5</sup>; Arzt E.<sup>1,5</sup>  
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET, Argentina<sup>1</sup>; Affectis Pharmaceuticals, Martinsried, Alemania.<sup>2</sup>; Affectis Pharmaceuticals, Martinsried, Alemania; Stage Cell Therapeutics, Göttingen, Germany<sup>3</sup>; Centro de Microscopías Avanzadas, FCEN, UBA<sup>4</sup>; Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania.<sup>5</sup> faprire@fbmc.fcen.uba.ar

Los receptores P2X7 son canales de calcio cuyas subunidades se asocian en la membrana celular como homotrímeros. Distintos estudios genéticos demostraron una asociación significativa entre la presencia de depresión y desorden bipolar en pacientes psiquiátricos y una variante polimórfica del gen P2X7, que modifica el aminoácido 460 (Gln460Arg). En un trabajo anterior demostramos que la variante polimórfica de P2X7 Gln460Arg disminuye la función del receptor (ingreso de calcio extracelular y la activación de la MAPK ERK 1/2) únicamente cuando es coexpresada con la variante normal, mientras que la simple expresión de ambas variantes por separado no modifica su fenotipo. Este trabajo tiene el objetivo de estudiar en profundidad el mecanismo de los cambios que produce la variante polimórfica de P2X7. La disminución en la entrada de calcio y en la activación de ERK 1/2 en células coexpresoras fue revertida mediante el silenciamiento de P2X7-WT o P2X7-Gln460Arg empleando siRNAs específicos que permiten discriminar la mutación, recuperándose en ambos casos la función normal observada en los clones en los cuales solo se expresa una de las dos variantes. La especificidad de dicho silenciamiento fue confirmada mediante real time-PCR cuantitativa, con primers diseñados para diferenciar entre ambas variantes de P2X7. Observamos la interacción física entre las subunidades, WT y mutante, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación (en clones coexpresores de P2X7-WT-STREP y P2X7-Gln460Arg-HIS, para diferenciar ambas proteínas) y FRET (empleando las variantes de P2X7 fusionadas a las proteínas fluorescentes Cerulean y Venus). Estos resultados demuestran la interacción de las formas mutada y normal, y la estricta dependencia de la presencia de ambas para que se produzca el fenotipo de alteración de la función del receptor P2X7 por heterocigosis.

## ONCOLOGÍA 6

### 359. (102) BÚSQUEDA DE PROPIEDADES ANTINEOPLÁSICAS EN EXTRACTOS DE PLANTAS AUTÓCTONAS ARGENTINAS

Mamone L.<sup>1</sup>; Casas A.<sup>1</sup>; Rodriguez L.<sup>1</sup>; Gandara L.<sup>1</sup>; Batlle A.<sup>1</sup>; Di Venosa G.<sup>1</sup>  
CIPYP CONICET<sup>1</sup>  
leandro\_mamone@hotmail.com

Existen antineoplásicos de origen natural, como enzimas, hormonas, antibióticos y alcaloides, lo que muestra la importancia de las especies vegetales como fuente de sustancias farmacológicas para tratamientos del cáncer; sólo el 15% de las plantas fueron investigadas con este fin. El objetivo de este trabajo fue investigar una colección de extractos de plantas autóctonas y evaluar sus propiedades curativas *per se*. Se realizaron 71 extracciones metanólicas y acuosas, evaluadas en LM2, línea de adenocarcinoma mamario murino. Para ello, las células se incubaron 24 h con diferentes concentraciones de cada extracto determinando luego la viabilidad celular. Resultaron citotóxicos, 8 extractos metanólicos: *Lochroma australe* hoja, *Jacarandá mimosifolia* flor, *Solanum verbascifolium* flor, *Collaea argentina* hoja, *Solanum chacoensis* hoja, *Solanum sisymbriifolium* flor, *Solanum amygdalifolium* flor e *Ipomoea bonariensis* flor; los que luego se testearon en un panel de líneas celulares: HB4a (epitelio luminal normal de mama humana), PAM212 (queratinocitos murinos transformados), B16-E10 (melanoma humano), A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) y MB49 (carcinoma transicional de vejiga humana). *S. chacoensis*, fue el más citotóxico, mostrando una concentración inhibitoria del 50% (CI<sub>50</sub>) de 0,005 mg/ml para MB49; 0,01 mg/ml para LM2, HB4a y A549; 0,017 mg/ml para PAM212 y 0,02 mg/ml para B16-E10. El orden de citotoxicidad creciente fue: *S. chacoensis* > *S. sisymbriifolium* > *S. amygdalifolium* > *J. mimosifolia* > *I. australe* > *I. bonariensis* > *S. verbascifolium* > *C. argentina*. Sin embargo, la citotoxicidad intrínseca de cada extracto analizado, varía considerablemente con el tipo celular. Los extractos que resultaron más citotóxicos pertenecen a plantas productoras de alcaloides. Resultados preliminares de aislamiento indicarían que éste sería el principio activo. Proximamente, se testeará la toxicidad y el potencial antineoplásico de las fracciones enriquecidas en alcaloides en animales experimentales.

### 360. (329) HO-1 CO-REGULA LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES A TRAVÉS DE SU INTERACCIÓN CON STAT3 EN CÁNCER DE PRÓSTATA.

Elguero M.<sup>1</sup>; Gueron G.<sup>1</sup>; Colluccio-leskow F.<sup>2</sup>; Ferrando M.<sup>1</sup>; Salles A.<sup>1</sup>; De Siervi A.<sup>1</sup>; Vazquez E.<sup>1</sup>  
Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.<sup>1</sup>; Laboratorio de Biofísica Molecular, Centro Multidisciplinario1, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.<sup>2</sup>; belguero@qb.fcen.uba.ar

El estrés oxidativo que se genera como resultado de la inflamación crónica lleva a alteraciones de estructuras y funciones celulares, y se ha propuesto como precursor de lesiones neoplásicas que conducen al Cáncer de Próstata (PCa). Hemo-oxigenasa 1 (HO-1) es una proteína citoprotectora y antiinflamatoria que ha sido detectada en numerosos tumores. Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado la localización nuclear de HO-1 en células de PCa y en carcinomas primarios de próstata. El objetivo de este trabajo fue identificar los interactores de HO-1 para dilucidar su función nuclear. Mediante microscopía confocal, determinamos la colocalización de HO-1 con el receptor de andrógenos (AR) en células LNCaP tratadas con andrógenos y hemina (inductor de HO-1). Además, comprobamos por técnicas de co-inmunoprecipitación que HO-1 se asocia al factor de transcripción STAT3 en células LNCaP. Dado que HO-1 se asocia con estos factores de transcripción, se realizó ChIP para evaluar la capacidad de HO-1 de interactuar con promotores de genes involucrados en la progresión del PCa. Estos estudios demostraron que luego de la estimulación con andrógenos, HO-1 se asocia a los promotores de PSA, MMP9 y uPA. Además, utilizando genes reporteros, determinamos que HO-1 disminuye

la inducción de la actividad de promotor de PSA provocada por andrógenos. Estos resultados muestran por primera vez que HO-1 juega un rol en la co-regulación de la expresión génica en PCa. La comprensión de estos mecanismos podría permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer.

**361. (416) PAPEL DEL RECEPTOR H4 A HISTAMINA EN MELANOMA MALIGNO. PATRÓN DE EXPRESIÓN EN BIOPSIAS HUMANAS NÉVICAS Y CON DIAGNÓSTICO DE MELANOMA.**

Massari N.<sup>1</sup>; Medina V.<sup>1,2</sup>; Croci M.<sup>3</sup>; Martinel Lamas D.<sup>1</sup>; Bergoc R.<sup>1,2</sup>; Rivera E.<sup>1</sup>

Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1</sup>; CONICET<sup>2</sup>; Instituto de Inmunología<sup>3</sup>; nmassari@fby.uba.ar

El melanoma maligno es un tumor derivado de los melanocitos, caracterizado por una alta capacidad invasiva y altamente resistente a las terapias convencionales. Hemos reportado que la histamina actúa como un mediador en la regulación de la proliferación tanto de tejidos normales como neoplásicos, cuya síntesis es regulada por la enzima histidina decarboxilasa (HDC), (EC 4.1.1.22). Se ha reportado alto contenido de histamina y la presencia de los receptores H1, H2 y H3 en diversas células de melanoma. Recientemente hemos demostrado la expresión del receptor H4 (RH4) en dos líneas celulares de melanoma humano con diferentes grados de malignidad (WM35 y M1/15). A través de la activación de este receptor, la histamina disminuye la proliferación y aumenta la senescencia y diferenciación celular. En este trabajo nos propusimos investigar por inmunohistoquímica la presencia del RH4 tanto en nevos como en biopsias humanas con diagnóstico de melanoma maligno, y su posible correlación con el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), el contenido de histamina y los niveles de expresión de la HDC. Los resultados demuestran la presencia del RH4 en el 42% (8/19) de los melanomas y en el 83% (15/18) de los nevos, siendo el nivel de expresión mayor en estos últimos (\*p=0,0107, Mann Whitney's Test de dos colas). Además se observó expresión de PCNA como marcador de proliferación activa únicamente en los melanomas, el cual mostró correlación inversa con la expresión del H4R (\*p= 0,0158; Spearman  $r = -0,54$ ). Tanto el contenido endógeno de histamina como el de HDC fueron significativamente mayores en las muestras de melanoma maligno (\*p=0,0001; \*p=0,0308 respectivamente, Mann Whitney's Test de dos colas). Los hallazgos presentados sugieren que el RH4 puede estar implicado en la regulación del crecimiento y progresión del melanoma, representando un potencial blanco molecular para la terapéutica de este tipo de neoplasia.

**362. (554) IMPLICANCIA DE PKC ALFA Y PKC DELTA EN EL EFECTO DE LOS RETINOIDES SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA DISEMINACIÓN METASTÁSICA DE UN ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO.**

Berardi D.<sup>1</sup>; Díaz Bessone M.<sup>1</sup>; Campodónico P.<sup>1</sup>; Motter A.<sup>1</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>1</sup>; Urtreger A.<sup>1</sup>; Todaro L.<sup>1</sup>

Instituto de Oncología Angel H. Roffo<sup>1</sup>  
dami\_fceyn@hotmail.com

Los retinoides ejercen algunos de sus efectos sobre la diferenciación celular y reversión del fenotipo maligno a través de interacciones de sus receptores (RAR) con isoformas de PKC. Previamente demostramos que *in vitro* el retinoide ATRA induce retardo del crecimiento en la línea tumoral mamaria murina LM3 asociado a una modulación y redistribución de las PKCa y d. Nos proponemos analizar la interacción entre los RARs y las PKC y estudiar si las isoformas a y d de PKC influyen sobre el efecto de los retinoides en la progresión tumoral de la línea LM3. Por western blot (WB) demostramos que la inhibición farmacológica (Rottlerina) de PKCd, redujo la traslocación al núcleo del receptor RARa1 inducida por ATRA (1uM, 24h). En cambio la inhibición farmacológica de PKCa (Gö6976) no afectó dicha traslocación. Asimismo detectamos que PKCd y RARa1 co-inmunoprecipitan luego del tratamiento con ATRA. Por otro lado, analizamos la respuesta al tratamiento con ATRA sobre el crecimiento y la diseminación

metastásica *in vivo* cuando LM3 sobre-expresa PKCa o d. Estas sublíneas modificadas genéticamente fueron inoculadas ortotópicamente en ratones BALB/c. Cuando los tumores fueron palpables se comenzó el tratamiento con ATRA mediante pellets (10mg/ratón). Observamos que los tumores que sobreexpresan PKCa son más invasivos y metastásicos que aquellos que sobre-expresan PKCd (pd<sup>0</sup>.05). Sorprendentemente, sólo LM3-PKCa respondió al tratamiento con ATRA inhibiendo tanto el crecimiento del tumor primario como las metástasis en pulmón (55; 20-75 control vs 16; 0-27 ATRA, Md;rango, pd<sup>0</sup>.05). Similar a lo observado *in vivo* sólo la línea LM3-PKCa respondió con inhibición de crecimiento al tratamiento *in vitro* con ATRA. Conclusión: PKCd interaccionaría directamente con RARa induciendo su traslocación al núcleo como respuesta al tratamiento retinoide. Los tumores LM3-PKCa presentan mayor malignidad que LM3-PKCd, pero revierten su fenotipo maligno frente al tratamiento retinoide *in vivo*.

**363. (310) NUEVOS APORTES AL ESTUDIO DE LA FENOMENOLOGÍA DE CRECIMIENTO DE COLONIAS DE CÉLULAS TRANSFORMADAS**

Huergo M.<sup>1</sup>; Pasquale M.<sup>1</sup>; González P.<sup>2</sup>; Bolzán A.<sup>1</sup>; Arvia A.<sup>1</sup>  
INIFTA<sup>1</sup>; Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas UNLP; Fundación Favalaro<sup>2</sup>; mac.huergo@gmail.com

La formación y crecimiento de tumores en mamíferos es un proceso complejo que depende de la proliferación de células en el tejido de origen y en los tejidos circundantes. La búsqueda de los mecanismos que rigen el crecimiento de tumores ha sido generalmente enfocada a partir del análisis de los cambios moleculares a nivel celular, en tanto que la dinámica del proceso de crecimiento ha sido poco estudiada. Dado que las colonias celulares exhiben contornos de tipo fractal, es posible interpretar su crecimiento a partir de modelos estadísticos ampliamente utilizados en el desarrollo de fases materiales. Estos modelos se basan en el estudio de la desviación estándar de la altura o radio de la colonia, también conocida como la "rugosidad" de la colonia, en función del tiempo de crecimiento y del tamaño del frente de la colonia. En el presente trabajo se muestran los resultados obtenidos para el crecimiento de colonias de células Vero y HeLa. Las colonias fueron fotografiadas cada 24 horas para seguir su crecimiento. A partir del procesamiento de las imágenes microscópicas obtenidas se determinaron la velocidad media de expansión de la colonia, su rugosidad y dimensión fractal y la variación de la morfología de las células con el tiempo. Los resultados obtenidos muestran que las colonias crecen con velocidad lineal y la rugosidad de su contorno aumenta con el tiempo y el tamaño de la colonia siguiendo una ley de potencias. De las relaciones experimentales entre la rugosidad del contorno de la colonia con el tiempo de crecimiento y con su tamaño, se obtuvieron los parámetros característicos esperados para un mecanismo de crecimiento donde la expansión de la colonia está gobernada por tres factores: i) la duplicación celular al azar; ii) la tensión superficial de la colonia que tiende a reorganizar y compactar el contorno; iii) el crecimiento lateral del contorno por aparición o deformación de células aumentando la ramificación de la colonia.

**364. (644) REGULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GATA3 MEDIADA POR PROGESTÁGENOS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

Izzo F.<sup>1</sup>; Díaz Flaqué M.<sup>1</sup>; Beguelin W.<sup>1</sup>; Vicario R.<sup>1</sup>; Rivas M.<sup>1</sup>; Tkach M.<sup>1</sup>; Schillaci R.<sup>1</sup>; Proietti C.<sup>1</sup>; Elizalde P.<sup>1</sup>  
Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1</sup>  
izzo@dna.uba.ar

Existen evidencias clínicas y experimentales que indican una asociación entre la progesterona y el receptor de progesterona (RP) con la tumorigénesis mamaria. Los efectos biológicos de la progesterona están mediados por el RP, miembro de la familia de receptores nucleares con actividad de factor de transcripción. El RP posee dos isoformas (A y B), la isoforma B posee mayor peso molecular y es un transactivador más potente que la isoforma A. Numerosos reportes que muestran bajos niveles de expresión del factor de transcripción GATA3 asociados con un

mayor grado histológico, mayor volumen tumoral, ausencia de expresión del receptor de estrógenos (RE) y ausencia del RP en tumores humanos. En base a estas evidencias decidimos investigar la interacción de las vías del RP y de GATA3 mediada por progestágenos en células tumorales mamarias. Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo es que existe una interacción entre las vías de señalización del RP y GATA3 en células tumorales mamarias. Los experimentos se realizaron en células de cáncer de mama humano T47D y en cultivos primarios de células C4HD provenientes de un tumor mamario murino progestágeno-dependiente. Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA), produce una disminución en los niveles de expresión de GATA3 en ambos tipos celulares. Mediante ensayos de PCR reversa cuantitativa, demostramos que el MPA disminuye los niveles de ARNm de GATA3, indicando que la regulación ocurre a nivel transcripcional. Los efectos del MPA fueron bloqueados por el antagonista de progestágenos RU486. Finalmente, en la línea tumoral mamaria humana T47D-YB que expresa sólo la isoforma B del RP, el tratamiento con MPA también produjo una disminución en los niveles proteicos de GATA3. En conclusión, la activación del RP por MPA reduce los niveles de ARNm y de proteína de GATA3, y la presencia de la isoforma B del RP es suficiente para que ocurra esta regulación.

## GASTROENTEROLOGIA 2 Y PROLIFERACION Y MUERTE CELULAR 2

### 365. (28) LA ENFERMEDAD GRASA DEL HIGADO SE ASOCIA CON UN DESBALANCE DE LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE LOS GENES QUE REGULAN LA ARQUITECTURA MITOCONDRIAL (FIS1/DNM1L/OPA1)

Burqueño A.<sup>1</sup>; Rosselli M.<sup>2</sup>; Pirola C.<sup>1</sup>; Sookoian S.<sup>2</sup>  
Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas. Instituto de Investigaciones Médicas IDIM - CONICET<sup>1</sup>; Laboratorio de Hepatología Clínica y Molecular. Instituto de Investigaciones Médicas IDIM - CONICET<sup>2</sup>  
adriburque@gmail.com

La regulación de la morfología de las mitocondrias depende de un proceso coordinado entre proteínas de fusión (OPA1) y fisión (FIS1 y DNM1L), la cual resulta un factor crítico para la función de las mismas y la fisiología celular. En la etiopatogenia de la enfermedad grasa del hígado de etiología no alcohólica (NAFLD) las mitocondrias juegan un papel primordial. Existe conocimiento acerca de cambios morfológicos asociados con la NAFLD (megamitocondrias), sin embargo no se conoce con certeza el impacto de la lipotoxicidad hepática sobre la maquinaria molecular de fisión/ fusión, motivo por el cual se realiza el presente trabajo. Métodos: se usaron 15 ratas Sprague-Dawley macho sometidas a dieta grasa la cual indujo exitosamente NAFLD y 10 ratas alimentadas con dieta estándar. Evaluamos la interacción entre la expresión del mRNA de las proteínas mencionadas con la expresión de genes apoptóticos (*BAX/BCL2*, caspasa 3), de la biogénesis mitocondrial (*Tfam*, *PGC1 $\alpha$*  y  $\beta$ , *NRF1*) y factores de transcripción de la cascada de los PPARs (*PPAR $\alpha$* ,  $\delta$  y  $\gamma$ ). La expresión hepática del mRNA se evaluó mediante PCR en tiempo real. Resultados: la expresión de *FIS1* correlacionó en forma inversa con el contenido hepático de triglicéridos ( $R=-0.45$ ,  $p=0.004$ ), peso del tejido adiposo ( $R=-0.30$ ,  $p=0.03$ ), peso del hígado ( $R=-0.33$ ,  $p=0.02$ ), y *PPAR $\alpha$* -mRNA ( $R=-0.37$ ,  $p=0.01$ ); en forma positiva con el *PPAR $\gamma$* -mRNA ( $R=0.44$ ,  $p=0.001$ ), *Tfam* ( $R=0.36$ ,  $p=0.04$ ) y *NRF1* ( $r=0.51$ ,  $p=0.04$ ); los niveles de expresión de *FIS1* y *OPA1* se correlacionaron significativamente ( $R=0.50$ ,  $p=0.04$ ). El *DNM1L*-mRNA correlacionó significativamente con *BAX/BCL2* ( $R=0.31$ ,  $p=0.03$ ), *PGC1 $\beta$*  ( $R=0.45$ ,  $p=0.04$ ) y *PPAR $\gamma$*  ( $R=0.37$ ,  $p=0.04$ ) mRNAs. Conclusiones: la lipotoxicidad hepática parecería asociarse a un desbalance en la expresión de las proteínas de la maquinaria molecular que coordina la morfología de las mitocondrias y la expresión hepática de *DNM1L* podría participar en la iniciación del proceso de apoptosis modulando *BAX/BCL2*.

### 366. (159) CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y ESTRUCTURAL DE CÉLULAS TRONCALES/PROGENITORAS HEPÁTICAS

Torres Fuenzalida J.<sup>1</sup>; Castronuovo C.<sup>1</sup>; Parada L.<sup>2</sup>; Lorenti A.<sup>1,3</sup>  
Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1, 2</sup>; Instituto de Patología Experimental, Universidad Nacional de Salta.<sup>2</sup>; Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires; Unidad de Traducción Clínica - Ingeniería de Tejidos, Universidad Austral<sup>3</sup>  
jose.torresfuenzalida@gmail.com

El hígado posee una gran capacidad regenerativa. Frente a un daño extenso o reiterado la regeneración se produce por células troncales/progenitoras hepáticas (LSPC). Originadas durante la embriogénesis hepática, las LSPC mantienen su potencialidad durante toda la vida adulta del individuo. Se caracterizan por su alta capacidad proliferativa y de diferenciación a hepatocitos y a colangiocitos. Expresan una variedad de marcadores, algunos compartidos con células hematopoyéticas. El objetivo de este trabajo fue estudiar las características fenotípicas y estructurales que definen a las LSPC de hígado fetal. Hígados de fetos de ratones C57BL/6 de 14.5 dpc. fueron digeridos con colagenasa. Las células Ep-CAM+ fueron aisladas mediante separación magnética (MACS). El 17% de las células totales correspondió a la sub-población EpCAM+. Por citometría de flujo se encontraron dos sub-poblaciones: una con menor tamaño donde predominan células EpCAM+ (69%) y otra donde prevalecen las células E-Cadherina+ (66%). Las células EpCAM+ co-expresaron Thy-1, Citoqueratina 19 (CK19) y Alfafetoproteína (AFP). Por PCR en tiempo real se observó que la expresión relativa (a GAPDH) de CK19 y Claudina3 en las células EpCAM+ fue 33 y 117 veces superior respectivamente, a las EpCAM-. La expresión relativa de AFP y Dlk-1 fue 2 y 5 veces superior, respectivamente, en la sub-población EpCAM+. Las células EpCAM+ presentaron en su núcleo, una distribución espacial característica de secuencias repetitivas pericentroméricas. Por inmunofluorescencia para histona H3 acetilada (K14, K23) e H3 metilada en (K9) se observó que las células EpCAM+ no poseen un patrón localizado en el estado global de las estructuras cromatínicas observadas. Los resultados indican que las células EpCAM+ presentan un patrón de expresión de genes característico, que se correlaciona con una organización nuclear particular que sería responsable de sus características troncales y la plasticidad fenotípica que se les atribuye a las LSCP.

### 367. (163) INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 2 (MRP2) INTESTINAL POR ENTEROGLUCAGON TIPO 2 (GLP-2). MEDIACIÓN DEL AMPC

Villanueva S.<sup>1</sup>; Arias A.<sup>1</sup>; Rigalli J.<sup>1</sup>; Ruiz M.<sup>1</sup>; Perdomo V.<sup>1</sup>; Catania V.<sup>1</sup>; Mottino A.<sup>1</sup>  
Instituto de Fisiología Experimental IFISE CONICET<sup>1</sup>  
villanueva@ifise-conicet.gov.ar

GLP-2 promueve el crecimiento y reduce la muerte celular de la mucosa intestinal y aumenta la absorción de nutrientes. Previamente observamos una inducción de la expresión (proteína y ARNm) del transportador apical de xenobióticos conjugados Mrp2 en yeyuno de rata en respuesta al tratamiento con GLP-2, constituyendo un aumento de la barrera química intestinal. En el presente trabajo evaluamos la participación de AMPc en dicha inducción. Para ello, se estudió el efecto de GLP-2 (25  $\mu$ g/100 g peso corporal por día, durante 5 días consecutivos, s.c.) sobre la producción de AMPc (inmunoensayo) y la expresión proteica de Mrp2 (*western blotting*) en yeyuno de ratas Wistar hembras ( $n=4$ ), en presencia o ausencia de 2',3'-dideoxiadenosina (DDA, 30  $\mu$ g/día/100 g peso corporal, i.p., 10 min antes de GLP-2), un inhibidor de adenilato ciclasa. Como resultado GLP-2 promovió un aumento significativo de los niveles de AMPc (161%) y de Mrp2 (75%) respecto de ratas controles (C) ( $p<0.05$ ), lo que fue suprimido por el co-tratamiento con DDA. Mediante el aislamiento de enterocitos se observó además que dichos incrementos de

AMPc y Mrp2 se producen no sólo en enterocitos de la punta de la vellosidad (182% y 136% respecto de C,  $p < 0.01$ ) sino también de la región media (121% y 68% respecto de C,  $p < 0.05$ ), donde la expresión constitutiva de Mrp2 es normalmente baja. Una mediación directa del AMPc fue evaluada *in vitro* mediante el tratamiento de células Caco-2 (modelo de enterocitos) con el análogo dibutiril-AMPc (500  $\mu$ M, 48hs); observándose un aumento significativo de Mrp2 (proteína: 77%; ARNm: 80%) respecto de controles ( $p < 0.05$ ,  $n=4$ ), y una supresión de tal efecto por H89, inhibidor de proteína quinasa A (PKA). **Conclusión:** AMPc media la modulación positiva de Mrp2 por GLP-2, tanto en la punta como en la zona media de la vellosidad, sugiriendo un aumento del área de protección por Mrp2 contra la injuria química por xenobióticos. PKA podría intervenir en estos efectos cascada abajo de AMPc.

**368. (789) LOS TRANSPORTADORES ASOCIADOS A PROTEÍNAS DE RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MRPS) MEDIAN EL EFLUJO DE AMPC EN ACINOS PANCREÁTICOS AISLADOS EN PRESENCIA DE SECRETINA (S) Y FACTOR NATRIURETICO ATRIAL (ANF)**

Rodríguez M.<sup>1</sup>; Díez F.<sup>1</sup>; Ventimiglia M.<sup>1</sup>; Morales V.<sup>1</sup>; Copel S.<sup>1</sup>; Vatta M.<sup>1</sup>; Davio C.<sup>1</sup>; Bianciotti L.<sup>1</sup>  
*Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1</sup>*  
*lbianciotti@hotmail.com*

Previamente mostramos que la desensibilización de la respuesta secretora de S por ANF en páncreas era en parte por egreso de AMPc. Profundizamos estos estudios y evaluamos otros secretagogos y la participación de MRPs. Acinos pancreáticos aislados de rata se incubaron midiéndose AMPc en tejidos (T) y líquidos de incubación (L) (pg/mg proteínas). (\* $p < 0.001$ ). El agonista del receptor NPR-C (ANP 4-23 amida) mimetizó la respuesta de ANF, es decir S incrementó el AMPc en T e indujo su salida extracelular, pero el agonista potenció el egreso ( $8.9 \pm 0.7$  vs  $22.4 \pm 1.6^*$ ). Inhibidores de PLC y PKC inhibieron la respuesta de ANF y del agonista de NRP-C. Al estudiar la cinética de producción y egreso de AMPc por 30 min con S el agonista de NRP-C, como ANF, incrementó AMPc en T alcanzando el máximo a los 3 min declinando a valor control a los 5 min mientras que en L el AMPc incrementó antes que con S sola alcanzando un valor mayor. La producción de AMPc por S en presencia de ANF o el agonista fue 60% menor que con S. El patrón cinético fue similar con o sin IBMX (inhibidor de fosfodiesterasas). Secretagogos como isoproterenol o antamina (agonista H2) incrementaron AMPc en T pero no en L. VIP incrementó AMPc en T y en L igual que S, siendo su salida potenciada por ANF ( $7.5 \pm 0.4$  vs  $14.2 \pm 1.2^*$ ). El egreso de AMPc inducido por VIP o VIP mas ANF fue inhibido por probenecid (inhibidor de MRPs). La cinética de producción y egreso de AMPc con VIP y ANF fue similar a la observada con S y ANF. Por PCR en tiempo real se detectó en acinos pancreáticos la expresión de MRP-4, MRP-5 y MRP-8 y por western blot la expresión de MRP-4. Los resultados muestran que secretagogos que provocan importantes incrementos de AMPc favorecen la salida del nucleótido a través de MRP-4 y que este proceso es favorecido por ANF a través del receptor NPR-C acoplado a la vía PLC/PKC. El ANF contribuiría así a regular los niveles intracelulares de AMPc en células acinares pancreáticas.

**369. (315) BRCA1 REGULA LA TRANSCRIPCIÓN DE ATAXIA TELANGIECTASIA MUTADA (ATM) EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA.**

Moiola C.<sup>1</sup>; De Luca P.<sup>1</sup>; Cotignola J.<sup>1</sup>; Vazquez E.<sup>1</sup>; De Siervi A.<sup>1</sup>  
*Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA<sup>1</sup>*  
*cmoiola@qb.fcen.uba.ar*

La acumulación de alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores, así como la disfunción de aquellos de respuesta al daño en el ADN (DDR), son características de la carcinogénesis y factores importantes en la patogénesis de tumores malignos.

ATM es una quinasa que participa principalmente en la DDR y el control del ciclo celular mediante la activación por fosforilación de diversas proteínas. En próstata los polimorfismos de ATM se consideran un factor de riesgo para contraer cáncer y este riesgo se ve incrementado en individuos portadores de mutaciones en BRCA1. Debido al rol de ATM en la progresión del PCa, nuestro objetivo fue estudiar su regulación transcripcional en líneas tumorales de próstata. Mediante ensayos de ChIP-scanning, genes reporteros y RT-qPCR, demostramos que BRCA1 participa en la regulación transcripcional de ATM. Identificamos que BRCA1 se asocia al promotor de ATM y su sobre-expresión conduce a un aumento en la actividad transcripcional y en los niveles del ARNm de este gen. Utilizando un plásmido de expresión de BRCA1 con el dominio C-terminal (BRCT) mutado, comprobamos la pérdida de esta regulación indicando la importancia del mismo en dicho mecanismo. Mediante análisis por Western blot encontramos que BRCA1 induce la expresión de ATM y su función, detectada por el incremento en el estado de fosforilación de la histona 2 (H2AX). Debido a que es ampliamente conocido que ATM fosforila a BRCA1, investigamos si la transcripción de ATM es mediada por un mecanismo regulatorio que involucra a estas dos proteínas. Utilizando un inhibidor de la actividad quinasa de ATM (KU-55933), observamos que en presencia de BRCA1 existe una disminución de la actividad transcripcional del promotor, sugiriendo que la regulación de estas proteínas podría ser a través de un "loop" regulatorio. Estos resultados ponen de manifiesto el rol fundamental de BRCA1 como regulador de la transcripción y su papel clave en el mantenimiento de la homeostasis celular.

**370. (400) POTENCIAL EFECTO RADIOPROTECTOR DEL COMPUESTO JNJ777120, UN ANTAGONISTA DEL RECEPTOR H4 A HISTAMINA**

Medina V.<sup>1</sup>; Martinel Lamas D.<sup>1</sup>; Prestifilippo J.<sup>2</sup>; Croci M.<sup>3</sup>; Carabajal E.<sup>1</sup>; Bergoc R.<sup>1</sup>; Elverdin J.<sup>2</sup>; Rivera E.<sup>1</sup>  
*Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; CONICET<sup>1</sup>; Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA<sup>3</sup>; Instituto de Inmunooncología, Buenos Aires<sup>3</sup>*  
*vmedina@ffyb.uba.ar*

La radioterapia de tumores de cabeza y cuello produce efectos secundarios severos por disfunción de las glándulas salivales. De igual forma, intestino y médula ósea (MO) son órganos muy radiosensibles, que pueden verse afectados durante los tratamientos con radiación ionizante (RI). Previamente demostramos que la histamina protege a la glándula submandibular (GSM), el intestino delgado y la MO frente al daño producido por RI. El objetivo de este estudio fue investigar si el compuesto JNJ777120 (JNJ) tiene un efecto radioprotector similar a la histamina. Para ello, 48 ratas fueron divididas en 4 grupos; grupos JNJ y JNJ-irradiado recibieron JNJ (10 mg/kg.día, sc) desde 24 h antes de la irradiación. Los grupos irradiados recibieron una dosis de 5 Gy (fuente de <sup>137</sup>Cs) en cuerpo entero y fueron sacrificados 3 o 30 días después. 3 días post-irradiación se determinó la secreción salival inducida por metacolina o los animales se sacrificaron y la GSM, el intestino delgado y la MO, se fijaron y colorearon con H&E para evaluar las características histológicas. Se analizaron marcadores de proliferación y apoptosis por inmunohistoquímica. Los resultados indican que el JNJ redujo el grado de aplasia en MO y previno el reemplazo por tejido adiposo preservando los componentes medulares. Además, el JNJ disminuyó la atrofia de la mucosa intestinal, el edema y conservó el número de criptas después de la irradiación ( $240 \pm 8$  vs  $165 \pm 10$  en ratas no tratadas e irradiadas,  $P < 0.01$ ). Finalmente, el JNJ revirtió completamente la disminución de la salivación en la GSM, conservando la masa glandular con apariencia normal y disminuyendo la apoptosis de las células acinares y ductales (células apoptóticas por campo  $19.0 \pm 3.8$  vs  $106.0 \pm 12.0$  en ratas no tratadas e irradiadas,  $P < 0.01$ ) y aumentando la proliferación celular. Podemos concluir que el antagonista JNJ previene los daños inducidos por la RI en MO, intestino delgado y GSM, exhibiendo un potencial uso clínico en pacientes tratados con RI.

### 371. (612) ALTERACIÓN DE LA DINÁMICA MITOCONDRIAL EN UN MODELO DE PARKINSONISMO INDUCIDO POR MANGANESO.

Alaimo A.<sup>1</sup>; Gorojod R.<sup>1</sup>; Sapienza C.<sup>1</sup>; Kotler M.<sup>1</sup>  
Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso,<sup>1</sup>  
agusalaimo@gmail.com

El Manganismo es un desorden neurológico que tiene su origen en la exposición crónica a Mn y presenta características clínicas y vías de señales similares al Parkinson Idiopático. Este metal se acumula en el SNC, particularmente en las mitocondrias de los astrocitos. Las mitocondrias son organelas dinámicas que se fusionan y fisianan constantemente. El balance de estos procesos está alterado en ciertas enfermedades neurodegenerativas y está regulado por OPA1, una GTPasa de fusión que promueve la formación de redes mitocondriales y cuyo clivaje induce fragmentación mitocondrial. *Objetivo:* Estudiar la implicancia de la vía mitocondrial en la apoptosis inducida por MnCl<sub>2</sub> en células de astrocitoma C6. *Resultados:* Empleando MitoTracker Red y microscopia de fluorescencia se estableció una clasificación de morfologías mitocondriales: filamentosas, intermedias, y fragmentadas. El Mn induce disminución (62%, p<0.001) de mitocondrias filamentosas y aumento de las intermedias (93%, p<0.001) y fragmentadas (67%, p<0.001). Mediante W. Blot hemos demostrado que el Mn produce clivaje de OPA1. Además, dado que el Mn genera ROS (77±4%) e induce la apertura del poro de transición mitocondrial (PTP) con disipación del potencial de membrana, se estudió el efecto de la preincUBación con CsA (inhibidor de PTP). La CsA incrementó un 80% (p<0.01) las mitocondrias filamentosas, disminuyó las intermedias (30%, p<0.05) y fragmentadas (55%, p<0.01) y previno el procesamiento de OPA1 en un 30% (p<0.05). El rol de OPA1 fue corroborado mediante sobreexpresión de OPA1 WT y Q297V (una mutante de ganancia de función). En ambos casos se observó disminución de la muerte celular (30% y 40%, p<0.001), del número de núcleos apoptóticos (20%, p<0.01), y de mitocondrias filamentosas (23%, p<0.01) y del clivaje de OPA1. *Conclusión:* el desbalance de los eventos de fusión y fisión participaría en el desencadenamiento del parkinsonismo inducido por Mn, donde OPA1 se comporta como una proteína antiapoptótica

### 372. (622) PARTICIPACION DE LA VIA LISOSOMAL-AUTOFAGICA EN LA INJURIA CELULAR INDUCIDA POR MANGANESO

Gorojod R.<sup>1</sup>; Alaimo A.<sup>1</sup>; Sapienza C.<sup>1</sup>; Kotler M.<sup>1</sup>  
Laboratorio de Apoptosis en el Sistema Nervioso<sup>1</sup>  
rgorojod@qb.fcen.uba.ar

El manganismo es un trastorno neurológico causado por exposición laboral a altos niveles de Manganeseo (Mn), que presenta síntomas semejantes la enfermedad de Parkinson. Dado que la disfunción autofágica y la acumulación de agregados proteicos constituyen eventos descriptos en distintos desórdenes neurodegenerativos, resulta relevante el estudio de la integridad de la vía autofágica/lisosomal en la muerte celular inducida por este metal. Los ensayos se realizaron a distintos tiempos, tanto en presencia como en ausencia de suero en células de astrocitoma C6. El ensayo de retención de rojo neutro, un colorante vital que se acumula en los lisosomas, mostró un aumento a las 6hs de incUBación con Mn 750 µM en ausencia de suero (45±4%, p<0,001). Con el fin de evaluar una posible inducción de autofagia, las células fueron teñidas con el compuesto fluorescente MDC observándose un aumento en el tamaño de las vacuolas en presencia de Mn. Por lo tanto, se realizaron preincUBaciones con inhibidores de vías descriptas en la activación de la autofagia, wortmanina 100nM y PD98059 25µM, logrando ambos evitar el aumento en la retención de rojo neutro (10±4%, p>0,05). Para estudiar si los cambios mencionados se debían a la disfunción lisosomal, se realizó una tinción con LysoTracker red y se estudió la distribución de tamaños de estas organelas. Se observó un aumento en el número de células con lisosomas hinchados luego de la incUBación con Mn. Se realizaron luego preincUBaciones con Bafilomicina A1 0,1nM con el fin de bloquear la acidificación lisosomal y Pepstatina A 25µM para inhibir a la cathepsina D, una proteasa muy relacionada

con procesos de muerte. Ambos previnieron el aumento en la retención de rojo neutro a 6hs. Efectos similares pero retrasados en el tiempo (24hs) se observan en presencia de suero. Nuestros resultados sugieren un rol del compartimento autofágico/lisosomal en la toxicidad inducida por Mn y establecen un nuevo nexo entre el manganismo y la enfermedad de Parkinson.

## FISIOLOGÍA 2

### 373 (45) METABOLISMO REDOX HEPATICO EN UN MODELO DE DESNUTRICION ARMONICA.

Lezón C.<sup>1</sup>; Ojea A.<sup>1</sup>; De La Cal C.<sup>1</sup>; Oliveira A.<sup>1</sup>; Elverdín J.<sup>1</sup>; Tasat D.<sup>2</sup>; Boyer P.<sup>1</sup>

Cátedra de Fisiología Facultad de Odontología UBA<sup>1</sup>; Laboratorio de Biología Celular del Pulmón, Escuela de Ciencia y Tecnología, UNSAM<sup>2</sup>; pboyer@fisiio.odon.uba.ar

En estudios realizados en nuestro laboratorio observamos una disminución de la aptitud mecánica ósea en ratas con enanismo por desnutrición (ED), modelo que recrea una entidad clínica en niños con déficit de peso y talla para la edad, con una relación peso/talla normal. Si bien hay evidencia de que la disfunción hepática tiene consecuencias negativas sobre la resistencia mecánica ósea, existen resultados controvertidos relativos a la fisiopatología hepática en diferentes tipos de malnutrición calórico-proteica. Se evaluó el metabolismo redox en hígado de ratas ED para estimar el daño celular como posible causal de disminución de la competencia biomecánica ósea. Ratas macho de destete se dividieron en grupos: control (C) y ED. C recibió una dieta para roedores *ad libitum*; ED recibió un 80% de la misma dieta que C/100 g de peso corporal, durante 4 semanas. Luego los animales fueron sacrificados y se extrajeron fémures e hígados. Los huesos se estudiaron morfométrica y biomecánicamente, mediante un test de flexión a tres puntos determinándose la resistencia a la fractura (Wf), carga elástica límite (Wy) y rigidez (Wy/dy) óseas. En hígado se determinaron: lipoperoxidación (TBARS, pmol/mg), actividades de superóxido dismutasa (SOD, Usod/mg) y catalasa (CAT, pmol/mg) y capacidad antioxidante total (TRAP, trolox). Resultados: En fémur, Wf, Wy y Wy/dy de ED vs C fueron 51.44±2.88 vs 22.82±2.55; 41.60±3.90 vs 19.60±2.55; 93.92±5.60 vs 41.20±6.38, respectivamente (p<0.01), confirmando estudios previos. En hígado, TBARS, SOD, CAT y TRAP de ED vs C fueron 62.22±4.31 vs 89.97±8.50 (p<0.001); 2.49±0.19 vs 1.75±0.09 (p<0.05); 13.21±0.89 vs 10.54±0.79 (p<0.001); 24.78±2.80 vs 24.28±2.35 (p>0.05), respectivamente. Los resultados sugieren que el estrés oxidativo hepático observado en ratas ED podría ser responsable, al menos en parte, de alteraciones de la función y del metabolismo hepático con repercusiones negativas sobre el metabolismo óseo y su competencia mecánica. UBACyT O004.

### 374. (157) ESTUDIO DE LA MICRO Y MACROARQUITECTURA DE HUESOS LARGOS DE RATAS INMADURAS NORMOXICAS E HIPOXICAS INTOXICADAS CON ALUMINIO EN CORRELACIÓN CON SUS PROPIEDADES ESTRUCTURALES Y MATERIALES

Dmytrenko G.<sup>1</sup>; Conti M.<sup>1</sup>; Mandalunis P.<sup>2</sup>; Bozzini C.<sup>1</sup>; Terrizzi A.<sup>5</sup>; Martinez M.<sup>1</sup>

Catedra de Fisiología Facultad de Odontología UBA<sup>1</sup>; Catedra de Histología Facultad de Odontología UBA.<sup>2</sup>; miconti@fisiio.odon.uba.ar

Hemos demostrado que la intoxicación crónica de ratas SD inmaduras inyectadas con 27 mg de Aluminio elemental (Al) por Kg durante 3 meses 3 v/ sem así como la exposición a hipoxia hipobárica (HX) producen deterioro de la competencia biomecánica ósea disminuyendo la capacidad para soportar cargas frente a la deformación. Con el objetivo de investigar cuales son los parámetros dimensionales que podrían contribuir con tales cambios, se evaluaron las medidas antropométricas, morfométricas e histomorfométricas de huesos largos en relación con la eficiencia biomecánica de los mismos. En nuestro modelo experimental observamos una disminución de la longitud y del peso de los huesos

largos de animales mantenidos en HX. También se vió un deterioro de la masa ósea en el corte transversal de los fémures en el grupo AIHX. En condiciones normóxicas, AI produjo un aumento del área cortical, a pesar de la disminución de la competencia biomecánica. No hubo cambios en el área total del corte entre los grupos. El estudio microscópico del hueso subcondral de las tibias mostró una disminución de la masa ósea trabecular en el grupo HX, efecto que fue exacerbado por la intoxicación por AI. Al correlacionar la masa ósea micro y macroscópica de los huesos largos con la competencia biomecánica observamos que un aumento de la cantidad del material no significa un mayor rendimiento biomecánico estructural, probablemente debido a diferencias microestructurales. Los datos fueron procesados estadísticamente mediante ANOVA utilizando el software Prism v 3.0 Como los grupos experimentales mostraron una disminución significativa de las propiedades biomecánicas con respecto al control sin presentar diferencias significativas entre sí, se concluye que el aumento del momento de inercia podría explicar la adaptación geométrica del material para conservar la integridad del hueso durante las funciones fisiológicas del mismo. UBACyT O407

**375. (250) RELACIÓN DE LA AQP1 CON UN CANAL IÓNICO Y UN TRANSPORTADOR DE UN SOLUTO NO-IÓNICO EN LA HOMEOSTASIS CELULAR**

Politi T.<sup>1</sup>; Ozu M.<sup>2</sup>; Galizia L.<sup>3</sup>; Corti H.<sup>4</sup>; Kotsias B.<sup>3</sup>; Dorr R.<sup>2</sup>; Toriano R.<sup>1</sup>

Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>; Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, UBA<sup>2</sup>; Laboratorio de Neurofisiología, Idim Dr Alfredo Lanari<sup>3</sup>; Inquimae, Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA<sup>4</sup>  
teresapoliti@yahoo.com.ar

La acuaporina 1 (AQP1) es el canal para agua mejor estudiado desde el punto de vista estructural. Sin embargo aún es poca la información que existe en cuanto a la interacción de AQP1 con otras proteínas transmembrana, en relación a la homeostasis celular de agua y solutos. Su expresión en endotelio y en células del músculo liso, tejidos que no manejan grandes volúmenes acuosos, abre el interrogante del rol fisiológico de la misma en estas células. Ha sido reportado recientemente que AQP1 sería capaz de transportar NO. A su vez y en las mismas células endoteliales el canal de sodio ENaC parece estar relacionado con la liberación del NO. Para abordar estos interrogantes utilizamos un modelo con ambas proteínas co-inyectadas en el ovocito de *Xenopus laevis*. Por otra parte y en el marco del mismo interrogante, estudiamos la AQP1 co-inyectada con TRET1, una proteína transportadora de trehalosa, un disacárido potencialmente útil como crioprotector celular, que previene la agregación proteica en enfermedades como la de Huntington. En la naturaleza, el TRET1 co-exprea con un análogo de AQP1 en un insecto anhidrobiótico. El ARNc se obtuvo a partir de plásmidos contruidos con el inserto codificante para la proteína de interés: TRET1, la proteína de fusión TRET-GFP y ENaC (rendimientos: 1,86 µg/µl; 0,8 µg/µl; 1,5 µg/µl, respectivamente), que luego inyectamos en los ovocitos en estadio VI (H" 1,3 mm de diámetro). Nuestros resultados de microscopía de fluorescencia muestran la expresión de TRET-GFP en la membrana del ovocito. Por otra parte, experimentos funcionales mostrarían la influencia de TRET1 en el comportamiento osmótico del sistema a tiempos largos (t ≤ 500 s, con un aumento de volumen cercano al 5%). En el caso del ENaC observamos que, si bien la expresión de esta proteína altera las propiedades eléctricas del ovocito, no parece modificar sus propiedades osmóticas, permitiendo entonces elucidar la influencia de AQP1 en el modelo de ovocitos co-inyectados.

**376. (282) CARACTERÍSTICAS DEL ESTADO HIPERSECRETORIO DE ERITROPOYETINA INDUCIDO POR 19-NORTESTOSTERONA EN EL RATON ORQUIDECTOMIZADO.**

Martinez P.<sup>1</sup>; Conti M.<sup>2</sup>; Barcelo A.<sup>3</sup>; Alippi R.<sup>4</sup>; Bozzini C.<sup>5</sup>  
Catedra de Fisiología Facultad de Odontología UBA<sup>1</sup>  
pilarmartinez@fisis.odon.Uba.ar

Hemos demostrado que la 19-nortestosterona (nandrolona, N) induce un estado hipersecretorio de eritropoyetina (EPO-HS) en el ratón orquidectomizado en relación con su componente androgénico. El objetivo de la investigación presente fue analizar las características de ese efecto, mediante determinación de relación dosis-respuesta y duración. El EPO-HS fue estimado mediante determinación de la secreción de EPO en respuesta a la exposición a 506 Torr durante 6 h. Ratones CF#1 fueron castrados a la edad de 30 d e inyectados 3 veces por semana durante 30 d con N un mes más tarde, en dosis de 0, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 o 3200 µg/d. Ratones machos enteros fueron considerados como controles. Los animales fueron hipertransfundidos 4 d después de finalizado el régimen de tratamiento y expuestos a hipoxia 1 d más tarde. EPO en plasma fue determinada mediante ELISA. Los efectos renotrófico y androgénico fueron determinados mediante determinación del peso de riñón y vesículas seminales. Correlación positiva significativa se observó entre ambos pesos y la secreción hipóxica de EPO. Esta mostró relación lineal con el log de la dosis. La dosis umbral para la inducción de EPO-HS fue 1600 µg. El mismo proceso fue repetido 11 veces entre los 4 y 95 d desde la finalización del período de administración de N. La dosis de N utilizada fue 2000 µg/d. El efecto inductor se observó hasta los 67 d post-tratamiento, no siendo detectado durante el día 95. CONCLUSIONES: nandrolona, administrada en dosis farmacológicas a ratones orquidectomizados, induce la aparición de un EPO-HS, con un umbral de 1600 µg, que muestra una duración mínima de 67 d, concordante con los efectos renotrófico y androgénico. Proyecto UBACYT O-005.

**377. (297) INTERACCIÓN FUNCIONAL ENTRE LA AQP2 (ACUAPORINA 2) Y EL TRPV4 (RECEPTOR POTENCIAL VANILLOID 4) EN CÉLULAS RENALES**

Galizia L.<sup>1</sup>; Fernandez J.<sup>1</sup>; Rivarola V.<sup>1</sup>; Capurro C.<sup>1</sup>; Ford P.<sup>1</sup>;  
Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>  
pford@fmed.uba.ar

En los túbulos colectores (TC) del riñón de mamífero la presencia de gradientes osmóticos y la acción de la hormona antidiurética inducen una importante reabsorción de agua desde la luz al intersticio. Lo cual implica cambios en el volumen celular y en la activación de mecanismos de regulación de volumen. Nuestros trabajos previos mostraron en células de TC sometidas a un shock hipotónico, que la presencia de la AQP2 en la membrana apical es fundamental para producir un aumento de calcio intracelular, necesario para una rápida activación de los mecanismos de regulación de volumen (RVD). El aumento de calcio y el RVD son inhibidos por el rojo de rutenio y por gadolinio, ambos compuestos inhibidores del TRPV4. El objetivo de este trabajo fue investigar si existe algún tipo de interacción entre AQP2 y TRPV4 en respuesta a hipotonía. Para ello realizamos estudios moleculares (inmunofluorescencia) y funcionales (videomicroscopía de fluorescencia) para estudiar la localización y los cambios en la concentración de calcio y en el volumen celular en respuesta a hipotonía en 2 líneas celulares de túbulo colector de rata WT-RCCD, (no expresan AQP2) y AQP2-RCCD<sub>1</sub> (transfectadas con AQP2). Nuestros resultados mostraron que en condiciones de isotonia el TRPV4 se distribuye en el compartimiento intracelular en ambas líneas celulares. Sin embargo en condiciones hipotónicas el TRPV4 se transloca a la membrana celular sólo en las células que expresan AQP2. Al incUBAR estas células con colchicina se inhibió el aumento de calcio en respuesta a hipotonía y el RVD. Experimentos de inmunofluorescencia mostraron que la colchicina también inhibió la translocación de TRPV4 a la membrana. En presencia de HgCl<sub>2</sub>, un inhibidor de los canales de agua, la respuesta de calcio y la translocación del TRPV4 también se reducen. Los datos presentados sugieren una interacción funcional entre TRPV4 y AQP2 en la detección de la hipotonía y la activación de la respuesta regulatoria.

**378. (328) FLUJO DE AGUA A TRAVÉS DE LA AQUAPORINA-1 HUMANA: INHIBICIÓN POR FUROSEMIDA, Y FLUJO MÁXIMO CON GRADIENTES OSMÓTICOS ALTOS**

Ozu M.<sup>1</sup>; Dorr R.<sup>1</sup>; Teresa M. P.<sup>1</sup>; Toriano R.<sup>1</sup>

Laboratorio de Biomembranas, Dpto. de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires<sup>1</sup> mozu@fmed.uba.ar

La aquaporina-1 humana (hAQP1) es un canal de agua ampliamente expresado en diversos órganos, incluyendo riñón y endotelio vascular. El estudio de las aquaporinas (AQPs) está orientado actualmente a la comprensión de los mecanismos de regulación del canal y a la búsqueda de inhibidores alternativos al HgCl<sub>2</sub>. La técnica más común para el estudio de la funcionalidad de las AQPs implica el registro del cambio de volumen en ovocitos de *Xenopus laevis* cuando se los enfrenta a un gradiente osmótico. Sin embargo, la misma implica trabajar sin poder controlar el medio intracelular. La técnica del ovocito vaciado (EOO), desarrollada por nuestro grupo, implica el reemplazo del contenido citoplasmático del ovocito y por tanto el control de ambos medios. Esta técnica permite hacer estudios de permeabilidad bajo estrictas y controladas condiciones experimentales. Nuestros resultados demuestran la inhibición del canal por acción de la furosemida, y las consecuencias ocasionadas por la aplicación de gradientes bidireccionales. Mediciones de cambio de volumen celular, en presencia de gradientes anisotónicos de manitol y fuerza iónica constante, mostraron que, cuando los gradientes son mayores o iguales a 150 mM, la respuesta obtenida se desvía del comportamiento esperado de osmómetro perfecto, alcanzando un valor máximo de flujo. En cuanto a los estudios de inhibición, los resultados demuestran que la furosemida (10 µM) inhibe el flujo de agua a través de hAQP1 en un 60%, actuando sobre la cara citoplasmática de la proteína, mientras que el HgCl<sub>2</sub> (0,3 mM), un clásico inhibidor extracelular de los canales de agua, no tiene efecto sobre el lado intracelular. El conjunto de resultados obtenidos demuestra, además del novedoso aporte descrito en cuanto a inhibición y flujo máximo en hAQP1, que la técnica del ovocito vaciado puede complementar la técnica clásica aportando información que no es posible de ser estudiada sin el control de la composición del medio intracelular.

### 379. (614) EFECTOS DE LA TOXINA SHIGA 2 (STX2) SOBRE LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINAS EN CEREBRO Y RIÑÓN DE RATAS

Lucero M.<sup>1</sup>; Silberstein C.<sup>1</sup>

Laboratorio de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup> sole\_lucero@yahoo.com.ar

La *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (Stx) produce Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), causando insuficiencia renal aguda y crónica y daño a nivel del sistema nervioso central. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de las acuaporinas (AQP) en riñón y cerebro de ratas tratadas con Stx tipo 2. Para ello se desarrolló un modelo de SUH en ratas macho Sprague-Dawley (28 días) las cuales fueron inyectadas intraperitonealmente con sobredosado filtrado de *E. coli* recombinante que expresa Stx2 (sStx2: 1 ml/100 g peso, 10<sup>-4</sup> DC<sub>50</sub> en células Vero) o con sobredosado control que no expresa la toxina (sCtrl). Las ratas inoculadas con sStx2 presentaron edema hemorrágico en cerebro, necrosis tubular y glomerular renal, aumento de la creatinina y urea en suero y murieron entre las 48 y 96 hs. La expresión de AQP1 y AQP4 fue analizada por inmunofluorescencia (IF) y westernblot (WB). En ratas inoculadas con sStx2 se observó disminución de la IF para AQP4 en astrocitos de cerebro y cerebelo y disminución de la IF para AQP1 en el endotelio vascular y en la membrana apical de células epiteliales en los plexos coroideos. Estos resultados fueron corroborados por WB, observándose una disminución significativa (p<0,05) de la expresión de AQP1 y AQP4, normalizadas respecto de la expresión de beta-actina, en ratas con sStx2 respecto de las controles. En el riñón no se observaron diferencias significativas en la expresión de AQP1 y AQP4 en ratas tratadas con sStx2 con respecto a las controles. La disminución en la expresión de AQPs en el cerebro podría afectar el equilibrio hidrosalino y estaría relacionada con la presencia de cuadros convulsivos característicos en animales y pacientes con SUH.

### 380. (688) RECUPERACIÓN POST ESTRÉS DE LOS PARÁMETROS LIPÍDICOS Y LIPOPROTEICOS EN RATAS DE AMBOS SEXOS.

Scoppa H.<sup>1</sup>; Niebylski A.<sup>1</sup>; Bensi N.<sup>1</sup>; Binotti S.<sup>1</sup>; Bianco M.<sup>1</sup>; García M.<sup>1</sup>; Gauna H.<sup>1</sup>

Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>1</sup> hscoppa@exa.unrc.edu.ar

La presencia de estrés repetitivo del mismo tipo o la incapacidad para evitar respuestas exageradas cuando ya ha finalizado el estrés están relacionados con la carga alostática y su incremento puede hacer al individuo vulnerable a múltiples patologías. Objetivo: Evaluar en ratas de ambos sexos la capacidad de recuperación de los parámetros lipídicos y lipoproteicos luego de un estrés crónico. Se utilizaron ratas Wistar de ambos sexos, controles (C) y estresadas (E), expuestas a estrés por inmovilización (IMO) durante 60 días y sometidas a un período de recuperación post estrés de 45 días. Se extrajeron muestras de sangre a los 60 días de estrés y a los 7, 14, 30 y 45 días post estrés. Se determinó el colesterol total plasmático (CT), colesterol-LDL, colesterol-HDL, apolipoproteína B (apo-B) y triacilglicéridos (TAG) en todos los días de muestreo considerados. El estrés crónico aumentó los niveles de CT (p=0.0002), TAG (p=0.0001) y apo B (p=0.0002) en ratas de ambos sexos. El colesterol-HDL aumentó sólo en los machos (p=0.001) y el colesterol-LDL aumentó en respuesta al estrés en ambos sexos siendo los valores mayores en machos (p=0.001). En el período de recuperación, se observó que el CT se recuperó a los 45 días en machos y hembras, el colesterol-LDL retornó a los valores basales en machos a los 45 días y en hembras a los 30 días y el colesterol-HDL se recuperó en machos a los 45 días. Los valores de TAG se recuperaron en hembras a los 45 días y no en los machos (p=0.03) y la apo B no se recuperó en ninguno de los animales tratados hasta los 45 días (p=0.001). Conclusiones: Estos estudios sugieren que, aun en condiciones de supresión del estrés crónico, las alteraciones lipídicas persisten por un tiempo prolongado, lo que demuestra que el estrés crónico origina cambios metabólicos lipídicos, que contribuyen a aumentar y sostener el riesgo de patología cardiovascular arteriosclerótica.

### 381. (705) ANALISIS COMPARATIVO MORFOMETRICO Y BIOMECANICO DE FEMUR Y MANDIBULA DE RATAS ALIMENTADAS CON CASEINA (0-20%).

Bozzini C.<sup>1</sup>; Huygens P.<sup>1</sup>; Olivera M.<sup>1</sup>; Bozzini C.<sup>1</sup>; Alippi R.<sup>1</sup>  
Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA<sup>1</sup>  
cebozi@fisis.odon.uba.ar

El propósito de la presente investigación fue realizar un análisis comparativo morfométrico y biomecánico de la respuesta del tejido óseo femoral (hueso que soporta peso) y mandibular (hueso sometido a fuerzas masticatorias) de ratas alimentadas con dietas isocalóricas conteniendo distintas concentraciones de caseína, entre 5 y 20% durante 60 d. Ratas Sprague-Dawley hembras de 30 d (n = 50) recibieron las dietas mencionadas *ad lib*. El crecimiento corporal global fue evaluado en términos de peso corporal, siendo el esquelético estimado en función de longitud corporal y cola. El crecimiento de F y M fue estimado mediante mediciones entre puntos anatómicos estables. Los animales fueron sacrificados al final del período experimental, siendo ambos fémures y mandíbula extraídos y liberados de tejido blando adherido. Fémur (F) y mandíbula (M) izquierdos fueron utilizados para determinación del contenido de calcio en cenizas (mg Ca = masa ósea) mediante espectrofotometría de absorción atómica. F y M derechos fueron sometidos a un ensayo de flexión a tres puntos hasta la fractura en un equipo Instron 4442 a una velocidad de 5 mm/min. El análisis gráfico de las curvas carga/deformación obtenidas permitió la valoración de la calidad mecánica de ambos huesos. Los resultados fueron evaluados estadísticamente mediante ANOVA y test de Tukey-Kramer. Concentraciones menores a 15% de caseína en la dieta determinaron reducción del crecimiento, que fue acompañado por disminución de las propiedades estructurales biomecánicas y geométricas de

ambos huesos, no alterándose la calidad del material óseo. Estos resultados indican que no se observan diferencias en relación al comportamiento morfométrico y biomecánico entre ambos huesos estudiados, pese a las diferentes cargas que soportan. Una dieta conteniendo 15% de caseína permite el crecimiento armónico y biomecánicamente adecuado del esqueleto de la rata. *Proyecto UBACYT O-002 y O-005.*

**382. (707) EFECTO DE LA APOCININA Y EL LOSARTAN SOBRE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL INDUCIDA POR ESTRÉS CRÓNICO EN RATAS JÓVENES Y VIEJAS.**

Binotti S.<sup>1</sup>; Torres C.<sup>1</sup>; Scoppa G.<sup>1</sup>; Bianco M.<sup>1</sup>; Bensi N.<sup>1</sup>; Gauna H.<sup>1</sup>; Niebylski A.<sup>1</sup>  
*Universidad Nacional de Río Cuarto*  
 sbinotti@exa.unrc.edu.ar

El estrés estimula al sistema renina-angiotensina (SRA) induciendo un aumento del estrés oxidativo y antinatriuresis, factores que llevarían a hipertensión arterial. El objetivo fue investigar la participación del SRA y de la NADPH oxidasa en la hipertensión arterial en respuesta al estrés crónico en ratas jóvenes y viejas. Ratas Wistar macho de 3 (J) y 8 (V) meses de edad recibieron Losartan (10 mg/kg/día) o Apocinina (30 mg/kg/día) o el solvente de la droga (S) vía oral durante 15 días. La mitad de las ratas de cada grupo fue sometido a inmovilización (IMO) 1h/día/14 días y el resto permanecieron como controles. El día 14 de IMO se registró la presión arterial sistólica (PAS) y media (PAM). Otro grupo de ratas en las mismas condiciones se utilizó para determinar la excreción de Na<sup>+</sup> y el malonildialdehído renal (MDA). En las ratas V la Apocinina, pero no el Losartan, impide el aumento de la PAS y de la PAM en respuesta a la IMO. En las J ambas drogas bloquean el aumento de la PAS y el Losartan no impide el aumento en la PAM. En ambas edades, Losartan y Apocinina aumentan la excreción de Na<sup>+</sup>; pero persiste la antinatriuresis en respuesta a la IMO. La Apocinina potencia el efecto antinatriurético del estrés en las ratas J; mientras que en las ratas V disminuye la antinatriuresis. En ambas edades el estrés aumentó el MDA renal. El aumento fue menor en las ratas con ambos bloqueantes siendo más notorio en ratas con Apocinina. El Losartan disminuye y la Apocinina bloquea el aumento de la PAM en respuesta al estrés, lo que nos indicaría la participación del SRA y de la NADPH oxidasa en esta respuesta. El menor aumento en el MDA en las ratas con Apocinina, coincidente con una mayor antinatriuresis, relativizaría la participación del Na<sup>+</sup> en la hipertensión arterial en respuesta al estrés; indicando una mayor participación del estrés oxidativo en esta respuesta.

**383. (710) ESTRÉS Y DIETA HIPERGRASA: EFECTOS SOBRE VISCOSIDAD PLASMÁTICA, FRAGILIDAD ERITROCITARIA Y HEMOSTASIA.**

Bianco M.<sup>1</sup>; Scoppa H.<sup>1</sup>; Binotti S.<sup>1</sup>; Bensi N.<sup>1</sup>; Torres C.<sup>1</sup>; Niebylski A.<sup>1</sup>; Gauna H.<sup>1</sup>  
*Universidad Nacional de Río Cuarto*  
 mbianco@exa.unrc.edu.ar

La detección y tratamiento de factores de riesgo capaces de ser modificados son los fundamentos sobre los que reposa la prevención de afecciones cardiovasculares. Su presencia se utiliza para predecir la probabilidad de desarrollar este tipo de patologías. Estos marcadores de riesgo incluyen la edad, el sexo, la dieta, el estrés, el sedentarismo, la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia y el fibrinógeno entre otros. El objetivo de este trabajo fue investigar efecto del estrés y la suplementación lipídica sobre la viscosidad plasmática, la fragilidad eritrocitaria y la hemostasia. Se trabajó con ratas Wistar machos a las que se les administró un suplemento de aceite vegetal (AV) o dieta hipergrasa (HG) vía oral, durante seis semanas, y un tercer grupo que no recibió suplemento (Ss). Luego, la mitad de cada grupo fue estresado por IMO durante 2 hs/día/14 días, quedando conformados los grupos: Ss controles (SsC) y estresadas (SsE), HG control (HG-C) y estresadas (HG-E), AV controles (AV-C) y estresadas (AV-E). El día 14 se recogió sangre y se evaluó la viscosidad plasmática ( $\zeta$ ), el tiempo de coagulación (TC), el

hematocrito (Hcto), la resistencia globular máxima (RGMax) y mínima (RGMin) y las proteínas totales (Pt). La dieta hipergrasa y el estrés incrementaron la viscosidad plasmática ( $p=0.00001$ ). El TC fue menor en las ratas HG ( $p=0.0002$ ) y mayor en las AV ( $p=0.001$ ) que en los animales Ss. A su vez el estrés acortó el TC ( $p=0.0001$  Estrés vs. Control). El Hcto fue mayor en HG ( $p=0.01$  vs. Ss y  $p=0.009$  vs. AV) y en las ratas estresadas ( $p=0.0005$ ). No se encontraron diferencias en las proteínas plasmáticas. La fragilidad eritrocitaria mínima y máxima fue mayor en las ratas HG, siendo más sensibles el grupo HG-E. La dieta hipergrasa y el estrés crónico provocan una disminución del tiempo de coagulación y un incremento de la viscosidad plasmática y sanguínea agravando y acelerando los efectos trombotogénicos de los marcadores de riesgo cardiovascular.

**384. (714) MECANISMOS REGULADORES DE VOLUMEN IMPLICADOS EN EL AUMENTO DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS RENALES QUE EXPRESAN AQP2**

Flamenco P.<sup>1</sup>; Di Giusto G.<sup>1</sup>; Rivarola V.<sup>1</sup>; Fernández J.<sup>1</sup>; Ford P.<sup>1</sup>; Capurro C.<sup>1</sup>  
*Laboratorio Biomembranas Departamento Fisiología y Biofísica Facultad Medicina UBA<sup>1</sup>*  
 capurro@retina.ar

Hasta hace poco tiempo los cambios en el volumen celular observados durante la proliferación eran considerados un fenómeno de poca importancia, sin embargo, creciente evidencia muestra que dichos cambios y la activación de mecanismos de transporte iónicos sensibles a volumen, son todos ellos necesarios para una adecuada proliferación celular. No obstante, el vínculo entre estos cambios de volumen y la participación de los canales de agua (acuaporinas, AQP) no había sido investigado. Nuestros estudios previos mostraron una asociación entre la presencia de AQP2 y la activación de canales reguladores de volumen tanto frente a un shock hipotónico o a un estímulo apoptótico. El objetivo de este trabajo fue estudiar si el incremento de la proliferación, previamente observado en presencia de AQP2, está asociado a la activación diferencial de mecanismos reguladores de volumen. Utilizamos dos líneas celulares de túbulo colector cortical con características bien definidas: WT-RCCD<sub>1</sub> la cual no expresa AQP2 y AQP2-RCCD<sub>1</sub> que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical, y se realizaron estudios a nivel funcional y molecular. Los resultados muestran que la tasa de proliferación que está aumentada en presencia de AQP2 (%BrdU<sup>+</sup>, WT vs. AQP2:  $19,4 \pm 2,7$  vs.  $36 \pm 4,2$ ,  $n=8$ ,  $p<0.01$ ) disminuye luego de la incubación con BaCl<sub>2</sub>, inhibidor de canales de K<sup>+</sup> reguladores de volumen (%BrdU<sup>+</sup>, WT vs. AQP2:  $20,6 \pm 1,86$  vs.  $11 \pm 1,9$ ,  $n=3$ ,  $p<0.01$ ). Además, el inhibidor produjo un aumento significativo en el % de células en fase G<sub>2</sub>/M, y una disminución en fase G<sub>2</sub>/M en paralelo con una reducción en la actividad reguladora de volumen, sólo en células que expresan AQP2. Asimismo, la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup>, responsables de la activación de estos mecanismos, disminuye la proliferación sólo en presencia de AQP2. Concluimos que el aumento de la proliferación observado dado por la expresión de AQP2 está asociado a la activación de canales de K<sup>+</sup> reguladores de volumen.

**385. (748) RESTRICCIÓN AGUDA DE AGUA: EFECTO DEL ÓXIDO NÍTRICO SOBRE ACUAPORINA 1 EN TEJIDO CARDÍACO**

Netti V.<sup>1</sup>; Vatrella M.<sup>1</sup>; Chamorro M.<sup>1</sup>; Mirakian N.<sup>1</sup>; Vives D.<sup>1</sup>; Rosón M.<sup>2</sup>; Fellet A.<sup>1</sup>; Balaszczuk A.<sup>1</sup>  
*Cátedra de Fisiología, FFYB, UBA - IQUIMEFA<sup>1</sup>; CONICET<sup>2</sup>; vnetti@CONICET.gov.ar*

En trabajos previos mostramos que un estado hipovolémico inducido por restricción aguda de agua induce cambios en el sistema del óxido nítrico (NO) cardiovascular en ratas adultas. Teniendo en cuenta que las acuaporinas 1 (AQP1) interactúan con el sistema del NO, se planteó el siguiente objetivo: investigar en ratas de 25 días de edad el efecto de la restricción de agua de bebida y posterior hidratación sobre el sistema del óxido nítrico (NO) y su influencia sobre la localización de las AQP1 en tejido cardíaco. Métodos: Ratas



macho SD de 25 días de edad fueron divididas en los siguientes grupos: control (C); control + L-NAME (dosis no presora 1 mg/kg.día durante 3 días) (CL); restricción del agua de bebida durante 3 días (R); restricción + L-NAME (RL). Luego los animales fueron rehidratados con sales de hidratación oral según OMS (Rsol y RLsol). Al final de cada período experimental, se determinaron los parámetros expuestos en la tabla y los animales se sacrificaron para evaluar la actividad de la NOS (empleando [ $^{14}$ C]L-Arginina como sustrato) y tinción inmunohistoquímica de AQP1 en ventrículo. Resultados:

Grupo	C	CL	R	RL	Rsol	RLsol
Peso(g)	89±4	83±6	60±3*	56±4*	79±3#	77±3 #
Hto(%)	43±1	45±2	56±2*	55±2*	45±1#	46±2#
PAS (mmHg)	101±2	102±2	115±3*	120±2*	97±1#	98±2#
FC(lpm)	461±5	449±9	420±6*	429±7*	470±9#	460±10#
Act NOS (nmol/h.g prot)	10,6±1,0	9,8±2,5	14,3±1,9*	18,5±2,3*#	19,4±3,2*	10,3±2,6#

\* p<0,01 vs C;# p<0,01 vs R

La tinción inmunohistoquímica para AQP1 reveló su presencia en endotelio vascular y endocardio, siendo este patrón similar en todos los grupos estudiados. La restricción aguda de agua induce cambios hemodinámicos asociados a alteraciones en el peso corporal y volumen globular, que se restauran luego de la hidratación con sales OMS, independientemente de la presencia del NO. Se sugiere que un patrón heterogéneo de actividad de la NOS sería necesario para el mantenimiento de la homeostasis hídrica en el corazón, sin modificaciones en la localización de canales AQP1 en nuestro modelo experimental.

## CARDIOVASCULAR 2

### 386. (67) CONTROL HORMONAL DEL GRADIENTE TRANSMURAL DEL CANAL KV4.3 EN SÍNDROME DE BRUGADA

Argenziano M.<sup>1</sup>; Moretta R.<sup>1</sup>; Amorena C.<sup>1</sup>; Garcia Gras E.<sup>1</sup>

CESYMA UNSAM<sup>1</sup> margenziano@yahoo.com.ar

El Síndrome de Brugada (SB) es una canalopatía que se caracteriza por una irregularidad en el potencial de acción que genera arritmia 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 los focos arritmogénicos se basa en un incremento de la corriente generada por el canal de potasio Kv4.3 el cual se encuentra más expresado en el epicardio del ventrículo derecho (VD). Se reportaron reversiones del SB en pacientes castrados como tratamiento contra el cáncer de próstata. La Testosterona (T) en sangre de los pacientes de Brugada es significativamente más alta que en los controles siendo aparente que la T jugaría un rol importante en el desarrollo del síndrome. Nuestra hipótesis es que el gradiente transmural de expresión del canal Kv4.3 es controlado por el receptor de andrógenos (AR). La actividad del AR depende de la concentración de sus ligandos T y dihidrotestosterona (DHT), producto de la conversión de T mediante la enzima 5- $\alpha$ -reductasa. Por lo tanto, proponemos que disminuir la actividad del AR debería disminuir la expresión del canal, llevando a individuos con SB a una situación similar a aquellos individuos que no expresan la enfermedad por no tener la T suficientemente alta. Analizamos la expresión de Kv4.3 en el epicardio y endocardio de VD de 4 grupos de ratas Wistar macho: Control, tratados con DHT, tratados con Finasteride (inhibe parcialmente la síntesis de DHT) y tratados con Flutamida (inhibidor competitivo del AR). Hemos observado que el gradiente de expresión del canal Kv4.3 disminuye ante el tratamiento con Finasteride tanto a nivel de ARNm como proteico, observándose un efecto del Finasteride sobre el epicardio (p<0.05) y sin cambios significativos en el endocardio. Estos resultados demuestran la relevancia de la DHT en el control de la expresión del canal Kv4.3 y su implicancia en el gradiente transmural del canal Kv4.3.

### 387. (77) MODELO MATEMÁTICO VENTRICULAR CONSTRUIDO A PARTIR DE OTRO DE MIOCITO HUMANO PARA LA PREDICCIÓN DEL EFECTO DE LAS CONCENTRACIONES IÓNICAS PLASMÁTICAS SOBRE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA.

Negróni J.<sup>1</sup>; Lascano E.<sup>1</sup>; Gómez C.<sup>2</sup>

Departamento de Biología de La Universidad Favaloro<sup>1</sup>;

Hospital Universitario de la Fundación Favaloro<sup>2</sup>

negróni@favaloro.edu.ar

**Introducción:** Las alteraciones de las concentraciones iónicas plasmáticas en patologías o intervenciones que afectan las propiedades mecánicas del corazón, tal como la hipertrofia, fibrilación o hemodiálisis, no son del todo conocidas. Por lo tanto, estimar los efectos de esas alteraciones sobre variables hemodinámicas sería de utilidad clínica. **Hipótesis:** Un modelo de ventrículo izquierdo basado en la representación de un miocito cardíaco típico capaz de desarrollar fuerza serviría para analizar la influencia de las diferentes corrientes iónicas sobre la generación de presión. **Diseño del estudio:** Se construyó un modelo matemático ventricular con geometría esférica (Negróni et al, JMCC 1999) a partir del modelo de miocito de ten Tusscher (AJP 2006) con desarrollo de fuerza (Negróni et al, JMCC 2008), acoplado a precarga con aurícula izquierda y poscarga tipo Winkessel. El modelo se utilizó para predecir la presión arterial media (Parm) medida en 33 cerdos anestesiados. Los datos de entrada para la simulación fueron las concentraciones sanguíneas de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, y Ca<sup>2+</sup>, la frecuencia cardíaca y la resistencia vascular sistémica. La solución simultánea de las 30 ecuaciones diferenciales que componen el modelo se realizó empleando ODS15s de MATLAB. **Resultados:** La sensibilidad del modelo para expresar variaciones de Parm frente a cambios del 20% en las concentraciones iónicas individuales, mostró que la Parm varió 8.4% para el Ca<sup>2+</sup>, 0.6% para el K<sup>+</sup> y 4.5% para el Na<sup>+</sup>. La capacidad predictiva del modelo se evaluó mediante la correlación Parm medida (PM) con Parm estimada (PE) por modelo:  $PM = 0.801 \cdot PE + 23.3$  (R = 0.67, P < 0.001 pendiente vs cero), con error estándar de la estima = 14.3 mmHg. **Conclusiones:** El modelo demostró capacidad de predecir valores de Parm dependientes de las concentraciones iónicas plasmáticas, lo que lo convierte en una herramienta útil para analizar el efecto de las variaciones iónicas plasmáticas sobre la presión arterial.

### 388. (118) LA ANGIOTENSINA II LIBERADA EN ESTADIOS PREVIOS AL DESARROLLO DE INSUFICIENCIA CARDIACA INDUCE APOPTOSIS A TRAVÉS DE LA CAMKII

Velez Rueda J.<sup>1</sup>; Pinilla O.<sup>1</sup>; Palomeque J.<sup>1</sup>; Mattiazzi A.<sup>1</sup>;

Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1</sup>

joivr8234@yahoo.com.ar

Recientemente hemos descripto que la apoptosis inducida por Angiotensina II (AngII) en cardiomiocitos *in vitro* es mediada por la quina dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina II (CaMKII). Por otra parte, tanto la AngII como la apoptosis y la actividad de la CaMKII han sido causalmente relacionadas con la patogénesis de la insuficiencia cardíaca (IC). Sin embargo, no se ha examinado aun si la AngII liberada endógenamente en el transcurso de la enfermedad (incluso en estadios previos al desarrollo de la IC) produce apoptosis a través de la activación de CaMKII. Por lo tanto, investigamos si la AngII liberada previamente al desarrollo de IC produce apoptosis a través de la activación de CaMKII. Utilizamos 2 modelos de IC en estadios iniciales: el de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), de 4 meses de edad, y el producido por altas dosis de Isoproterenol (R-Iso), de 3 meses de edad tratadas por un mes. En ambos modelos hubo, con respecto a sus controles, aumento significativo de los niveles de aldosterona plasmáticos (como índice de activación del sistema renina-angiotensina) (229.4±5.8% y 585.8±29.6% en SHR y R-Iso), de la presión arterial (113.6±1.2 vs 197.8±2.5 vs 151.3±17.2 mmHG en control, SHR y R-Iso), del índice de masa ventricular izquierda (1.59±0.06 vs 2.60±0.12 vs 1.91±0.04 mg/g en control, SHR y R-Iso) y de la apoptosis (caspasa-3 62.1±19.3% y 131±42.0 en SHR y R-Iso, y aumento de células TUNEL positivas). Paralelamente aumentó la actividad de

CaMKII (aumento de P-CaMKII de  $110.4 \pm 65.1\%$  y  $101.4 \pm 23.8\%$  en SHR y R-Iso, y de PThr17). El tratamiento con enalapril por un mes (10 mg/kg/day) previno el aumento de todos los parámetros. Los modelos de IC no mostraron diferencias ni en la contractilidad de los cardiomiocitos ni en el manejo del  $Ca^{2+}$ , respecto de sus controles. Estos resultados sugieren que la Ang II produce apoptosis *in vivo* en estadios muy anteriores al desarrollo de IC a través de la CaMKII, paradójicamente sin aumentos detectables de  $Ca^{2+}$ . PIP 2139 y PICT 1041

**389. (187) VALIDACIÓN DEL MODELO OVINO PARA ESTUDIOS DE FUNCIÓN VENTRICULAR HUMANA: VALORES ECOCARDIOGRÁFICOS NORMALES COMPARATIVOS**  
Locatelli P.<sup>1</sup>; De Lorenzi A.<sup>2</sup>; Olea D.<sup>1</sup>; Salmo F.<sup>2</sup>; Sepúlveda D.<sup>1</sup>; Guevara E.<sup>2</sup>; Laguens R.<sup>1</sup>; Crottogini A.<sup>8</sup>  
Universidad Favaloro<sup>1</sup>; Fundación Favaloro<sup>2</sup>  
plocatelli@favaloro.edu.ar

En investigación cardiovascular se necesitan modelos experimentales en mamíferos grandes que permitan extrapolar resultados al hombre con más confiabilidad que los obtenidos en roedores. La oveja, por su circulación coronaria y su histología miocárdica similares a las humanas, es utilizada en nuestro laboratorio y en otros. Sin embargo, no existen en la literatura valores de referencia que permitan afirmar que la función del ventrículo izquierdo (VI) ovino es comparable a la del humano. Nuestro objetivo fue, por lo tanto, establecer valores normales de parámetros ecocardiográficos ovinos del VI y compararlos con los de humanos normales. A 69 ovejas (o) Corriedale de 21 a 41 Kg ( $29.5 \pm 4.1$ , media  $\pm$  DS) se les realizó ecocardiograma bidimensional en estado conciente y decúbito lateral derecho con transductor de 2.5 MHz. Se midieron los valores de espesor septal, volumen de fin de diástole (VFD) y de fin de sístole (VFS) del VI y se calcularon la fracción de acortamiento (FA%) y la fracción de eyección (FE%). Los valores se normalizaron por superficie corporal y se compararon con los obtenidos en 69 sujetos humanos (h) sin patología cardiovascular detectable, utilizando un test de t para datos no apareados. Resultados: El espesor diastólico del septum fue menor en la oveja (o:  $7.3 \pm 0.9$  mm; h:  $8.8 \pm 1.2$  mm,  $p < 0.05$ ). No hubo diferencias en el VFD (o:  $55.8 \pm 14.3$  ml/m<sup>2</sup> h:  $55 \pm 10$  ml/m<sup>2</sup>,  $p = NS$ ) pero el VFS fue mayor en la oveja (o:  $24.1 \pm 7.9$  ml/m<sup>2</sup>; h:  $21 \pm 7$  ml/m<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ). Consecuentemente, la FA% (o:  $32.7 \pm 7.9\%$ ; h:  $39.8 \pm 6.6\%$ ,  $p < 0.05$ ) y la FE% (o:  $56.7 \pm 8.9\%$ ; h:  $61.3 \pm 2\%$   $P = NS$ ) fueron menores en la oveja. Conclusiones: Las diferencias en espesor parietal son consistentes con la menor masa del VI ovino. Asimismo, las menores FA% y FE% son consistentes con la mayor relación masa VI/m<sup>2</sup> de superficie corporal de la oveja respecto del hombre. Estas diferencias deberán ser tenidas en cuenta al interpretar resultados extrapolados de modelos experimentales ovinos.

**390. (262) ¿CÓMO SE ENCUENTRA ALTERADA EN LA CARDIOMIOPATÍA DIABÉTICA LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT?**  
Potilinski M.<sup>1</sup>; Moretta R.<sup>1</sup>; Shalom F.<sup>1</sup>; Siciliano M.<sup>1</sup>; García Gras E.<sup>1</sup>; Amorena C.<sup>1</sup>  
CESYMA UNSAM<sup>1</sup>  
constanza.potilinski@gmail.com

La diabetes mellitus se caracteriza por la desregulación de la glucemia. Dentro de las patologías asociadas, se encuentra la cardiomiopatía diabética, que presenta disfunción ventricular en ausencia de aterosclerosis coronaria e hipertensión y diferentes cambios estructurales en el corazón. Entre ellos, se encuentra la hipertrofia. Una de las posibles vías que conducen a la hipertrofia cardíaca involucra la vía de señalización de Wnt. Estas proteínas intervienen en la regulación de la proliferación celular embriogénica y en los procesos de diferenciación, supervivencia y muerte celular. Tienen dos vías principales de señalización, la vía canónica (VC) y la no canónica (VNC), las cuales desembocan en distintos cambios fenotípicos. El objetivo de este trabajo fue determinar si la vía de señalización de Wnt se encuentra afectada en la cardiomiopatía diabética. Para ello se utilizaron ratas wistar

con diabetes inducida por estrepto-zotocina (STZ). A los 90 días post-inducción se sacrificó a los animales. La hipertrofia cardíaca relativa se determinó mediante la relación Peso Corazón/Peso del animal y se evaluaron los genes Wnt5b (VC), Cx43 y CycD1 (río abajo de VNC) mediante la técnica RT-qPCR en muestras de ventrículo izquierdo de corazón. También se evaluó Cx43 a nivel proteico mediante Western Blot. Como resultado se observó una disminución de Cx43 ( $0.58 \pm 0.15UR$ ) vs. control ( $1.07 \pm 0.12UR$ ;  $P < 0.05$ ). En cuanto a la expresión del gen CycD1 se observó un incremento ( $1.54 \pm 0.18UR$ ) vs. control ( $0.92 \pm 0.09UR$ ;  $P < 0.05$ ), también en el caso de Wnt5b ( $3.05 \pm 0.69UR$ ) vs. control ( $1.17 \pm 0.35UR$ ;  $P < 0.05$ ). A su vez los resultados de Western Blot para Cx43 concuerdan con los de la expresión a nivel del mensajero mostrando una disminución ( $1.07 \pm 0.21UR$ ) vs. control ( $2.17 \pm 0.39UR$ ;  $P < 0.05$ ). Estos resultados indicarían que la vía de señalización de Wnt se encuentra afectada en la cardiomiopatía diabética brindando así nuevos parámetros que ayudarían a describir los procesos a nivel molecular involucrados en esta afección.

**391. (281) LA PREVENCIÓN DE LA HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA (HVI) POR LOSARTAN MEJORA LA FUNCIÓN MIOCÁRDICA. ROL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) Y DEL INTERCAMBIADOR NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> MIOCÁRDICO (NHE-1)**  
Alvarez M.<sup>1</sup>; Cingolani O.<sup>2</sup>; Pérez N.<sup>1</sup>; Ennis I.<sup>1</sup>; Mosca S.<sup>1</sup>; Schinella G.<sup>1</sup>; Escudero E.<sup>1</sup>; Cónsole G.<sup>1</sup>; Cingolani H.<sup>1</sup>  
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Facultad Ciencias Médicas UNLP<sup>1</sup>; Johns Hopkins University, Baltimore, USA<sup>2</sup>; alvarezmc@aetos.med.unlp.edu.ar

La HVI por sobrecarga de presión se considera un mecanismo compensatorio que normaliza el estrés parietal. Ello implica que evitar HVI sin bajar la presión deterioraría la función miocárdica, lo cual no siempre ocurre. Nuestro objetivo fue aclarar esta controversia usando un modelo de HVI por constricción aórtica transversal (TAC) en ratón. Grupos: 1) TAC (n=7), 2) TAC+LOS (losartan 40 mg/Kg/día, n=8), 3) Sham (n=8) y 4) Sham+LOS (n=7). Se sacrificaron 7 semanas post-cirugía previa ecocardiografía. La TAC aumentó el índice de masa VI vs Sham ( $4.86 \pm 0.17$  vs  $3.42 \pm 0.11$  mg/g,  $P < 0.05$ ) así como el área de sección de miocitos ( $280 \pm 3$  vs  $199 \pm 8$   $\mu m^2$ ,  $P < 0.05$ ) y el volumen fraccional de colágeno ( $5.62 \pm 0.43$  vs  $1.95 \pm 0.10\%$ ,  $P < 0.05$ ), efectos mitigados por LOS ( $3.74 \pm 0.16$  mg/g,  $219 \pm 5$   $\mu m^2$  y  $3.34 \pm 0.44\%$ , respectivamente,  $P < 0.05$  vs TAC). El acortamiento endocárdico (AE) cayó con la HVI vs Sham ( $51 \pm 2\%$  vs  $63 \pm 1\%$ ,  $P < 0.05$ ). La regresión de HVI con LOS aumentó el AE ( $57 \pm 1\%$ ,  $P < 0.05$  vs TAC) pese al aumento del estrés parietal de fin de sístole ( $46 \pm 8$  %,  $n=6$ ,  $P < 0.05$  vs TAC). El estrés diastólico tampoco explicó el aumento del AE en este grupo. LOS no modificó el AE en Sham ( $61 \pm 1\%$ ) descartando un posible efecto inotrópico positivo. La HVI se acompañó de aumento de estrés oxidativo vs Sham (TBARS:  $0.19 \pm 0.01$  vs  $0.12 \pm 0.03$  mmol/ml,  $P < 0.05$ ) y de activación de la kinasa redox-sensible p90<sup>RSK</sup> ( $2.18 \pm 0.22$  vs  $1.57 \pm 0.08$  UA,  $P < 0.05$ ) con el consecuente aumento de fosforilación del NHE-1 ( $2.00 \pm 0.16$  vs  $0.90 \pm 0.11$  UA,  $P < 0.05$ ). LOS anuló el aumento de TBARS ( $0.06 \pm 0.02$  mmol/ml) y de fosforilación de p90<sup>RSK</sup> ( $1.45 \pm 0.03$  UA) y NHE-1 ( $0.97 \pm 0.07$  UA). En resumen, LOS previno la HVI manteniendo la contractilidad a pesar del mayor estrés parietal, sugiriendo que la HVI es un fenómeno maldaptativo. El aumento de ROS y la activación del NHE-1 parecen jugar un rol clave en la patogénesis de la HVI. El efecto antihipertrófico de LOS pareciera deberse a su capacidad de anular la activación redox-sensible de p90<sup>RSK</sup> y del NHE-1.

**392. (284) LA INHIBICIÓN DE LA FOSFODIESTERASA 5A (FDE5A) DISMINUYE LA ACTIVIDAD DEL INTERCAMBIADOR NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> MIOCÁRDICO (NHE1) POR ACTIVACIÓN DE LA FOSFATASA PP2A**  
Díaz R.<sup>1</sup>; Nolly M.<sup>1</sup>; Massarutti C.<sup>1</sup>; Casarini M.<sup>1</sup>; Garciaarena C.<sup>5</sup>; Ennis I.<sup>6</sup>; Cingolani H.<sup>1</sup>; Pérez N.<sup>1</sup>  
Centro de Investigaciones Cardiovasculares Facultad Ciencias Médicas de La Plata UNLP<sup>1</sup>  
gisel\_laplata@yahoo.com.ar

Nuestro objetivo fue profundizar la caracterización de la vía de señalización que vincula la inhibición de FDE5A con la disminución de la actividad del NHE1 que hemos reportado previamente. Se usaron músculos papilares aislados de rata. Se evaluó actividad del NHE1 mediante recuperación del  $pH_i$  (eflujo de  $H^+$ :  $J_{H^+}$ ) post-acidosis transitorias o sostenidas (pulso de amonio). Se midió fosforilación de ERK1/2 (quinasas "upstream" NHE1) y del NHE1. La inhibición de FDE5A (1  $\mu$ M sildenafil, S) no alteró el  $pH_i$  basal (control  $7.28 \pm 0.02$  vs. S  $7.28 \pm 0.02$ ,  $n=4$ ) ni la actividad del NHE1 post-acidosis transitoria [ $J_{H^+}$ :  $1.01 \pm 0.13$  (control,  $n=5$ ) vs.  $0.95 \pm 0.13$  (S,  $n=4$ ) mM/min], pero disminuyó la recuperación del  $pH_i$  post-acidosis sostenida [ $J_{H^+}$ :  $3.01 \pm 0.14$  (control,  $n=13$ ) vs.  $0.40 \pm 0.15$  (S,  $n=4$ ) mM/min,  $P < 0.05$ ]. La acidosis sostenida aumentó la fosforilación de ERK1/2 ( $155 \pm 11\%$  del control sin acidosis,  $n=10$ ,  $P < 0.05$ ). La inhibición de MEK (10  $\mu$ M U0126) kinasa activadora de ERK1/2, canceló el aumento de ERK1/2 ( $104 \pm 15\%$   $n=8$ ) y mimetizó el efecto de S sobre la función del NHE1 ( $J_{H^+}$ :  $0.56 \pm 0.12$  mM/min,  $n=4$ ). Sin embargo, S no canceló la activación de ERK1/2 ( $158 \pm 19\%$ ,  $n=7$ ,  $P < 0.05$ ). Entonces pensamos que S podría estar activando fosfatasa (PP1 y/o PP2A) que directamente defosforilen al NHE1 sin alterar ERK1/2. La inhibición conjunta de PP1 y PP2A (1  $\mu$ M ácido okadaico) canceló el efecto de S sobre el NHE1 ( $J_{H^+}$ :  $2.51 \pm 0.14$  mM/min,  $n=4$ ). Similar resultado se obtuvo al inhibir sólo PP2A con ácido okadaico en dosis menor (1 nM) ( $J_{H^+}$ :  $2.95 \pm 0.16$  mM/min,  $n=4$ ) o más específicamente con endothall (100  $\mu$ M) ( $J_{H^+}$ :  $3.00 \pm 0.16$  mM/min,  $n=4$ ). Consistentemente, la acidosis aumentó la fosforilación del NHE1 ( $139 \pm 6\%$  del control sin acidosis,  $n=4$ ,  $P < 0.05$ ), S canceló este efecto ( $109 \pm 5\%$ ,  $n=4$ ) y endothall revirtió la acción de S ( $136 \pm 6\%$ ,  $n=4$ ,  $P < 0.05$ ). Los resultados permiten sugerir que la inhibición de FDE5A disminuye la fosforilación y la actividad del NHE1 mediante un mecanismo que involucra activación de PP2A.

**393. (319) DISFUNCION ENDOTELIAL Y RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II EN UN MODELO DE SINDROME METABOLICO INDUCIDO POR UNA DIETA RICA EN GRASAS**  
Jerez S.<sup>1</sup>; Scacchi F.<sup>1</sup>; Sierra L.<sup>1</sup>; Karbinger S.<sup>2</sup>; Peral De Bruno M.<sup>2</sup>

Facultad de Ciencias Naturales; INSIBIO; UNT; CONICET<sup>1</sup>;  
Facultad de Medicina; INSIBIO, UNT, CONICET<sup>2</sup>  
sjerez@herrera.unt.edu.ar

La disfunción endotelial en el síndrome metabólico puede predecir el riesgo cardiovascular. El objetivo de este trabajo fue estudiar la función endotelial y la respuesta contráctil a angiotensina II (AngII) en un modelo con síndrome metabólico (SM) producido por una dieta rica en grasas (DG). Conejos fueron alimentados con dieta control (DC) y DG durante 12 semanas. Aortas torácicas se montaron en un sistema de registro de contractilidad isométrica y se midió nitritos por reacción de Griess. La función endotelial se evaluó con curvas dosis respuesta (CDR) a acetilcolina (ACh) en conejos con DC y DG. Se efectuaron CDR a AngII en ausencia (control) y presencia de 17-ODYA  $10^{-6}$  M (inhibidor  $\omega$ -hidroxilasa), tempol  $10^{-7}$  M (antioxidante), PD123319  $10^{-7}$  M (antagonista AT<sub>2</sub>), losartan  $10^{-7}$  M (antagonista AT<sub>1</sub>). Los nitritos se dosaron en el medio de incubación en condiciones basales y después del estímulo con AngII. Los conejos con DG mostraron menor afinidad a la ACh (DG:  $6.82 \pm 0.14$  vs DC:  $7.08 \pm 0.09$ ,  $n=10$ ,  $p < 0.05$ ) y menor producción basal de NO (DG:  $51.8 \pm 4.8$  vs DC:  $98.9 \pm 9.7$  pmol/mg). La AngII no estimuló la liberación de NO (DG:  $55.7 \pm 5.5$  vs DC:  $220 \pm 44$  pmol/mg;  $n=10$ , ANOVA,  $p < 0.05$ ). En conejos con DG, 17-ODYA ( $134.9 \pm 48$  pmol/mg), tempol ( $90.3 \pm 10.3$  pmol/mg) y PD123319 ( $119.8 \pm 17$  pmol/mg) pero no losartan ( $62.3 \pm 4$  pmol/mg) estimularon la producción de NO inducida por AngII. 17-ODYA y PD123319 disminuyeron la R<sub>máx</sub> (Ang II:  $3231 \pm 533$  mg, AngII+17-ODYA:  $1416 \pm 160$  mg, AngII+PD123319:  $2124 \pm 276$  mg) pero mejoraron la afinidad ( $pD_2$  AngII:  $7.6 \pm 0.13$ ; AngII+17-ODYA:  $8.2 \pm 0.16$ ; AngII+PD123319:  $8.3 \pm 0.12$ ). Tempol desplazó la CDR a la izquierda ( $pD_2 = 8.45 \pm 0.06$ ) y losartan hacia la derecha ( $pD_2 = 6.9 \pm 0.1$ ). Conclusión: en conejos con SM hay disfunción endotelial con disminución en la producción basal y estimulada de NO. 20-HETE estarían involucrados en la respuesta contráctil a Ang II a través de receptores AT<sub>2</sub> y los radicales libres, neutralizados por el tempol o el NO, disminuirían la afinidad.

**394. (335) CAMKII MEDIA LOS EFECTOS CARDIOTÓXICOS DE LOS DIGITÁLICOS**

Gonano L.<sup>1</sup>; Rico Y.<sup>1</sup>; Mattiazzi A.<sup>1</sup>; Vila Petroff M.<sup>1</sup>  
Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1</sup>  
luisgonano@hotmail.com

El efecto inotrópico positivo producido por la inhibición de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa con digitálicos, ha sido usado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca por más de 200 años. Sin embargo, la ventana terapéutica de estos fármacos se ve limitada por sus efectos tóxicos, fundamentalmente en forma de arritmias y apoptosis. El aumento del Ca<sub>2+</sub> inducido por los digitálicos sería responsable de su efecto inotrópico positivo pero también podría activar a la CaMKII, que ha sido vinculada tanto con la inducción de arritmias como de apoptosis. En este trabajo examinamos el rol de la CaMKII en los efectos tóxicos inducidos por el digitálico ouabaina. Cardiomiocitos aislados de rata fueron tratados con ouabaina en forma aguda para evaluar la presencia de arritmias y cultivados durante 24 hrs en presencia y ausencia de digitálicos para examinar apoptosis. En miocitos estimulados a 0.5Hz, 50  $\mu$ M ouabaina aumentó la amplitud de contracción un  $160 \pm 5\%$  ( $n=6$ ) y desencadenó la aparición de actividad espontánea, que persistió aun en ausencia de estimulación eléctrica. En corazones perfundidos la ouabaina indujo latidos ectópicos. En miocitos cultivados, la ouabaina disminuyó la viabilidad celular en un  $43 \pm 5\%$  ( $n=6$ ), y aumentó el número de núcleos TUNEL positivos de  $4.3 \pm 1.1\%$  a  $11.4 \pm 1.5\%$  ( $n=5$ ) y la actividad de caspasa-3 de  $5.5 \pm 1.3\%$  a  $15.4 \pm 2.1\%$  ( $N=5$ ), indicando la presencia de apoptosis. Resultados similares se obtuvieron usando 10  $\mu$ M de digoxina. El tratamiento con ouabaina aumentó la actividad de CaMKII (pCaMKII). La inhibición de la CaMKII con 2.5  $\mu$ M KN93 o 1  $\mu$ M AIP no modificó el efecto inotrópico positivo inducido por la ouabaina pero redujo la actividad espontánea, latidos ectópicos, la disminución de la viabilidad celular y el aumento de los índices apoptóticos. Concluimos que el incremento de Ca<sub>2+</sub> responsable del efecto inotrópico positivo de la ouabaina también promueve la activación de CaMKII que mediaría sus efectos tóxicos.

**395. (338) PARTICIPACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN DE FOSFOLAMBAN POR LA CA2+ CALMODULINA QUINASA II (CAMKII) EN LA INJURIA MIOCÁRDICA DEBIDA A ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

Salas M.<sup>1</sup>; Valverde C.<sup>1</sup>; Mattiazzi A.<sup>1</sup>  
Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Cs Médicas, LA PLATA<sup>1</sup> salasmarga@gmail.com

En estudios anteriores demostramos que la CaMKII está involucrada en la vía de la muerte celular por necrosis y apoptosis secundaria a isquemia (I) y reperfusión (R) cardíacas. En esta vía participa el retículo sarcoplasmático (RS) ya que, ratones transgénicos (TG) con inhibición de la CaMKII a ese nivel, muestran disminución de la muerte celular por I/R. El objetivo de este trabajo es establecer si la fosforilación de fosfolamban (PLN) por CaMKII, que ocurre al comienzo de la R, contribuye en la vía deletérea mediada por esta quinasa. Se realizaron experimentos en corazones de TG con los sitios fosforilables de PLN. Ser 16 y Thr 17 mutados a Ala, hecho que impide la fosforilación de PLN y el aumento de la actividad de la Ca<sub>2+</sub>-ATPasa del RS. Los corazones aislados de TG y sus controles (WT) fueron sometidos a I/R (45/120 min.). Los resultados mostraron que los TG comparados con los WT, presentaban al final de la R, una disminución significativa de la LVDP (WT  $5.21 \pm 1.18$  mmHg ( $n=13$ ) vs. TG:  $1.60 \pm 0.46$  mmHg ( $n=9$ )), un aumento significativo del área de infarto (WT:  $20.85 \pm 4.43\%$  ( $n=8$ ) vs. TG:  $49.20 \pm 12.04\%$  ( $n=5$ )) y de la liberación de LDH (WT:  $837, 23 \pm 281, 24$  u/l/gr. ( $n=5$ ) vs. TG:  $2189, 09 \pm 354, 88$  u/l/gr. ( $n=8$ )). Si bien en los TG, el número de células apoptóticas fue mayor (WT:  $2, 1 \pm 0, 34$  ( $n=3$ ) vs. TG:  $2, 9 \pm 0, 58$  ( $n=4$ )) la diferencia no fue estadísticamente significativa. Conclusiones: Los experimentos indican que, en estos ratones, la fosforilación de PLN dependiente de CaMKII que ocurre al comienzo de R no contribuye al efecto deletéreo de la CaMKII en la I/R. Por el contrario su inhibición aumenta la muerte celular por necrosis.

**396. (370) CAMBIOS EN LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO Y CALMODULINA TIPO II (CAMKII) EN EL PROCESO EVOLUTIVO HACIA LA INSUFICIENCIA CARDÍACA.**

Becerra R.<sup>1</sup>; Said M.<sup>1</sup>; Luccotti I.<sup>3</sup>; Rinaldi G.<sup>1</sup>; Mundifia-Weilenmann C.<sup>1</sup>; Mattiazzi A.<sup>1</sup>; Vittone L.<sup>1</sup>  
 Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-La Plata, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>1</sup>  
 rogreta@hotmail.com

Numerosas observaciones relacionan el aumento de actividad de la CaMKII con el desarrollo de insuficiencia cardíaca (IC), pero no hay estudios longitudinales que describan el estado de fosforilación de esta proteína (PCaMKII) como indicador de su actividad, durante la evolución de la hipertrofia a la IC. Estudiamos en un modelo de rata sometida a sobrecarga de presión por constricción aórtica (Clip) y su control (Sham), parámetros hemodinámicos, morfológicos y la fosforilación de CaMKII y sus sustratos (PT17 de fosfolamban y PS2815 del receptor de rianodina RyR2). Los animales se sacrificaron 4hs, 7 días y 3 meses postcirugía (n=3-8). Los datos hemodinámicos medidos en el animal previo al sacrificio, revelan un aumento postquirúrgico inmediato de la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (VI) en Clip vs Sham (161,0±8.1 vs 116.1±4.1 mmHg p<0.05), que persistió a los 7 días, sin cambios en otros parámetros. La hipertrofia del VI, se detectó en Clip a partir de los 7 días. A los 3 meses las clip presentaban insuficiencia sistólica y diastólica con disminución significativa de +dP/dt (Clip: 2162.7±172.3 vs Sham: 4846.9±729.9 mmHg/seg), aumento de la presión diastólica final (Clip: 20.2±3.7 vs Sham: 5.6±0.7 mmHg) y de la constante de relajación Tau (Clip: 28.3±4 vs Sham: 12.2±1.6 ms). Los ensayos bioquímicos mostraron un aumento temprano (4 hs) de PCaMKII en Clip vs Sham (146.5±12.4% p<0.05), sin cambios en la fosforilación de sus sustratos. A los 7 días PCaMKII retornó a valores basales coincidente con una caída de PS2815 de RyR2. A los 3 meses, en Clip, PCaMKII disminuyó por debajo de los valores basales (62.8±6.2% p<0.05), sin cambios en la fosforilación de sus sustratos. Los resultados muestran una correlación entre los cambios contráctiles y niveles de PCaMKII: aumento temprano de ambos (4 hs) y descenso a tiempos tardíos (3 meses), aunque la disfunción contráctil no parece mediada por modificación en la fosforilación de los sustratos.

**397. (377) IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS BLANCO DE CAMKII EN MITOCONDRIAS AISLADAS DE CORAZÓN**

Valverde C.<sup>1</sup>; Pellon M.<sup>2</sup>; Landoni M.<sup>3</sup>; Couto A.<sup>3</sup>; Mattiazzi A.<sup>1</sup>  
 Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1</sup>; INIBIOLP<sup>2</sup>;  
 Dpto. Química Orgánica - FCEN - UBA<sup>3</sup>  
 valverdeca@med.unlp.edu.ar

La participación de CaMKII en la apoptosis ha sido demostrada hace varios años. Hemos descrito que la muerte por apoptosis/necrosis inducida por isquemia/reperfusión (IR) es mediada por CaMKII a nivel del retículo sarcoplasmático (RS) y que además participan las mitocondrias. No se sabe si proteínas mitocondriales fosforiladas por CaMKII son responsables de parte del este efecto deletéreo en la IR. La hipótesis es que el aumento del Ca<sup>2+</sup> citosólico y posterior activación de CaMKII en la IR, podría fosforilar proteínas no sólo del RS (ya demostrado) sino además de las mitocondrias, por un aumento en la concentración local de Ca<sup>2+</sup> y transferencia en el microdominio mitocondrias-RS. Esto permitiría una activación de CaMKII allí y la fosforilación de proteínas, afectando la función mitocondrial y contribuyendo al efecto deletéreo de la CaMKII en la IR. Se propone estudiar la presencia e identificar proteínas blanco de CaMKII a nivel mitocondrial o de su interacción con el RS. Para ello se realizó el aislamiento, purificación y fosforilación *in vitro* (iv) con CaMKII y ATP radiactivo, de mitocondrias de corazón de rata. Se caracterizó el aislamiento y purificación de mitocondrias y membranas asociadas a mitocondrias por Western Blot. La fosforilación *i.v.* con <sup>32</sup>P-ATP de mitocondrias puras y la autoradiografía de geles SDS-PAGE indicó la fosforilación de al menos 5 proteínas blanco de CaMKII. La fosforilación *i.v.* en presencia de un inhibidor específico de

CaMKII, aún en presencia de Ca<sup>2+</sup> y CaM, señala la especificidad de la fosforilación por CaMKII de 3 proteínas de las cuales resulta de interés una banda de ~20 KDa. Por estudio de subfraccionamiento esta banda correspondería a una localización en membrana externa. Se están realizando estudios por espectrometría de masa para identificar dicha proteína. Estos resultados demuestran por primera vez la presencia de al menos una proteína con localización mitocondrial capaz de ser fosforilada por CaMKII en corazón.

**398. (465) DESARROLLO DE UN MODELO COMPUTACIONAL DE LA CIRCULACIÓN ARTERIAL PARA APLICACIONES EN DOCENCIA E INVESTIGACIÓN**

Cervino C.<sup>1</sup>;  
 Cátedra Fisiología - Facultad de Medicina - Universidad de Morón<sup>1</sup>  
 ccervino@unimoron.edu.ar

Los adelantos tecnológicos logrados en cardiología, que incluyen dispositivos de asistencia circulatoria e implantes cardiovasculares entre otros, conllevan la necesidad de comprender los aspectos biomecánicos e hidrodinámicos implícitos en la fisiología y fisiopatología del sistema cardiocirculatorio (SCC), especialmente en lo que concierne a la dinámica de fluidos. Ello justifica la realización de un proyecto encaminado a desarrollar un modelo dinámico que permita analizar estos aspectos biomecánicos orientado a desarrollar y aplicar Dispositivos de Asistencia Ventricular Izquierda (DAVI). Un modelo es una descripción lógica de cómo un sistema funciona o como se comportan sus componentes. El objetivo de este proyecto es el de desarrollar y poner a prueba un modelo interactivo de la fisiología del SCC para el uso en docencia e investigación. El modelo es un modelo simple de cuatro componentes, y simula las siguientes variables y parámetros: a) variaciones del volumen de la aurícula izquierda (AI) y ventrículo izquierdo (VI); b) variaciones de presión en la AI, VI y aorta (Ao); c) flujo a través de la válvula mitral (VM) y válvula aórtica (VAo), y d) imita el "efecto Windkessel" en la Ao. Se utilizó el entorno de modelización Extend el cual provee una estructura integrada para la construcción de modelos de simulación y el desarrollo de nuevas herramientas de simulación. El corazón derecho y la circulación pulmonar no son considerados. Asimismo se construyó un grupo que simula el funcionamiento de un DAVI. Las herramientas de la modelización dinámica facilitan mucho la construcción de los modelos. Este modelo simula las características generales del corazón izquierdo y de la circulación arterial, y se han realizado diversas simulaciones considerando distintas situaciones fisiológicas y patológicas. En el estudio se incluyó la simulación de la aplicación de un DAVI en contrapulsación al corazón nativo.

**399. (542) EVALUACIÓN DE LA DISFUNCIÓN CARDÍACA EN EL MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE FABRY**

Mucci J.<sup>1</sup>; De Francesco P.<sup>1</sup>; Fritz M.<sup>2</sup>; Blanco P.<sup>3</sup>; Gonano L.<sup>2</sup>; Rozenfeld P.<sup>1</sup>; Vila Petroff M.<sup>2</sup>; Rinaldi G.<sup>2</sup>;  
 Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune Lysin (Facultad de Ciencias Exactas, UNLP)<sup>1</sup>; CIC (Facultad de Medicina, UNLP)<sup>2</sup>; Servicio de Cardiología (Facultad de Veterinaria, UNLP)<sup>3</sup>  
 jmucci@biol.unlp.edu.ar

La Enfermedad de Fabry es una patología de almacenamiento lisosomal genética que afecta al tejido cardíaco. Resultados preliminares de nuestro grupo revelaron una menor contractilidad, mayor distensibilidad y desarreglo de la arquitectura tisular, de miocardios del modelo murino de Enfermedad de Fabry (knockout para el gen de alfa-galactosidasa A) (RF) en comparación con los de la cepa salvaje (RWT). Los objetivos del presente trabajo son analizar la función cardíaca mediante ecocardiograma y la actividad contráctil de músculos papilares aislados y cardiomiocitos del corazón de RF en comparación con los de RWT. Ratones de 25 semanas de edad (10 RF y 10 RWT) fueron sometidos a ecocardiograma y medición de contractilidad por cateterismo. Luego, los corazones fueron extraídos y se determinó la fuerza desarrollada por músculos papilares aislados y la amplitud de la contracción, frecuencia y movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular (fluor-

rescencia de indo-1) en cardiomiocitos aislados. La contractilidad (dP/dt (max) fue de  $2707 \pm 85$  para RF y  $3128 \pm 94$  mmHg/seg para RWT. La fracción de acortamiento resultó  $18 \pm 2\%$  en RF en comparación con un  $31 \pm 2\%$  determinado en RWT. Los músculos papilares aislados de RF desarrollaron menor fuerza que los de RWT ( $39.8 \pm 17.3$  g vs  $67.5 \pm 15.7$  g, respectivamente,  $p < 0.05$ ), mientras que no se observó diferencia en la respuesta contráctil ante el aumento de la frecuencia de estimulación (fenómeno de la escalera) entre ambos grupos. Por otra parte, los miocitos de RF presentaron una menor contractilidad basal asociada con una menor amplitud del transitorio de  $Ca^{2+}$  comparado con los RWT. En conclusión, la disfunción cardíaca detectada en el modelo murino en la enfermedad de Fabry concuerda con las observaciones en pacientes humanos y estaría mediada por una alteración en el manejo del  $Ca^{2+}$  intracelular. Este modelo sería de gran utilidad para entender los mecanismos fisiopatogénicos y evaluar la respuesta a diferentes enfoques terapéuticos.

#### 400. (606) LA PROTEÍNA QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO Y CALMODULINA (CAMKII): ¿ES PROARRITMOGÉNICA EN REPERFUSIÓN?

Said M.<sup>1</sup>; Becerra R.<sup>2</sup>; Sanchez G.<sup>3</sup>; Donoso P.<sup>4</sup>; Mundiña-Weilenmann C.<sup>5</sup>; Dedman J.<sup>6</sup>; Vittone L.<sup>7</sup>; Mattiazzi A.<sup>8</sup>  
*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>1, 2, 5, 7, 8</sup>; Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago, Chile<sup>3, 4</sup>; Department of Genome Science, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH, USA.<sup>6</sup>  
 msaid@aetos.med.unlp.edu.ar*

La reperusión del miocardio isquémico lo hace más propenso a la aparición de arritmias. En experimentos previos mostramos que al inicio de la reperusión (R), momento en el que hay un mayor número de arritmias, aumenta la fosforilación dependiente de CaMKII del residuo PT17 de fosfolamban (PLN) (Vittone, 2002). En este trabajo, evaluamos la posibilidad de que la activación de CaMKII al inicio de R sea un mecanismo proarritmogénico. Corazones de rata/ratón ( $n=4-8$  en distintas intervenciones) se perfundieron (Langendorff) y sometieron a isquemia global (15-20min) seguidos de R (3min). Potenciales de acción monofásicos epicárdicos y parámetros contráctiles fueron registrados simultáneamente. La actividad de CaMKII se evaluó a través de su fosforilación (PCaMKII). Los resultados indican que R induce la aparición de numerosos latidos ectópicos (LE), que disminuyeron significativamente por el tratamiento con el inhibidor de CaMKII, KN-93 (1microM) (LE  $46 \pm 6$  Ctrol vs  $11 \pm 3$  KN-93). La disminución de la entrada de  $Ca^{2+}$  a la célula o de la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo sarcoplasmático (RS) por tratamiento con Nifedipina (Nife) o Rianodina (Ry) respectivamente, disminuyó la aparición de LE ( $46 \pm 6$  Ctrol vs  $8 \pm 2$  Nife y  $25 \pm 3$  Ry,  $p < 0.05$ ). La incidencia de arritmias de R en ratones transgénicos con inhibición selectiva de CaMKII a nivel de las membranas del RS (SR-AIP) también fue menor ( $3 \pm 1$  SR-AIP vs  $34 \pm 10$  WT). PCaMKII aumentó en R ( $198 \pm 9\%$   $p < 0.05$ ) respecto a valores preisquémicos, al igual que la fosforilación de sus sustratos PT17 de PLN y PS2815 de RyR2. Se detectó un aumento de S-glutacionilación y S-nitrosilación de RyR2. El tratamiento con apocinina, un inhibidor de la generación de anión superóxido, no modificó la aparición de arritmias ni la PCaMKII. Los resultados indican que CaMKII es proarritmogénica en R y sugieren que el aumento de  $Ca^{2+}$  que se produce en R sería el detonante de su activación independientemente del estado redox. PIP 2139 - Fondecyt 1080481 y 1080497.

## GENÉTICA 2 Y MEDICINA REGENERATIVA 1

#### 401. (215) PERFIL DE DETECCIÓN DE ARN FETAL LIBRE EN SANGRE MATERNA

Caro Y.<sup>1</sup>; Sesarini C.<sup>2</sup>; Giménez M.<sup>3</sup>; Otaño L.<sup>4</sup>; Argibay P.<sup>5</sup>  
*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1, 2, 5</sup>; Unidad de Medicina Fetal, Servicio de Obstetricia, Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>3, 4</sup>.  
 yanina.caro@hospitalitaliano.org.ar*

Ha sido demostrado que, además de ADN fetal libre, el ARN fetal libre (ARNfl) también está presente en sangre de embarazadas. El análisis de ARNfl en plasma brinda información sobre la presencia y concentración de material genético fetal en circulación materna e información acerca de patrones de expresión génica fetal. El objetivo del presente trabajo es establecer un protocolo de extracción de ARNfl a partir de sangre materna, detectar transcritos de un gen de expresión embrionaria (gen hPL) y estudiar su variación de acuerdo al trimestre de embarazo, a la condición de fumadora y a la contextura física. Se tomaron muestras de sangre de 34 embarazadas y se amplificó por PCR en tiempo real transcritos del gen hPL, utilizando  $\beta$ -Actina como *house keeping*. Se consignó para cada embarazada el trimestre del embarazo, la condición de fumadora o no, y el peso materno. El análisis de datos fue realizado a través del ANOVA y T-test. El gen hPL se expresó en todas las muestras, no se registró variación a lo largo del embarazo ( $p=0.987$ ) y no se detectó en mujeres no embarazadas. No se observaron diferencias significativas en la expresión entre fumadoras y no fumadoras ( $p=0.554$ ) y se registró una disminución de la expresión a mayor peso materno ( $p=0.291$ ). Se concluye que es factible extraer y detectar ARNfl en circulación materna durante la gestación. Se observó una disminución no significativa en la concentración de transcritos en embarazadas fumadoras y la falta de significación estadística podría deberse al bajo número de muestras estudiadas. La disminución de ARNfl en el grupo de mayor contextura física sería resultado de una dilución de marcadores fetales dado el mayor volumen sanguíneo. El estudio de ARNfl en plasma materno contribuirá a ampliar el conocimiento de perfiles de expresión a lo largo del desarrollo embrionario y es, además, una potencial herramienta de diagnóstico prenatal no invasivo.

#### 402. (229) DISEÑO DE METODOLOGÍA BASADA EN EL USO DE UN PRIMER UNIVERSAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER

Massot F.<sup>1</sup>; Ferreiro V.<sup>2</sup>; Piazza G.<sup>3</sup>; Szijan I.<sup>4</sup>; Giliberto F.<sup>5</sup>  
*Cátedra de Genética Y Biología Molecular, Facultad De Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1, 3, 4, 5</sup>; División Genética, Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA<sup>2</sup>.  
 Franmassot@gmail.com*

La Distrofia muscular de Duchenne/Becker es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500), es recesiva, ligada al X, progresiva y de evolución fatal. Se produce por mutaciones en el gen de la distrofina, de las cuales el 70% son grandes deleciones. Nuestro objetivo fue diseñar una metodología basada en el uso de un primer universal marcado con fluorocromo (FAM) para ser utilizado en dos diferentes estudios: PCR semicuantitativa y segregación de alelos intrafamiliar. La PCR semicuantitativa tiene el objeto de detectar mutaciones tanto en pacientes varones como en mujeres portadoras. La segregación de alelos de STRs se realiza en las familias afectadas para estimar el riesgo de contraer o transmitir la enfermedad. Se utilizan 3 primers para amplificar cada loci: 1) primer forward de secuencia específica con una colita de secuencia M13 en su extremo 5'; 2) primer reverse de secuencia específica; 3) primer M13 marcado con FAM. Se diseñó una PCR semicuantitativa octuplex, de exones ubicados en "sitios calientes" de deleción. Se obtuvieron resultados en los rangos de dosis esperados (0.5 y 1) para muestras de mujeres control con y sin deleción, revelando una deleción heterocigota en una mujer. En el estudio de segregación de STRs se analizaron 4 familias, con un total de 21 muestras (12 caracterizadas previamente por otra metodología), realizándose 51 amplificaciones de STRs de hasta 6 loci diferentes. Los electroferogramas obtenidos permitieron los siguientes diagnósticos: 3 mujeres resultaron portadoras y 9 se excluyeron de serlo; 1 vellosidad coriónica se excluyó de portar la mutación. Se evidenciaron dos eventos de mutación de novo y un mosaïcismo germinal en una mujer. La utilización de primer universal disminuye los costos de los estudios haciéndolos accesibles para más pacientes. El desarrollo de nuevas metodologías permite generar diversas estrategias diagnósticas adecuadas para cada familia.

#### 403. (326) ESTUDIOS GENÉTICOS EN HIPOACUSIA NEUROSENSORIAL NO SINDRÓMICA

Dalmon V.<sup>1</sup>; Wernert M.<sup>2</sup>; Elgoyhen A.<sup>3</sup>  
 INGEBI<sup>2 3</sup>  
 dalamon@dna.uba.ar

La hipoacusia es el desorden neurosensorial con mayor prevalencia en los países desarrollados. El 50% sería genético y se conocen actualmente numerosos genes que pueden relacionarse con el daño auditivo. El 50% de las formas recesivas son causadas por mutaciones en los genes GJB2 y GJB6, los cuales codifican para la conexina 26 y 30 respectivamente. El otro 50% de los casos se debería a mutaciones en otros genes. Otra mutación estudiada es la Q829X en el exón 22 del gen OTOF, que codifica para la proteína otoferlina; tercera causa de sordera en España. En las hipoacusias no sindrómicas de herencia materna, la mutación A1555G en el gen MT-RNR1 (ADN mitocondrial) sensibilizaría a las células del oído interno a la toxicidad por aminoglucósidos. El objetivo del presente trabajo es realizar un screening genético en pacientes con hipoacusia no sindrómica en nuestro país. Se muestran los resultados de 424 muestras de ADN derivadas desde el año 2004 hasta la fecha. Se analizaron los genes GJB2, GJB6, OTOF, MT-RNR1. Se realizó el asesoramiento genético correspondiente según los resultados obtenidos. Se detectaron variaciones de secuencia en 144 de los 424 pacientes analizados (34%). En total se hallaron 38 mutaciones distintas en los genes GJB2 y GJB6. Dos mutaciones en el gen GJB2 resultaron nuevas. En ninguno de los pacientes se identificó la mutación Q829X en el gen OTOF ni la mutación A1555G en el gen MT-RNR1 demostrando que no serían en nuestra población tan frecuentes como se ha descrito en otras poblaciones. Se realizaron estudios funcionales mediante expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*, demostrando que ambas mutaciones descriptas por primera vez en este trabajo, tendrían un efecto nocivo en la funcionalidad de la proteína. Establecimos por primera vez un laboratorio de referencia de alta complejidad, para el diagnóstico genético y la investigación básica de hipoacusias en nuestro país.

#### 404. (434) ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE MICRODELECIONES EN PACIENTES CON SÍNDROME DE WILLIAMS-BEUREN

Delgado L.<sup>1</sup>; Pastene E.<sup>2</sup>; Mercado G.<sup>3</sup>; Augello B.<sup>4</sup>; Merla G.<sup>5</sup>  
 Centro Nacional de Genética Médica<sup>1 2 3</sup>; Casa Sollievo Della Sofferenza<sup>4 5</sup> lmdbsas2003@yahoo.com.ar

El Síndrome de Williams-Beuren (SWB) pertenece al grupo de enfermedades raras de origen genético (prevalencia estimada en 1:7000). Se manifiesta con múltiples signos clínicos como: dismorfias faciales, cardiopatía, retardo mental y un perfil cognitivo y personalidad únicos. La causa del SWB es una microdelección en la banda cromosómica 7q11.23, que determina la haploinsuficiencia de 25 a 30 genes. El 98% de los pacientes es portador de una microdelección de 1,5-1,8 Mb y el 2% restante presenta microdelecciones atípicas de tamaños diversos. Los casos atípicos con microdelecciones pequeñas, se asocian a un fenotipo atenuado, mientras que las microdelecciones mayores presentan un cuadro clínico más severo. Si bien las microdelecciones atípicas son poco frecuentes, aportan información de gran valor en la determinación de la correlación de los genes deletados con los múltiples signos clínicos. El diagnóstico clínico de SWB se confirma mediante la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH), sin embargo, esta metodología resulta insuficiente para determinar el tamaño de las microdelecciones. Con el fin de detectar microdelecciones atípicas que contribuyan a definir la correlación genotipo/fenotipo y a su vez, evaluar qué metodología es más adecuada para estimar el tamaño de las mismas, hemos analizado muestras de ADN de 25 pacientes con SWB (de un cohorte de 110 pacientes con microdelección confirmada por FISH) por medio de las técnicas PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y Amplificación de Sondas Múltiples Dependientes de Ligamiento (MLPA). En nuestra muestra detectamos una microdelección atípica de un tamaño aproximado de 1,3 Mb que no incluye al gen *GTF2I* ni a las dos

terceras partes del gen *GTF2IRD1*, normalmente deletados en los casos clásicos. Dicha microdelección no se detectó con la técnica MLPA pero sí con qPCR, lo cual revela que esta última técnica aportaría mayor flexibilidad y precisión en la estimación del tamaño de este tipo de anomalías cromosómicas.

#### 405. (479) Distrofia Muscular de Duchenne / Becker: IDENTIFICACIÓN DE UNA MUTACIÓN EN UN PACIENTE CON FENOTIPO INTERMEDIO

Ferreiro V.<sup>1</sup>; Giliberto F.<sup>2</sup>; Ferrer M.<sup>3</sup>; Francipane L.<sup>4</sup>; Díaz S.<sup>5</sup>; Roque Moreno M.<sup>6</sup>; Szijan I.<sup>7</sup>; Moya G.<sup>8</sup>;  
 Fundación Genos; División Neurocirugía, Hospital de Clínicas José de San Martín<sup>1, 3</sup>; Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>2, 7</sup>; División Genética Hospital de Clínicas José de San Martín<sup>4</sup>; Fundación Genos.<sup>5, 8</sup>; Laboratorio de Biología Celular y Molecular, IHEM-CONICET CCT-Mendoza, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.<sup>6</sup> veroferreiro@hotmail.com

La Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) es una de las enfermedades hereditarias más frecuentes (1:3500). Es recesiva, ligada al X, con síntomas clínicos progresivos y de evolución fatal. La Distrofia Muscular de Becker (DMB) es más benigna y menos frecuente. Ambas patologías se producen por mutaciones en el gen de la distrofina (Xp21). Principalmente grandes deleciones (70%), menos frecuentemente duplicaciones (20%) y raramente mutaciones puntuales (8 a 10%). Se realizó un estudio molecular en un paciente con clínica y estudios bioquímicos intermedios entre DMD y DMB. En una primera instancia se analizaron 16 exones por PCR multiplex no hallándose ningún exón deletado. Para la detección del 100% de deleciones y duplicaciones se realizó posteriormente un estudio de MLPA (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification) que no reveló ninguna alteración de este tipo. El objeto de la última etapa de la estrategia diagnóstica fue rastrear las mutaciones puntuales en las regiones codificantes y en las zonas de unión exón-intrón mediante Secuenciación directa. Este último estudio reveló la presencia de una mutación puntual en la 3ra base del intrón 46 (Ex46+3,c6762+3A>T). Dicha mutación teóricamente altera el correcto splicing del exón pudiéndose generar distintos productos de la distrofina, tanto normal como patológicos, lo que explicaría en parte el fenotipo observado en el paciente. Se quiere demostrar la importancia de la utilización de una estrategia diagnóstica particular y correcta para la resolución de casos complejos de Duchenne/Becker y para poder predecir lo más eficientemente la evolución de la enfermedad en cada paciente.

#### 406. (515) CARACTERIZACIÓN DE UN HAPLOTIPO INUSUAL CON DOBLE MUTACIÓN Y DOS COPIAS DEL GEN CYP21A2: IMPLICANCIAS EN EL DIAGNÓSTICO PRENATAL DE DEFICIENCIA DE 21-HIDROXILASA.

Marino R.<sup>1</sup>; Ramírez P.<sup>2</sup>; Galeano J.<sup>3</sup>; Pérez Garrido N.<sup>4</sup>; Warman M.<sup>5</sup>; Aiello H.<sup>6</sup>; Otaño L.<sup>7</sup>; Rivarola M.<sup>8</sup>; Belgorosky A.<sup>9</sup>  
 Servicio de Endocrinología Hospital de Pediatría J P Garrahan<sup>1 2 3 4 5</sup>; Unidad de Medicina Fetal Servicio de Obstetricia Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>6 7</sup>; Servicio de Endocrinología Hospital de Pediatría J P Garrahan<sup>8 9</sup>  
 marinorox@yahoo.com

El análisis molecular del gen CYP21A2 en muestras de ADN extraído de vellosidades coriales es utilizado para diagnosticar fetos afectados con deficiencia de 21-hidroxilasa (21OHD) y permite suspender el tratamiento prenatal en los casos innecesarios. Recientemente ha sido reportado un haplotipo con Q318X y una duplicación del gen CYP21A2 como un alelo raro, sin embargo estudios posteriores en diferentes poblaciones describen una frecuencia relativamente alta del mismo en individuos no afectados. La discriminación entre un alelo funcionalmente normal (mutación Q318X en uno de los genes CYP21A2 duplicados) y alelos con 21OHD (mutación Q318X sin duplicación del gen funcional) es de importancia, particularmente para el diagnóstico prenatal

y el consejo genético. Las técnicas de PCR alelo específica y secuenciación no detectan número de copias génicas, siendo los métodos de elección Southern blot y MLPA. Reportamos el estudio molecular de un paciente con 21OHD forma perdedora de sal y su familia. Caso índice: heterocigota compuesto para del8bp y Q318X. Madre: heterocigota para del8bp. Padre: heterocigota compuesto para Q318X y un haplotipo inusual con I236N-V237E-M239K e I172N en el mismo gen, duplicación del gen CYP21A2 y delección del pseudogen CYP21A1P. En un segundo embarazo se inició tratamiento con dexametasona. El diagnóstico prenatal reveló 46,XX y genotipo heterocigota compuesto para del8bp y el haplotipo mutado/duplicado. Se interpretó como feto femenino no afectado y se suspendió el tratamiento. La niña nació con genitales externos femeninos y la pesquisa neonatal para 17OHP fue normal. En conclusión, caracterizamos un haplotipo inusual no afectado con doble mutación y duplicación del gen CYP21A2. Este hallazgo avala la importancia del análisis del número de copias del gen CYP21A2 en el estudio de portadores, siempre que exista un alelo con cualquier mutación severa, para un correcto asesoramiento genético y diagnóstico prenatal.

#### 407. (718) ESTUDIO DE MUTACIONES PREVALENTES EN POBLACIÓN JUDÍA ASHKENAZI ARGENTINA

Foscaldi S.<sup>1</sup>; Gonzalez B.<sup>2</sup>; Moya G.<sup>3</sup>; Chertkoff L.<sup>4</sup>; Diaz S.<sup>5</sup>; Ferreiro V.<sup>5</sup>

Fundación Genos<sup>1,2,5</sup>; Fundación Genos; UCA<sup>3</sup>; Fundación Genos; Hospital Garrahan<sup>4</sup>; División Neurocirugía, Hospital de Clínicas "José de San Martín"<sup>6</sup>  
fosqui81@hotmail.com

Las enfermedades de Tay-Sachs, Canavan, Disautonomía Familiar, Niemann-Pick (tipo A), Anemia de Fanconi (grupo C), Síndrome de Bloom, Gaucher (Forma no neuronopática), mucopolisidosis tipo IV, y Enfermedad de depósito de glicógeno tipo 1, son todas condiciones autosómicas recesivas poco frecuentes que se encuentran predominantemente en personas con ascendencia judía Ashkenazi de Europa centro-oriental. Aunque la Fibrosis Quística no es un desorden estrictamente judío europeo, se recomienda su inclusión en el panel de estudio genético judío Ashkenazi dada la alta frecuencia de portadores dentro de la población general (1/27). Se ha reportado una frecuencia de portadores agregada para todos estos desórdenes en la población judía Ashkenazi de 1/4. Con el objeto de establecer el estado de portadores en 151 personas con dicha ascendencia que concurren a nuestra institución para asesoramiento genético preconcepcional y prenatal, se analizaron las mutaciones más frecuentemente reportadas de las patologías mencionadas mediante los kits comerciales Elucigene™ Ashplex 1, Elucigene™ Ashplex 2, Elucigene™ Gaucher, y Elucigene™ cf 29 v.2 (Tepnel®). El análisis de los resultados obtenidos en las PCRs alelo-específicas de los kits comerciales permitió detectar mutaciones responsables de las patologías en 32 personas (frecuencia aproximada: 1/5). La frecuencia observada en este estudio concuerda con la descripta para la población judía europea. Debido a la escasez de estudios epidemiológicos en población Ashkenazi argentina, cobra relevancia la información brindada por este estudio como una primera aproximación a los valores poblacionales argentinos, lo que permite enfatizar su importancia en la prevención de éstas enfermedades en la población judía Ashkenazi de nuestro país.

#### 408. (737) FRECUENCIA DE LA MUTACIÓN P.G111R EN LA POBLACIÓN ARGENTINA. EVIDENCIAS DE UN EFECTO FUNDADOR

Cerbino G.<sup>1</sup>; Gerez E.<sup>2</sup>; Batlle A.<sup>3</sup>; Parera V.<sup>4</sup>; Rossetti M.<sup>5</sup>

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias Departamento Química Biológica FCEyN- UBA CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>

gabriela.cerbino@gmail.com

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es un desorden autosómico dominante causado por una reducción en la actividad de la Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D). Su expresión clínica es

variable, determinada por factores ambientales, metabólicos y hormonales. En Argentina la PAI tiene una prevalencia de 1:100000 y, si bien la mayoría de las 300 mutaciones diferentes descritas a nivel mundial son privativas de unas pocas familias, la p.G111R está presente en el 52% de las familias argentinas. El objetivo de este trabajo fue investigar el origen de la elevada frecuencia de esta mutación en nuestra población. Se realizaron estudios bioquímicos de rutina y estudios genéticos por PCR y secuenciación automática. En el CIPYP, se encuentran diagnosticadas bioquímicamente 172 familias PAI, de las cuales 88 se analizaron a nivel molecular, 46 de ellas portan la mutación p.G111R. Se presentan resultados de las últimas 22 familias p.G111R analizadas: de los 103 individuos estudiados, 61 portan la mutación (59%) y de estos últimos, el 65% son mujeres. El 68% de las familias PAI p.G111R pertenecen al Noroeste Argentino y de ellas el 50% corresponden a la provincia de Tucumán. Del total de pacientes portadores de la mutación, el 45% son sintomáticos y de ellos el 85% son mujeres. Entre los portadores latentes, no se observa una diferencia significativa entre sexos. Se analizaron 13 SNPs distribuidos a lo largo del gen, encontrándose variabilidad en 6 de ellos (3119 G>T, 3581 A>G, 3982 T>C, 6479 G>T, 7064 C>A, 7539 C>T). El 100% de los portadores de la mutación p.G111R presentan el haplotipo (GATGAC). En el resto de los SNPs analizados (3651 C>T, 4679 C>T, 6589 A>G, 6761 A>G, 7052 A>G, 7998 A>G, 8003 G>A) no se observó variabilidad (CCAAAGG). Estos datos reflejarían una mayor penetrancia de la mutación p.G111R y un haplotipo común asociado a la misma en la población Argentina.

#### 409. (92) MATRICES DE COLÁGENO PARA INGENIERÍA DE TEJIDO: EFECTO DE LA TOPOGRAFÍA SUPERFICIAL SOBRE EL DESARROLLO OSTEÓBLÁSTICO

Cortizo A.<sup>1</sup>; Silvestre F.<sup>2</sup>; Ruderman G.<sup>3</sup>; Mogilner I.<sup>4</sup>; Tolosa E.<sup>5</sup>

Giom, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata<sup>1 2</sup>; IFLYSIB-CONICET-UNLP-CIC<sup>3 4 5</sup>  
cortizo@biol.unlp.edu.ar

El colágeno, la proteína más abundante del hueso, juega un rol fundamental en la integridad biológica y estructural del esqueleto. Previamente se han usado membranas de colágeno sin un orden molecular, para fabricar matrices para la regeneración del tejido óseo. Se sabe que la topografía superficial afecta el comportamiento celular, en particular la adhesión. El objetivo del presente trabajo es investigar el efecto de la topografía de superficie sobre la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos en cultivo. Se utilizó colágeno extraído del tendón de Aquiles bovino, nativo, con un grado de pureza de un 98% [Ruderman et al., 2007]. Se fabricaron matrices de colágeno no ordenado y de colágeno ordenado según patentes. Las características de la superficie de membranas se realizó por SEM y microscopía óptica (coloración de Sirius red), se estudió la rugosidad y humectabilidad de las membranas. Las membranas ordenadas mostraron una topografía típica en forma de canales en correlación con un ordenamiento molecular. Se evaluó la biocompatibilidad de células osteoblásticas crecidas sobre los dos tipos de películas de colágeno (No ordenado y ordenado). Se estudió la adhesión, proliferación (conteo de células teñidas con Giemsa) y diferenciación al fenotipo osteoblasto (expresión de fosfatasa alcalina y nódulos de mineralización). Se encontró que las células crecidas sobre las matrices de colágeno ordenado se adhieren más (1.5-1.7 veces) y crecen mejor (2.3-2.6 veces) que sobre las matrices de colágeno no ordenado. Osteoblastos diferenciados durante 4 semanas en un medio osteogénico (ácido ascórbico y beta-glicerofosfato) expresaron más fosfatasa alcalina (2.6 veces) y mineral en la matriz de colágeno ordenado. Los estudios preliminares sugieren que las características superficiales (ordenadas vs no ordenadas) de las matrices preparadas en base a colágeno natural regulan el desarrollo osteoblástico y podrían ser utilizadas en la regeneración del tejido.

#### 410. (249) EFECTO DE LAS CÉLULAS DE PAPILA DÉRMICA (DPC) HUMANA SOBRE LA GENERACIÓN DE UN SUS-

### TITULO DE PIEL COMPUESTO PERMANENTE A PARTIR DE CÉLULAS MADRE DEL BULGE DEL FOLÍCULO PILOSO HUMANO (HFSC) EN MATRICES DÉRMICAS ACELULARES PORCINAS.

Leirós G.<sup>1</sup>; Drago H.<sup>2</sup>; Bossi S.<sup>3</sup>; Kusinsky A.<sup>4</sup>; Stella I.<sup>5</sup>; Balaña M.<sup>6</sup>

Instituto de Ciencia y Tecnología Dr César Milstein (CONICET). Fundación Pablo Cassará<sup>1 4 6</sup>; Banco de tejidos-Hospital de Quemados de la Ciudad de Buenos Aires<sup>2 3</sup>; CEBBAD Universidad Maimónides<sup>5</sup>.  
gleiros@fundacioncassara.org.ar

Las construcciones de piel compuesta (dérmica-epidérmica) podrían ser una herramienta útil en el tratamiento de lesiones profundas y extensas de piel si presentan un reservorio de células precursoras que tornen la cobertura permanente. Las HFSC, capaces de diferenciarse a epidermis, glándulas sebáceas, y ocho tipos diferentes de células epiteliales del folículo piloso, constituyen una fuente interesante de estas células. En este trabajo estudiamos el efecto del co-cultivo de HFSC y DPC en la generación de un sustituto de piel compuesta permanente. Se usó como andamiaje una matriz dérmica acelular porcina, que fue sembrada con HFSC solas, en co-cultivo con DPC o con fibroblastos embrionarios de ratón (3T3-Swiss) en fase líquida o interfase líquido-gaseosa. Se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímica para p63, indicador de pluripotencialidad y capacidad proliferativa. Los cultivos en fase líquida de HFSC en la matriz dérmica, solas, con DPC o con 3T3 Swiss no mostraron diferencias significativas en los parámetros analizados. En interfase líquido-gaseosa, las matrices dérmicas con HFSC cocultivadas con DPC mostraron mayor ordenamiento y regularidad del epitelio estratificado generado. La presencia de DPC en estas matrices comparadas con aquellas con HFSC solas o con 3T3-Swiss, mostraron un mayor número de capas celulares epidérmicas ( $p < 0.05$ ), de células p63 positivas basales ( $p < 0.05$ ) y de invaginaciones epidérmicas ( $p < 0.05$ ). El mayor número de invaginaciones epidérmicas en los co-cultivos de HFSC con DPC indicaría intentos de generación de folículos pilosos, aunque su comprobación requerirá de más estudios. Los resultados obtenidos indican que la presencia de DPC en construcciones de piel compuesta generadas a partir de HFSC favorecería la formación de un epitelio estratificado más ordenado, con mayor número de capas epidérmicas y mayor cantidad de células precursoras epidérmicas en la región basal, propio de un sustituto de piel permanente.

### 411. (289) IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS IN SILICO DE GENES BLANCO PARA SOX2, OCT-4 Y NANOG EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS: POSIBLE REGULACIÓN POR PROTEÍNAS TGFβETA-SMAD.

Parra R.<sup>1</sup>; Rohr C.<sup>2</sup>; Galian E.<sup>3</sup>; Yankilevich P.<sup>4</sup>; Sakakiyamoto M.<sup>5</sup>; Derynck R.<sup>6</sup>; Perez Castro C.<sup>7</sup>

Universidad Nacional de Entre Ríos<sup>1 2</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA<sup>3</sup>; Integromics SK. -CNB (Centro Nacional de Biotecnología) España<sup>4</sup>; Department of Cell and Tissue Biology UC San Francisco USA<sup>5 6</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA<sup>7</sup>  
gonza\_parra@hotmail.com

Las células madre embrionarias (ESCs) pluripotentes pueden ser multiplicadas *in vitro* bajo determinadas condiciones de cultivo que favorecen la autoperpetuación y el mantenimiento del su estado pluripotencial. En caso de los ESCs humanas y de ratón, se han identificado un grupo conservado de factores de transcripción, como Oct-4, Sox-2 y Nanog que constituyen el "core", responsables en parte de mantener estos estados celulares indiferenciados. Asimismo, la actividad de la familia de proteínas TGFβeta/Smad (TGFβeta/Activina; BMPs) es requerida para sostener estos estados en ESCs. Sin embargo aun se desconoce los mecanismos moleculares a través de los cuales estas regulaciones ocurren o son moduladas en estas células. Mediante predicciones computacionales a través del diseño de nuevos algoritmos bioinformáticos, se buscaron posibles motivos de unión (o pegado) para proteínas del core transcripcional así como para proteínas

Smad en potenciales zonas regulatorias (-10 kb/+5kb) de genes expresados en ESCs. La ventaja principal del diseño de nuestros algoritmos fue permitir establecer restricciones y modificaciones adicionales a los parámetros y criterios de búsqueda en función de los datos experimentales, a diferencia de las herramientas computacionales ya existentes. Primeramente, validamos el diseño de nuestros algoritmos mediante la identificación de sitios de unión para estos factores en genes probados empíricamente para la ocupación conjunta de proteínas del core (factores de transcripción, remodeladores de cromatina, etc.) así como sobre genes candidatos para reprogramación celular (generación de células *iPS*). Luego, identificamos potenciales nuevos genes blanco involucrados en distintos procesos metabólicos que podrían tener roles importantes para la plasticidad celular de las ESCs. Nuestros resultados, luego de ser integrados, aportarían datos para generar un mapa de circuitos de regulación génica en ESCs y construir las bases para futuros estudios funcionales.

### 412. (494) DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS STEM DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO A CÉLULAS DE FENOTIPO NEURAL: ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DEL GEN OCT4

Quijano C.<sup>1</sup>; Cardozo A.<sup>2</sup>; Argibay P.<sup>3</sup>

ICBME, Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1 2 3</sup>  
analia.quijano@hospitalitaliano.org.ar

**Introducción:** Las células *stem* derivadas de tejido adiposo (ATSCs) son progenitores multipotentes derivados del mesodermo embrionario, muestran potencial de diferenciación específico de linaje y bajo condiciones especiales pueden dar lugar a células de linajes distintos al de origen. Este comportamiento plástico sugiere similitud funcional con las células *stem* embrionarias (ESCs). Otra semejanza entre ambos tipos celulares es la expresión del factor de transcripción embrionario OCT4. En ESCs, OCT4 inhibe genes tejido-específicos, promueve la autorreplicación y pluripotencialidad y es *down*-regulado durante la diferenciación celular. El gen OCT4 humano está ubicado en el cromosoma 6 y puede dar lugar a dos isoformas; OCT4A y OCT4B. **Objetivo:** En una población de hATSCs, estudiar la expresión de OCT4 y sus variantes de splicing OCT4A y OCT4B, durante la diferenciación neural *in vitro*. **Materiales y Métodos:** hATSCs fueron obtenidas a partir de 6 muestras de tejido adiposo humano de pacientes del Hospital Italiano de Buenos Aires, previa firma de consentimiento informado aprobado por el Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital, cultivadas y diferenciadas *in vitro* a fenotipo neural. La caracterización celular previo y post-diferenciación se realizó mediante inmunocitoquímica. La expresión de OCT4 y sus isoformas OCT4A y OCT4B fue evaluada mediante PCR en tiempo real. **Resultados:** Se evidenció expresión de OCT4 y OCT4A en hATSCs indiferenciadas. Luego de la inducción, la expresión de OCT4 disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ), mientras que OCT4A mostró leve disminución aunque no significativa. No se detectó expresión de la isoforma B antes ni luego de la inducción. **Conclusión:** La disminución de OCT4 post inducción podría atribuirse a la pérdida de potencialidad de las hATSCs, confirmando la adquisición de linaje neural. La carencia de significancia en la disminución de OCT4A post inducción podría atribuirse al reducido número de muestras.

### 413. (397) AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE MÉDULA ÓSEA DE OVEJA PARA SU UTILIZACIÓN EN REGENERACIÓN MIOCÁRDICA EXPERIMENTAL.

Olea F.<sup>1</sup>; Locatelli P.<sup>2</sup>; Pérez Sáez J.<sup>3</sup>; Sepúlveda D.<sup>4</sup>; Hnatiuk A.<sup>5</sup>; Bussmann ú.<sup>6</sup>; Bercovich A.<sup>7</sup>; Laguens R.<sup>8</sup>; Crottogini A.<sup>9</sup>

Universidad Favaloro<sup>1 2 4 5 8 9</sup>; BIO SIDUS<sup>3 7</sup>; IBYME<sup>6</sup>  
dolea@favaloro.edu.ar

Las células mesenquimales (MSCs) de médula ósea (MO) han demostrado tener efectos regenerativos en el infarto agudo de miocardio (IAM) experimental, probablemente a través de un efecto parácrino liberando factores de crecimiento. Por otra



parte, hemos demostrado que en ovejas con IAM la transfección con un plásmido codificante para VEGF165 humano (pVEGF165) disminuye el tamaño del IAM y mejora la función ventricular. Por lo tanto, se esperaría que las MSCs modificadas para sobreexpresar VEGF tengan mayor efecto beneficioso que las MSCs no modificadas. Como primer paso para demostrarlo, nuestro objetivo fue aislar e identificar MSCs de MO ovinas, transfectarlas con el pVEGF165 y rastrear su presencia en el miocardio inyectado con las mismas. **Métodos:** En 10 ovejas adultas se extrajo MO por punción de cresta ilíaca. Se aislaron las células mononucleares por gradiente de Ficoll-Hypaque 1077 g/mL, y se cultivaron en DMEM más SFB las adherentes hasta confluencia y pasaje 4. Estas células se identificaron por citometría de flujo con anticuerpos contra CD44, CD166 y CD45, y por su diferenciación a adipocitos. Luego se las transfectó con un plásmido codificante para GFP y se comparó la eficiencia de transfección utilizando distintos reactivos (Lipofectamine 2000, Superfectine y GeneJuice) a diferentes concentraciones. Una vez optimizada la técnica de transfección, las MSCs se transfectaron con pVEGF165, se marcaron con CM Dil, y se inyectaron en el miocardio ovino peri-infarto para rastrearlas a 6 días de inyectadas. **Resultados:** Se confirmó que las células eran MSCs por su perfil inmunológico (CD44<sup>+</sup>, CD166<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>) y su diferenciación a adipocitos. Las MSCs transfectadas se detectaron en el miocardio peri-infarto por inmunofluorescencia y tinción con DAPI. **Conclusión:** Es posible aislar, identificar y transfectar MSCs ovinas, y detectar su viabilidad hasta por lo menos 6 días post-inyección, haciendo factible su utilización en protocolos de regeneración miocárdica experimental.

#### 414. (407) REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS MURINOS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Solari C.<sup>1,2</sup>; Luzzani C.<sup>2</sup>; Losino N.<sup>3</sup>; Bluguermann C.<sup>4</sup>; Fernández D.<sup>5</sup>; Questa M.<sup>6</sup>; Baraño L.<sup>7</sup>; Miriuka S.<sup>8</sup>; Guberman A.<sup>9</sup>

Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en el Crecimiento, Supervivencia y Diferenciación Celular, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA<sup>1 2 3 7 9</sup>; Laboratorio de Biología del desarrollo Celular, FLEN<sup>4 5 6 8</sup> cmsolari@qb.fcen.uba.ar

El desarrollo de las células madre pluripotentes inducidas (CMPI) mejora significativamente las perspectivas de la aplicación de células madre en medicina regenerativa porque presenta la posibilidad del desarrollo de células específicas, disminuyendo el problema de histocompatibilidad. Estas células se obtienen por desdiferenciación de células somáticas terminalmente diferenciadas que luego pueden ser diferenciadas a múltiples tipos celulares de interés. Si bien han surgido innumerables trabajos desde su desarrollo, aún deben superarse importantes obstáculos para su aplicación clínica. Nuestro objetivo consiste en estudiar distintas condiciones para la obtención de CMPI murinas. Para ello produjimos partículas lentivirales mediante transfección de células HEK293T con vectores codificantes de los factores de transcripción involucrados en la reprogramación. Evaluamos distintos agentes y condiciones de transfección, sistemas empaquetadores y condiciones de transducción de fibroblastos embrionarios murinos. En las condiciones que resultaron óptimas (transfección con único vector que expresa Oct4, Sox2, Klf4 y un gen reportero, presencia de polybrene, centrifugación durante la transducción y agregado de ácido valproico al cultivo), obtuvimos colonias de CMPI a partir de los 10 días post-transducción. Estas presentaron una morfología similar a la de las células madre embrionarias (CME) y expresaron el gen reportero. Dichas colonias fueron aisladas, amplificadas y a partir de ellas establecimos líneas celulares que expresaron marcadores de estado indiferenciado característicos de las CME, como Oct4, SSEA1 y Nanog, detectados por inmunofluorescencia y/o qRT-PCR. Actualmente, continuamos con la caracterización de las CMPI obtenidas, evaluando su pluripotencia mediante ensayos de diferenciación. Planeamos utilizar estas CMPI para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de desdiferenciación y diferenciación hacia linajes de interés terapéutico.

#### 415. (501) CULTIVO DE CARDIOMIOBLASTOS OVINOS Y MURINOS SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEALES ACTIVADOS

Sepulveda D.<sup>1</sup>; Olea D.<sup>2</sup>; Locatelli P.<sup>3</sup>; Iguain P.<sup>4</sup>; Crottogini A.<sup>5</sup>; Laguens R.<sup>6</sup>

Universidad Favaloro<sup>1 2 3 4 5 6</sup> sepulvedadianaa@gmail.com

La terapéutica celular con progenitores indiferenciados residentes en el corazón adulto representa una de las modalidades en desarrollo para el tratamiento de cardiopatías humanas. El desarrollo "in vitro" de estas células demanda por lo menos varias semanas y requiere el empleo de matrices de adhesión y numerosos factores de crecimiento. Ello implica, además de un elevado costo, la imposibilidad de realizar terapia celular autóloga en corto tiempo, restringiendo su uso a situaciones crónicas. Dado que los macrófagos activados segregan numerosos factores de crecimiento, se decidió cultivar células cardíacas o fragmentos de corazón sobre una monocapa de macrófagos peritoneales activados, con el fin de indagar si este procedimiento era eficiente para la obtención de cardiomioblastos. Se obtuvieron macrófagos peritoneales murinos activados por la inyección ip de tioglicolato. Después de su adhesión espontánea en placas plásticas se cultivaron con DMEM y 20% SBF. Tres días después se incorporaron células cardíacas adultas murinas u ovinas obtenidas por digestión con colagenasa, o fragmentos de corazón. A los 7 días se observó el crecimiento de una monocapa de células cuadrangulares y de esferas, de las que se obtuvieron líneas celulares. El estudio inmunohistoquímico mostró que las esferas estaban formadas por una población heterogénea de células "stem" (sca y c-kit positivas), musculares lisas, endoteliales y cardíacas. Las células de las monocapas, y de las líneas celulares obtenidas de las monocapas o de las esferas, mostraron marcadores de músculo liso y cardíaco (actina de músculo liso, actina sarcomérica, desmina y conexina 43). Los resultados fueron similares con corazones de oveja o de ratón. Nuestros resultados indican que el empleo de macrófagos activados permite cultivar células del corazón adulto con capacidad de diferenciarse en músculo cardíaco y liso en un tiempo relativamente corto y sin el empleo de factores de crecimiento o matrices de adhesión.

#### 416. (683) SOBREVIDA Y DIFERENCIACIÓN DE MIOBLASTOS OVINOS CULTIVADOS CON MACRÓFAGOS PERITONEALES ACTIVADOS EN UN MODELO ALOGÉNICO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Sepulveda D.<sup>1</sup>; Olea D.<sup>2</sup>; Locatelli P.<sup>3</sup>; Besansón M.<sup>4</sup>; Crottogini A.<sup>5</sup>; Laguens R.<sup>6</sup>

Universidad Favaloro<sup>1 2 3 4 5 6</sup> sepulvedadianaa@gmail.com

La terapéutica celular con progenitores indiferenciados residentes en el corazón adulto cultivados in vitro representa una de las modalidades en desarrollo para el tratamiento de cardiopatías humanas. En nuestro laboratorio se desarrolló un modelo de cultivo de miocardioblastos y células musculares lisas ovinas a partir del co-cultivo con macrófagos peritoneales activados. Para poder ser empleadas en terapéutica celular es de importancia determinar su viabilidad, su capacidad de diferenciación en células contráctiles y su estabilidad en el tiempo después del implante en el corazón. Se obtuvieron líneas celulares de miocardioblastos ovinos a partir de esferas de cultivos primarios de células de corazón y cultivadas sobre una monocapa de macrófagos peritoneales murinos activados. Las células se incubaron con PKH26, un colorante fluorescente vital de membrana que no afecta la viabilidad celular y perdura en el tiempo. Se indujo infarto agudo de miocardio en ovejas por ligadura de la coronaria DA y luego se inyectaron en su periferia 2x10<sup>7</sup> células incubadas con PKH26, suspendidas en DMEM y repartidas en 5 inyecciones de 0.2 ml. Los animales se sacrificaron a los 7 y 15 días después del infarto y recibieron diariamente ciclosporina y dexametasona. De la zona del infarto y miocardio adyacente se obtuvieron cortes con un criostato en los que se pesquisó con técnicas de inmunofluorescencia la

presencia de células marcadas con PKH26, actinina, actina de músculo liso y desmina. A los 7 y 15 días después del infarto se observaron cúmulos de células intensamente marcadas con PKH26. Las mismas células rindieron tinción positiva después de la incubación con anticuerpos monoclonales anti actinina y desmina, y mostraron sarcómeros. Estos resultados indican que los miocardioblastos ovinos alogénicos derivados de co-cultivos primarios con macrófagos activados sobreviven hasta 15 días en la periferia de un infarto agudo de miocardio y parecen diferenciarse a cardiomiocitos.

#### 417. (807) VALORACIÓN DEL IMPLANTE EN EL TRASPLANTE DE CÉLULAS HEPÁTICAS EN RATAS ADULTAS.

Bologna A.<sup>1</sup>; Arnejo A.<sup>2</sup>; Torres Fuenzalida J.<sup>3</sup>; Hidalgo A.<sup>4</sup>; Gonzalez S.<sup>5</sup>; Sesarini C.<sup>6</sup>; Barbich M.<sup>7</sup>

ICBME. Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
anselmo.bologna@hospitalitaliano.org.ar

La identificación y cuantificación de las células implantadas constituye uno de los aspectos más problemáticos del trasplante de células hepáticas. La identificación mediante técnicas histológicas solamente, impide realizar una valoración cuantitativa del implante, dado lo azaroso y heterogéneo de la distribución de las células luego de su infusión por vía portal, sumado a la baja tasa de anidación. El objetivo de este trabajo fue la valoración del implante de células hepáticas en ratas, mediante la marcación de las células trasplantadas con sustancias fluorescentes y la detección del gen Sry del cromosoma Y, a fin de establecer la presencia de las células trasplantadas y cuantificar la masa celular implantada. Para ello, se utilizaron ratas Wistar macho como donantes y hembras como receptoras. Las células trasplantadas se marcaron con los fluoróforos DAPI o CFSE. Asimismo, en otro grupo de animales (n =4) los hígados de las hembras receptoras fueron procesados y analizados mediante PCR RT, con fin de determinar la presencia del gen Sry. La normalización de los resultados obtenidos a través de la aplicación de un control interno permitió la cuantificación relativa del gen y por lo tanto del material genético del donante. De los marcadores fluorescentes, el DAPI, evidenció una importante dispersión de la marca hacia el tejido circundante (3 de 4 animales trasplantados), impidiendo la identificación del material trasplantado, mientras la CFSE permitió la correcta identificación de las células del donante en la totalidad de los animales trasplantados (n= 7). La detección del gen Sry demostró la presencia de material genético del donante en todos los animales trasplantados (n =4) tanto a las 48 hs como a los 7 días postrasplante permitiendo comparar, en unidades relativas, las masas celulares. Nuestros resultados nos indican la factibilidad de detectar y cuantificar el material trasplantado en animales de experimentación.

## INMUNOLOGÍA 2

#### 418. (439) FRECUENCIA DEL ANTÍGENO DIEGO A (DIA) EN ROSARIO, ARGENTINA

De La Vega Elena C.<sup>1</sup>; Matos Bayeau A.<sup>2</sup>; Pivetta M.<sup>3</sup>; Rallón M.<sup>4</sup>; Chialina S.<sup>5</sup>; Fornes C.<sup>6</sup>; González L.<sup>7</sup>; Solís E.<sup>8</sup>  
Servicio de Hematología y Medicina Transfusional. Hospital Italiano Garibaldi. Rosario, Argentina.<sup>1 3 4 8</sup>; Banco Provincial de Sangre de Santiago de Cuba, Cuba.<sup>2</sup>; Centro de Sangre de la Municipalidad de Rosario, Argentina.<sup>5 6 7</sup>  
daniel.delavega@yahoo.com

El antígeno Di<sup>a</sup> es raro en caucásicos pero relativamente frecuente en poblaciones de origen mongoloide, variando entre 1-3% en asiáticos hasta 54% en grupos amerindios sudamericanos. Los anticuerpos anti-Di<sup>a</sup> han sido identificados como responsables de casos graves de Enfermedad Hemolítica Feto-Neonatal (EHFN) y de Reacciones Hemolíticas Transfusionales. Debido a que los paneles globulares comerciales usados en el screening de anticuerpos irregulares en Argentina no contienen glóbulos rojos Di(a+), la detección de los anticuerpos anti-Di<sup>a</sup> en gestantes y pacientes presenta grandes dificultades. A raíz del diagnósti-

co reciente de dos casos de EHFN por anti-Di<sup>a</sup> en el Servicio de Hematología y Medicina Transfusional del Hospital Italiano Garibaldi y a una significativa cantidad de reportes similares en la región, se decidió caracterizar la población de Rosario para este antígeno. Se fenotipificaron 335 donantes de sangre no relacionados del Centro de Sangre de la Municipalidad de Rosario (n=145) y del Hospital Italiano Garibaldi (n=190), utilizando la técnica Liss-Coombs en tubo y dos antisueros humanos anti-Di<sup>a</sup>. La prueba de Homogeneidad (Chi<sup>2</sup>) para las frecuencias obtenidas entre los donantes de ambos centros no arrojó diferencias estadísticamente significativas. La frecuencia del antígeno Di<sup>a</sup> en los donantes de sangre de Rosario estudiados fue de 6,3%. Utilizando la ley de Hardy-Weinberg se estimaron en 0,4%, 5,9% y 93,7% las frecuencias de los fenotipos Di(a+b-), Di(a+b+) y Di(a-b+) respectivamente. Estas frecuencias resultaron ser similares a las informadas en La Plata (Argentina) y varias ciudades de Corea y Brasil, donde se han reportado un gran número de casos de aloinmunización y EHFN. En Rosario, con un 3,5% de las gestaciones y un 5,5% de las transfusiones potencialmente incompatibles para el antígeno Di<sup>a</sup>, la utilización de paneles globulares que expresen el antígeno para el screening de anticuerpos irregulares parecería justificada.

#### 419. (35) MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE POR BENZNIDAZOL: EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR NUCLEAR KB Y LA PROTEÍNA P-38 HEPÁTICOS

Ronco M.<sup>1</sup>; Francés D.<sup>2</sup>; Manarin R.<sup>3</sup>; Ingaramo P.<sup>4</sup>; Alvarez M.<sup>5</sup>; Revelli S.<sup>6</sup>; Carnovale C.<sup>7</sup>

Instituto de Fisiología Experimental IFISE CONICET<sup>1 2 4 5 6 7</sup>; Instituto De Immunología. Facultad De Ciencias Médicas. UNR<sup>3</sup>  
tereronco@hotmail.com

Anteriormente demostramos que el tratamiento con Benznidazol (BZL) producía una disminución de los niveles séricos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) acompañado de una menor expresión hepática del ARNm de dicho mediador inflamatorio en ratones con peritonitis séptica experimental. Nos propusimos evaluar si BZL ejercía su rol anti-inflamatorio modulando la actividad del factor nuclear kB (NFkB) y de la proteína p-38 en el hígado de ratones sometidos al modelo de ligación y punción cecal (CLP). Se utilizaron ratones C57BL/6 de 8-10 semanas que fueron separados en 4 grupos (n=6): Sham; Sham+BZL; CLP; CLP+BZL. El BZL se administró por sonda naso gástrica, 25 mg/kg pc, 2 horas antes de la cirugía y cada 12 hs post-CLP. Los animales Sham y CLP recibieron el vehículo del BZL. Los animales fueron sacrificados a las 24 hs post-cirugía. Sh vs Sh+BZL no mostraron diferencias significativas. El grado de activación de la vía mediada por TNF $\alpha$  en el hígado de los ratones CLP se estudió por *western-blot* de TNF $\alpha$  en lisado-total (Unidades arbitrarias de densitometría (UA): Sh:184 $\pm$ 5; CLP:393 $\pm$ 28\*; CLP+BZL:269 $\pm$ 47#) y de su receptor TNFR1 en membrana plasmática (UA:Sh:148 $\pm$ 10; CLP:338 $\pm$ 22\*; CLP+BZL:41 $\pm$ 12#). En extracto nuclear hepático se determinó la actividad de NFkB (colorimetría; Sh:0,16 $\pm$ 0,05; CLP:0,26 $\pm$ 0,09\*; CLP+BZL:0,16 $\pm$ 0,05#). Detección IKK $\alpha$ /b-fosforilada en lisado-total hepático por *western-blot*. (UA) Sh:162 $\pm$ 45; CLP:440 $\pm$ 22\*; CLP+BZL:149 $\pm$ 25#. *Western-blot* de la proteína p-38 fosforilada en lisado-total: (UA) Sh:20 $\pm$ 1; CLP:88 $\pm$ 12\*; CLP+BZL: 45 $\pm$ 6#Sh. (\*p<0,05vs Sh; #p<0,05vs CLP). Nuestros resultados sugieren que el proceso inflamatorio que existe en el grupo CLP es inducido por el aumento de la vía de TNF $\alpha$ . El efecto modulador de esta respuesta por BZL sería a través de dos vías: inhibición de la actividad nuclear de NFkB por disminución de la fosforilación de IKK $\alpha$ /b que favorecería la retención del factor kB en el citoplasma; y por la disminución de la fosforilación de la proteína p-38.

#### 420. (53) EVIDENCIAS DE TRANSMISIÓN MATERNO-FETAL DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV)

Girgulsky L.<sup>1</sup>; López Ferrucci M.<sup>2</sup>; Cohen E.<sup>3</sup>; Morin A.<sup>4</sup>; Mauro J.<sup>5</sup>; Eiguchi K.<sup>6</sup>

Cátedra de Bioquímica e Inmunología. USAL.<sup>1 2 6</sup>; Servicio de Ginecología. Htal. Gral de Agudos "Carlos G Durand"<sup>4 5</sup>.  
lgirgulsky@yahoo.com.ar

El Papilomavirus Humano (HPV) es un virus de transmisión principalmente sexual. Las formas de transmisión viral en niños continúa siendo controvertida, proponiéndose distintos mecanismos como transmisión vertical de madre a feto, transmisión por infección ascendente y/o transmisión in útero hematogénicamente. La detección de ADN viral en sangre materna ha arrojado resultados controvertidos, por lo que la viremia podría ser una vía de propagación no documentada aún. *Objetivo:* Evaluar la presencia de ADN viral en sangre periférica en mujeres con lesiones cervicales. *Materiales y métodos:* se analizaron 100 biopsias de tejido cervical y 71 de sangre periférica (Control G1 n=9/2, CIN I G2 n=22/19, CIN II/III G3 n=33/20, Carcinomas G4 n=36/30 respectivamente) recolectadas en el Hospital Gral de Agudos "C. G. Durand". La detección de ADN viral se realizó mediante PCR con cebadores MY09/MY11. Éste trabajo cuenta con el aval del CODEI del Htal. G. Agudos "C. G. Durand". *Resultados:* se observó mayor frecuencia de genoma viral en lesiones de bajo (G1 0.73 p<0.05), alto grado (G3 0.76 p<0.05) y Carcinomas (G4 0.94 p<0.001) en comparación con el grupo G1 (0.22). La presencia de genoma viral en sangre periférica no mostró diferencias significativas entre grupos (G1 0.0, G2 0.16, G3 0.30, G4 0.23) y fue significativamente menor a la observada en muestras de biopsias (p<0.001). *Conclusión:* Aunque no significativamente importante, la presencia de HPV en sangre periférica permitiría inferir la posibilidad de infección hematogénica, durante la gestación (transplacentariamente) y/o durante el parto (por contaminación). La determinación de los modos y el riesgo de transmisión maternofetal es de gran importancia a fin de efectivizar el diagnóstico en niños, donde el abuso sexual entra siempre en consideración, la tasa de transmisión en mujeres asintomáticas y las estrategias de inmunización por vacunas profilácticas.

**421. (214) CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE TRANSPORTE DE MEMBRANA DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EN UN MODELO DE ASMA MURINO**

Chiurazzi R.<sup>1</sup>; Romero Y.<sup>2</sup>; Fenoy I.<sup>3</sup>; Amorena C.<sup>4</sup>; Goldman A.<sup>5</sup>  
CESYMA UNSAM<sup>1 2 3 4 5</sup>  
rovach@msn.com

Los macrófagos alveolares (MA) juegan un rol significativo en la inflamación alérgica (IA). Los canales iónicos son importantes para la funcionalidad de los macrófagos. Kv1.3 es el subtipo expresado en linfocitos T, B y macrófagos. Hemos detectado previamente en MA de ratones con IA pulmonar, la presencia de corrientes típicamente "outward rectifier" con un potencial de equilibrio de -80 mV, característico de un canal de K<sup>+</sup>. El mismo tipo de corriente se observó en animales normales. Los MA de animales con IA mostraron un aumento en la superficie celular, medido por capacitancia. El bloqueo del canal de K<sup>+</sup> con carbodotóxina y la despolarización con alto K<sup>+</sup> inhibieron la producción de ROS, en los MA de animales con IA. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión transcripcional del canal Kv1.3 y obtener así una descripción más completa de los sistemas de transporte de la membrana celular de estos MA. Ratones BALB/c se sensibilizaron (ip) y desafiaron con OVA (vía aérea). Determinamos, por citometría de flujo, que los MA de animales con IA poseen mayor superficie celular (coincidiendo con mediciones de capacitancia) y mayor granulosidad respecto de los normales. La expresión transcripcional del canal Kv1.3, medida por qPCR, fue menor en los animales con IA tanto en condiciones en la que se normalizó por GAPDH (unidades relativas, IA: 0,58 ± 0,14 vs normales: 1,30 ± 0,42, p<0,05) como cuando se midió en base a la cantidad absoluta de mRNA (en función del Ct, IA: 20,87 ± 0,19 vs normales: 19,74 ± 0,26, p<0,05). Se realizó el análisis con ambos métodos ya que la normalización con GAPDH ha sido cuestionada. En vista de la relación que existe entre la generación de ROS y la actividad de la Na-K ATPasa, la que está vinculada a canales de K<sup>+</sup>, proponemos que la regulación de sistemas de transporte se encuentra afectada en los MA de animales con IA y que el aumento de ROS estaría implicado en esas modificaciones.

**422. (287) ASOCIACIÓN ENTRE ANTICUERPOS SÉRICOS BETA1-ADRENÉRGICOS Y VARIACIONES EN LA FRECUENCIA CARDIACA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD PERIODONTAL**

Ganzinelli S.<sup>1</sup>; Segovia M.<sup>2</sup>; Borda E.<sup>3</sup>; Sterin-Borda L.<sup>4</sup>  
Cátedra de Farmacología - FOUBA; CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
sbganzinelli@yahoo.com

Existen antecedentes que demuestran una asociación entre periodontitis avanzada y enfermedad cardíaca. La enfermedad periodontal (EP) es el resultado de una reacción autoinmune, inducida por un desequilibrio entre la agresión bacteriana y la resistencia del huésped. Hemos descripto anticuerpos séricos con actividad β1 adrenérgica capaces de interactuar con epitopes del periodonto. En este trabajo exploramos factores inmunológicos no aterogénicos, capaces de interactuar con los receptores α1 adrenérgicos del miocardio. Se realizó un estudio en 36 pacientes con EP crónica avanzada y 20 sujetos normales con el objeto de identificar por ELISA anticuerpos contra membrana cardíaca y contra un péptido sintético de secuencia aminoácídica idéntica al segundo rulo extracelular del receptor humano β1 adrenérgico. Asimismo, se estudió la "heart rate variability" (HRV) en estos pacientes por medio del método Poincare plot, analizándose la secuencia de patrones R-R generados entre las 22:00 y las 08:00 horas. De los pacientes estudiados, reaccionaron positivamente contra membrana cardíaca 28/36 (77,7%) y 23/28 (82,2%) fueron positivos contra el péptido sintético β1 adrenérgico. De los pacientes positivos contra el péptido sintético β1 adrenérgico 21/23 (90%) presentaron disminución del índice HRV: media±desviación standard [X±DS] (normal: 91±16; EP: 73±13), como se ha descripto con el tratamiento "in vivo" con un agonista parcial. Por otra parte, la fracción IgG purificada a partir del péptido α1 adrenérgico (IgG anti β1) se mostró biológicamente activa sobre la actividad cardíaca auricular de rata, comportándose como un agonista parcial (dF/dt [X±ESM]: IgG anti β1 10<sup>-7</sup>M: +50±4% n=21; IgG anti α1 10<sup>-6</sup>M: -45±3%; n=21). Se concluye que las variaciones en la HRV de los pacientes con EP obedecen al patrón de agonismo α1 adrenérgico parcial, coincidiendo con la capacidad agonística parcial de los autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes con EP sobre el miocardio aislado.

**423. (396) EFECTO DE BISFENOL-A SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-6 E IL-8 EN QUERATINOCITOS HACAT Y SU RELACIÓN CON LA DOPAMINA.**

Parrado A.<sup>1</sup>; Müller K.<sup>2</sup>; Apicella C.<sup>3</sup>; Gentile T.<sup>4</sup>; Rey-Roldán E.<sup>5</sup>  
Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Instituto de Estudios de La Inmunidad Humoral Dr Ra Margni, CONICET, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
estelar@ffyub.uba.ar

Demostremos previamente que el neurotransmisor dopamina (DA) aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) en queratinocitos. Se sugiere que el bisfenol-A (BPA), un disruptor endócrino utilizado en la manufactura de plásticos y resinas epoxi, podría estar involucrado en la respuesta inmune inflamatoria e interferir con la transmisión dopaminérgica en el sistema nervioso. En este trabajo evaluamos el efecto de BPA basal y en presencia de dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8 (ELISA) y sobre la proliferación celular (WST-1) en queratinocitos HaCaT luego de 24 hs de incubación. Las células se incubaron con BPA (10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-5</sup> M) y se seleccionaron las concentraciones 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-6</sup> para tratar en combinación con dopamina (10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>M). *Resultados:* Observamos que BPA no afectó la secreción basal de IL-6 e IL-8 a las concentraciones utilizadas. La DA 10<sup>-5</sup> M aumentó significativamente la producción de IL-6 (448,2 ± 21,0%, p<0.001) y de IL-8 (166,8 ± 4,1%, p<0.05). Las concentraciones de BPA 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-6</sup> M no modificaron significativamente la secreción de IL-6 aumentada por dopamina 10<sup>-5</sup> M (BPA 10<sup>-8</sup>= 85,3 ± 14,7%; BPA 10<sup>-8</sup> + DA 10<sup>-5</sup> M= 420,4 ± 27,7% p<0.001; BPA 10<sup>-6</sup>= 83,5 ± 16,6%; BPA 10<sup>-6</sup> + DA 10<sup>-5</sup> M= 437,4 ± 28,1%, p<0.001) y tampoco de IL-8 (BPA 10<sup>-8</sup>= 112,8 ± 5,4%; BPA 10<sup>-8</sup> + DA 10<sup>-5</sup> M= 194,3 ± 20,4 %, p<0.001; BPA 10<sup>-6</sup>

= 109,0 ± 0,5%; BPA 10<sup>-6</sup> + DA 10<sup>-5</sup> M= 150,8 ± 9,2 % p<0.05). Dopamina 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup> no alteró significativamente la producción de las citoquinas estudiadas y tampoco en combinación con BPA 10<sup>-8</sup> o 10<sup>-6</sup> M. En estos ensayos no se observaron diferencias significativas en la proliferación celular. *Conclusión:* nuestros resultados preliminares sugieren que el tóxico ambiental bisfenol-A no afectaría, a tiempos cortos, la proliferación celular ni la producción de algunas citoquinas proinflamatorias en queratinocitos humanos y tampoco interferiría en la respuesta a la dopamina.

**424. (553) PERFIL INMUNOLÓGICO EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA INMUNOEDICIÓN TUMORAL EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO**  
Pagura L.<sup>1</sup>; Cáceres J.<sup>2</sup>; Rico M.<sup>3</sup>; Lattante R.<sup>4</sup>; Sacchi L.<sup>5</sup>; Di Masso R.<sup>6</sup>; Rozados V.<sup>7</sup>

*Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, CIC-UNR<sup>1 2 3 6 7</sup>; Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>4</sup>; Patología General y Especial Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR<sup>5</sup>. lucpag@hotmail.com*

La inmunoección, que comprende el potencial protector del huésped y las características del tumor esculpidas por el sistema inmune durante el desarrollo tumoral, consta de tres fases: equilibrio (EQ), eliminación (EL) y escape (ES). El adenocarcinoma de mama M-406 originario de la línea CBI, muestra 100% de toma, 0% de regresión y 100% de letalidad. En la línea CBI/L FS, originada por selección por conformación corporal a partir de CBI, M-406 tiene 100% de toma; luego de un tiempo de crecimiento algunos tumores entran en un estado de ES, EL o EQ, a partir del cual algunos tumores son eliminados (EL) y otros escapan del equilibrio tumor-huésped y se toman letales (ES), comportamiento asimilable a las tres etapas de la inmunoección. Con el objetivo de determinar el perfil inmunológico Th1/Th2 de los animales en los diferentes estadios de progresión tumoral (ES y EL), se desafiaron ratones CBI/L FS en forma s.c. con M-406. Se determinó la concentración sérica de IL-2/INF $\gamma$  (Th1) e IL-4/IL-10 (Th2) por ELISA y se tomaron muestras tumorales para estudios histológicos de portadores de tumores en ES y EL. Los valores de IL-10 (Th2) e INF $\gamma$  (Th1) fueron mayores en el grupo de animales con tumores en EL respecto de los en ES (p=0,0227; p=0,0091 respectivamente). No se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-2 (Th1) e IL-4 (Th2). Tanto en EL como en ES no se observó tendencia hacia una respuesta Th1 o Th2. El análisis histológico de las muestras tumorales mostró una respuesta peritumoral variable siendo menor en los tumores del grupo ES y mayor en el grupo EL. Los resultados obtenidos hasta el momento, si bien muestran diferencias en los niveles de citoquinas séricas (INF $\alpha$  e IL-10), no permiten explicar los estadios de EL y ES a partir de las mismas, debiendo profundizar el estudio de otros marcadores relacionados con la respuesta inmune que permitan caracterizar las distintas etapas (EL y ES) del crecimiento del adenocarcinoma de mama M-406 en CBI/L.

**425. (620) EVOLUCIÓN DE INTERLEUQUINAS TH1/TH2 EN LA PRIMAINFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS (TS) EN RATONES CBI/IGE SUSCEPTIBLES AL PARÁSITO**

Vasconi M.<sup>1</sup>; Codina A.<sup>2</sup>; Bertorini G.<sup>3</sup>; Di Masso R.<sup>4</sup>; Hinrichsen L.<sup>5</sup>

*Instituto de Genética Experimental (IGE), Facultad de Ciencias Médicas; Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario<sup>1 2 4 5</sup>; Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario<sup>3</sup> mdvasconi@yahoo.com.ar*

Numerosas experiencias señalan que el resultado de la infección por parásitos depende en gran medida de la capacidad del huésped para generar anticuerpos, montar una respuesta inmune celular, desarrollar actividad NK y producir citoquinas, es decir montar una respuesta inmune normal, que está claramente bajo control génico. Se conoce poco sobre la base inmunológica de

los cambios de la fisiología intestinal asociados a la expulsión de los gusanos, aunque se acepta que la respuesta Th2 generada en la infección por nematodos juega un rol importante en ello. Para evaluar el papel de Th1/Th2 en la primoinfección con *Trichinella spiralis*, se analizó la evolución del perfil Th1/Th2 de ratones de la línea CBI+ del modelo murino desarrollado en el IGE, susceptible a Ts, en las etapas aguda y crónica de la infección. Se utilizaron machos y hembras adultos (n=4 por sexo), infectadas por vía oral con 2 larvas infectantes L1 de Ts por g de peso corporal. Los ratones se sacrificaron en la fase entérica (días 6 y 13 post-infección, p-i) y en la parenteral (30-40 días p-i) para analizar la concentración sérica de INF $\alpha$ , IL-2, IL-4 e IL-10 (ELISA); en el período crónico se determinó también la carga parasitaria en lengua (CP por g de tejido). Los valores de INF $\gamma$  e IL-4 fueron significativamente mayores en la etapa crónica que en la aguda (p=0.021 y p=0.027 respectivamente) mientras que los niveles séricos de IL-10 disminuyeron en ese lapso (p=0.001); IL-2 tuvo valores muy bajos o no detectables y no mostró variaciones durante el estudio. La CP fue, como se esperaba, alta (1528±216.5 larvas/g). Los resultados permiten concluir que la susceptibilidad en los ratones de genotipo CBI+ estaría asociada a niveles iniciales bajos de IL-4 e INF $\gamma$  que determinaría una contractilidad intestinal atenuada y disminución en la expulsión de los gusanos. IL-2 no influiría sobre la resistencia/susceptibilidad del hospedero en tanto que debe profundizarse el análisis del papel de IL-10 en este modelo.

**426. (637) LA PREÑEZ TEMPRANA REDUCE LA RESPUESTA PROINFLAMATORIA DE MACRÓFAGOS DE RATONES DIABÉTICOS NO OBESOS (NOD)**

Hauk V.<sup>1</sup>; Larocca L.<sup>2</sup>; Azzam S.<sup>3</sup>; Fraccaroli L.<sup>4</sup>; Ramhorst R.<sup>5</sup>; Perez Leiros C.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Inmunofarmacología, Depto. Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup> vchauk@qb.fcen.uba.ar*

Los macrófagos son células plásticas que según el microentorno expresan distintos fenotipos funcionales. En la interfase materno-placentaria se ha reportado una dominancia del fenotipo inmunosupresor. Una disfunción en la actividad de los macrófagos estaría asociada a gestaciones con complicaciones. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) son un modelo para estudiar la gestación en un contexto inflamatorio. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) tiene un potente efecto anti-inflamatorio. El objetivo de este trabajo fue analizar el perfil funcional de los macrófagos peritoneales al enfrentarlos a estímulos inflamatorios y a células apoptóticas y su modulación por VIP. Se emplearon macrófagos de hembras NOD de 16 semanas vírgenes (NOD NP) o en el día 9 de gestación (NOD P) incubados con LPS o timocitos apoptóticos. La producción de IL-10 e IL-12 se midió por ELISA y nitritos por Griess. Se estudiaron las señales intracelulares y función fagocítica por microscopía confocal. Se observó que la preñez revierte el perfil inflamatorio de los macrófagos NOD en condiciones basales y frente a estímulos inflamatorios y células apoptóticas: En condiciones basales no presentan translocación de NF $\kappa$ B al núcleo y la producción de IL-12 y nitritos es menor respecto a hembras NP (X $\pm$ ES; IL-12 ng/10<sup>6</sup>cel; NOD NP: 1,2±0,2; NOD P: 0,1± 0,1 P<0,05; nitritos  $\mu$ M/10<sup>6</sup>cel; NOD NP: 4,3± 0,3; NOD P: 0,5 ± 0,1 P<0,05). Frente al estímulo de células apoptóticas la respuesta proinflamatoria disminuye con menor producción de nitritos e inducción de IL-10 (ng/10<sup>6</sup>cels X $\pm$ ES; NOD NP: 1,5±0,3; NOD P: 4,1± 0,2 P<0,05). El tratamiento *in vitro* con VIP induce en macrófagos NOD un perfil regulatorio. Durante la preñez hay un switch de un fenotipo inflamatorio a uno regulatorio/repador en los macrófagos NOD. El efecto promotor de VIP hacia este fenotipo esta en línea con el rol central de los macrófagos en el dialogo materno-placentario.

**427. (787) ALTERACIÓN EN LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR EXPOSICIÓN CRÓNICA A ESTRÉS. DIFERENTE SENSIBILIDAD DE BALB/C Y C57BL/6 A ESTRÉS POR RUIDO E INMOVILIZACIÓN**

Pascuan C.<sup>1</sup>; Uran S.<sup>2</sup>; Gonzalez Murano M.<sup>3</sup>; Rubinstein M.<sup>4</sup>; Guelman L.<sup>5</sup>; Genaro A.<sup>6</sup>

CEFYO- Dto. de Farmacología. Fac Medicina- CONICET- UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>.  
ceciliapascuan@gmail.com

El ruido es considerado como un estresor ambiental capaz de alterar la respuesta inmune, existiendo controversias acerca de si los mecanismos que participan son similares a los de otros estresores. Previamente describimos que la cepa de ratón BALB/c es mucho más sensible a los efectos deletéreos del estrés crónico moderado que la C57Bl/6. El objetivo del presente trabajo fue investigar la alteración inducida en la respuesta inmune por exposición a ruido (ER)(95-97dB, 1h/day) en comparación con la inducida por estrés por inmovilización (Eln) (2 h por día), durante 2 semanas en estas cepas de ratón (n= 6 para cada grupo). Observamos, que los ratones BALB/c expuestos ER no mostraron alteraciones ni en la respuesta proliferativa *in vitro* ni en la producción de anticuerpos *in vivo*, sin embargo los ratones C57Bl/6 presentaron una disminución en la respuesta proliferativa de células T (Incorporación de <sup>3</sup>H-timidina (dpm) Control (C): 95401±9939, ER:64223±7543; p<0.05) y en la producción de anticuerpos (Ac) tipo IgG por inmunización con glóbulos rojos de carnero (título de Ac, inversa de la dilución, C:5120 ER: 128; p<0.05). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ni en la respuesta proliferativa ni en el título de Ac en Eln. El análisis de la variación de catecolaminas y glucocorticoides (mediadores clásicos de la respuesta al estrés), mostró que los ratones de la cepa BALB/c expuestos a ER tienen una disminución significativa de los niveles de catecolaminas y corticosterona (corticosterona (ng/ml), C: 213±19; ER: 105±13; p<0.01; adrenalina (ng/mg tejido), C: 0,356±0,04; ER: 0,089±0,017; p<0.001). No observamos diferencias significativas ni en los ratones C57Bl/6 expuestos a ER ni en ambas cepas expuestas a Eln. Estos resultados indican que el ruido induce alteraciones diferentes a otro tipo de estresores, en los cuales la participación de catecolaminas y corticoides sería diferente a la clásicamente descripta.

**428. (386) SEÑALAMIENTO CELULAR Y RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN LAS INFECCIONES IN-VITRO CON LOS VIRUS JUNÍN Y TACARIBE**

Gerhardt E.<sup>1</sup>; Riva D.<sup>2</sup>; Melito V.<sup>3</sup>; Juárez á.<sup>4</sup>; Dos Ramos Farías M.<sup>5</sup>; Mersich S.<sup>6</sup>; Ríos De Molina M.<sup>7</sup>  
Laboratorio de Fisiopatogenia, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>; Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA<sup>2 3 4 5 6 7</sup>.  
agua1710@gmail.com

Algunos arnavirus son responsables de fiebres hemorrágicas en humanos. El virus Junín (JunV), fue descrito como el agente etiológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina, mientras el virus Tacaribe (TacV), no daría enfermedad alguna. Dado que la interacción de los arnavirus con la célula huésped no ha sido totalmente dilucidada, se estudiaron varios marcadores de estrés oxidativo, la activación de NFκB y la acción de sustancias antioxidantes, a distintos tiempos de una infección en células Vero. Se midió intracelularmente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), por reacción con diacetato de diclorofluoresceína. Los máximos aumentos en células infectadas respecto de las normales fueron: para JunV 3,2 veces a 14 hs p.i. y para TacV 2,5 veces a 6 hs p.i. La translocación nuclear de NFκB, fue detectada por inmunofluorescencia de la subunidad p65, en las infecciones con JunV a las 16 hs p.i. y con TacV a las 8 hs p.i. En células infectadas con JunV (moi 1), alrededor de 72 hs p.i., los máximos valores obtenidos con respecto al valor del tiempo cero fueron: para el contenido de glutatión reducido (GSH) 3 veces (P< 0,05) y para malondialdehído (MDA) 2 veces (P< 0,05). En infecciones con JunV inactivado, GSH bajó a las 72 hs p.i., de 6,1±0,9 a 2,0±0,3 nmoles/10<sup>6</sup> células y ROS bajó, a 14 hs p.i. al valor normal, mientras que la actividad de superóxido dismutasa no cambió. Al tratar las células con dos antioxidantes, GSH 8 mM o butilhidroxianisol 150 mM, sólo éste último redujo el título viral en el sobrenadante celular significativamente, a 72 hs p.i., por ensayo de placas. Se concluye que: (a) la producción de ROS intracelular podría preceder la translocación de NFκB y por lo

tanto el señalamiento celular, (b) el cambio en el estado redox de la célula depende parcialmente de la replicación viral y (c) sería necesario un ambiente oxidativo, a nivel de la membrana celular para que el virus multiplique eficientemente.

**429. (516) MODULACIÓN POR SIMVASTATINA DEL IMPACTO DE ROFA (RESIDUAL OIL FLY ASH) SOBRE EL SISTEMA RESPIRATORIO DE RATONES BALB/C**

Ferraro S.<sup>1</sup>; Delfosse V.<sup>2</sup>; Yakisich S.<sup>3</sup>; Tasat D.<sup>4</sup>  
Universidad Nacional de San Martín, Escuela de Ciencia y Tecnología, CESyMA<sup>1 2 4</sup>; Karolinska Institute, Huddinge Hospital, Stockholm<sup>3</sup>  
sebaFerraro@gmail.com

La contaminación ambiental aérea afecta negativamente la salud de la población expuesta, siendo el pulmón su principal órgano diana. Por otra parte es conocido que en humanos, las estatinas poseen efectos benéficos sobre algunas enfermedades pulmonares (cáncer, asma). En este trabajo se evaluó *in vivo* el efecto potencialmente protector de la simvastatina sobre la respuesta inflamatoria pulmonar causada por ROFA (Residual Oil Fly Ash). Ratones BALB/c machos de 3 meses de edad se dividieron en 4 grupos (n=6-8 por grupo): controles (C), tratados con simvastatina diariamente (1mg/Kg PC/día; i.p.) durante 14 días (S), expuestos intranasalmente a ROFA (1mg/Kg PC) (R) y, tratados y expuestos a ROFA (S+R). La exposición a ROFA se realizó en forma aguda una vez finalizado el período de tratamiento con simvastatina. La respuesta pulmonar se analizó mediante recuento celular total, diferencial y generación de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en células provenientes del lavado broncoalveolar, y en homogenato pulmonar mediante la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Asimismo, se evaluaron los niveles séricos de la citoquina proinflamatoria Interleuquina-6 (IL-6). La exposición a ROFA provocó una respuesta de tipo inflamatoria, mientras que el tratamiento con simvastatina sola no alteró los parámetros evaluados. El tratamiento previo con Simvastatina (S+R) redujo significativamente el número total de células respecto del grupo R (R: 8.9x10<sup>5</sup>±0.8x10<sup>5</sup>, S+R: 4.9x10<sup>5</sup>±1.2x10<sup>5</sup>, p<0.05), siendo los polimorfonucleares el tipo celular más afectado. Además, entre estos dos grupos se observó una disminución (p<0.05) en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (R: 45.8±2.8%, S+R: 19.2±2.6%), en la actividad SOD (R: 3.3±0.7 Usod/mg proteína, S+R: 1.1±0.3 Usod/mg proteína) y en los niveles de IL-6 (R: 101.5±3.5 pg/ml, S+R: 74.5±2.5 pg/ml). En conclusión, el tratamiento con simvastatina podría ejercer *in vivo* un efecto protector antiinflamatorio sobre la respuesta pulmonar adversa causada por ROFA.

**430. (819) ESTRONGILOIDOSIS EN PACIENTES INMUNOCOMPROMETIDOS: NUEVA HERRAMIENTA PARA DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO.**

Repetto S.<sup>1</sup>; Alba Soto C.<sup>2</sup>; Tayeldin L.<sup>3</sup>; Tekiel V.<sup>4</sup>; González Cappa S.<sup>5</sup>  
Facultad de Medicina<sup>1</sup>; Departamento de Microbiología, Fac Medicina, UBA<sup>2 3 5</sup>; UNSAM<sup>4</sup>.  
silvia\_repetto@yahoo.com.ar

*S.stercoralis* (Ss) da infección severa en pacientes (pac) con corticoides. Métodos convencionales (fresco+ seriado) presentan 70% falsos negativos (FN). Baerman, Harada Mori y cultivo en agar (CAN) incrementan sensibilidad. Se considera cura parasitológica cuando no se hallan larvas en materia fecal (mf). En nuestro lab, CAN presentó 90% sensibilidad, 91% VPN y fue útil para seguimiento postratamiento (pt). Pero, pac CAN - pueden ser FN. Por ello, desarrollamos una PCR específica. Aquí comparamos los métodos convencionales, CAN y PCR en 3 pac con Artritis Reumatoidea y antecedentes de área endémica. Se realizó recuento de eosinófilos (Eo), recolección seriada y fresca de mf y se sembraron 3 placas de CAN/paciente 3g c/u hasta hallar larvas. Los pac se trataron y controlaron entre 3-60d pt. ADN: Se incubó 1g mf fresca 12h (Tamb) en buffer GTES (glicina, Tris/HCL, EDTA, SDS), se lisó mecánicamente e incubó 12h (37C) con buffer de lisis con proteinasa K, se extrajo con fenol:cloroformo:isoamílico y precipitó con etanol. PCR: ADN, BSA 100mg/ml, Mg<sup>2+</sup>, 0,5μM

c/cebador (contra 18S rRNA S.s), dNTPs y Taq pol. *Ciclado*: 95C 3 min y 35 ciclos de 95C 5 s, 55C 1min y 72C 45s y 72C 5min. *Controles*: mf pac sin enteroparasitosis con/sin agregado de 200 larvas. *Pac*: sin riesgo infección exógena, recibían metilprednisolona, 31-59 años. Pac 1 y 2 recibieron ivermectina; CAN+ recién en 2da muestra de mf y Pac 3 con meningitis por *E.coli* sin eosinofilia; presentó larvas al 1er examen fresco. *Resultado*: La PCR amplificó secuencia Ss específica en los 3 desde la muestra pretratamiento. Pac 1 y 2 recibieron ivermectina; pac 3 ivermectina+albendazol y profilaxis secundaria con ivermectina. Todos evolucionaron favorablemente pt, negativizando parasitológicos convencionales y CAN, y la eosinofilia remitió. Sin embargo, las PCR pt continuaron positivas en los 3 pac. *Conclusión*: La PCR puede ser útil en el diagnóstico precoz y deben reevaluarse los criterios de cura parasitológica.

## NEFROLOGIA 2

### 431. (26) EFECTO DE LA PRESENCIA DE UREA SOBRE LA EXPRESIÓN RENAL DE OAT1 Y OAT3 EN RATAS.

Brandoni A.<sup>1</sup>; Torres A.<sup>2</sup>

Área Farmacología, Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario; CONICET.<sup>1 2</sup>  
 anabelbrandoni@gmail.com

Oat1 y Oat3 son proteínas transportadoras que se expresan en la membrana basolateral de las células de los túbulos proximales renales y funcionan como intercambiadores anión orgánico/dicarboxilato. Hemos demostrado alteraciones en la eliminación renal de aniones orgánicos en tres modelos experimentales de insuficiencia renal aguda. El análisis de estos parámetros sugiere que los altos niveles de uremia podrían estar involucrados en dichas alteraciones, mediadas al menos en parte por variaciones en la expresión renal de Oat1 y Oat3. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de distintas concentraciones de urea en el medio de incubación de células aisladas de túbulo proximal de rata sobre la expresión de Oat1 y Oat3. Luego de obtener la suspensión de células se realizaron incubaciones con distintas concentraciones de urea (U, g/L), 0 (n=4), 0.75 (n=4) y 1.5 (n=4), en una atmósfera de 95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>. A partir de estas suspensiones se obtuvieron membranas plasmáticas y sobre estas muestras se evaluó la expresión (%) de Oat1 y Oat3 mediante electroforesis y Western blotting. La viabilidad de las células se determinó como la medida de exclusión del colorante azul de tripán. Los resultados se expresan como la media ± SEM. La viabilidad inicial resultó 97% ± 1 y se mantuvo luego de 2h de incubación. Oat1 (%): U-0= 100 ± 4, U-0.75= 86 ± 9, U-1.5= 79 ± 5\*; Oat3 (%): U-0= 100 ± 4, U-0.75= 102 ± 6, U-1.5= 67 ± 9\*; \*p<0.05 vs. U-0. La urea ejerce una regulación negativa, concentración dependiente, sobre la expresión de Oat1 y Oat3. Se ha descrito que los dicarboxilatos son esenciales para la recuperación de las células de túbulo proximal luego de un daño renal importante. Una disminución en la expresión de los intercambiadores Oat1 y Oat3 conduciría a retener dicarboxilatos dentro de la célula. Esta sería además una respuesta adaptativa a la injuria celular renal que ayudaría a disminuir la captación de toxinas urémicas, mediada por Oat1 y Oat3, en estas células.

### 432. (342) INMUNOLocalización DE CITOCROMO P450SCC (CYP11A1) Y DE LA PROTEÍNA REGULADORA DE ESTEROIDOGÉNESIS AGUDA (STAR) Y CAPACIDAD ESTEROIDOGÉNICA RENAL EN UN ESTADIO TEMPRANO DE DIABETES EXPERIMENTAL

Pagotto M.<sup>1</sup>; Pisani G.<sup>2</sup>; Pagotto R.<sup>3</sup>; Monzón C.<sup>4</sup>; Rogic G.<sup>5</sup>; Trumper L.<sup>6</sup>; Pignataro O.<sup>7</sup>; Monasterolo L.<sup>8</sup>

Instituto de Fisiología Experimental IFISE CONICET. Área Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.<sup>1 6 8</sup>; Área Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario<sup>2</sup>; Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales,

Instituto de Biología y Medicina Experimental IBYME-CO-NICET, Buenos Aires.<sup>3 4 7</sup>; Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, FCEN UBA, Buenos Aires.<sup>5</sup>  
 melina.pagotto@gmail.com

La diabetes se asocia con niveles plasmáticos alterados de progesterona (P4) y testosterona (T). Se ha propuesto una correlación entre el desbalance de hormonas sexuales y la progresión a nefropatía diabética. Sin embargo no se han estudiado la producción ni el contenido renal de hormonas esteroideas en estado diabético. Los objetivos fueron estudiar en riñón diabético: 1) Expresión de la proteína involucrada en el transporte de colesterol a membrana mitocondrial interna (MMI): StAR; 2) Expresión de CYP11A1, enzima cuya acción convierte colesterol a pregnenolona (P5); 3) Síntesis de P5; 4) contenido de P4 y T. Se usaron ratas Wistar macho adultas controles (C) y tratadas con estreptozotocina i.v. 50mg/kg (STZ). A la semana de STZ, se evaluó en riñón: i) expresión de StAR y CYP11A1 por inmunohistoquímica y Western blot; ii) contenido de P4 y T por RIA; iii) Síntesis de P5: se incubaron mitocondrias en presencia (+22R-HO) o ausencia (-22R-HO) de 22R-hidroxicolesterol, derivado permeable a membranas. Los resultados son promedio ± SEM de n= 4-6; \*p<0.05. Se detectó por Western blot una disminución en la expresión renal de StAR y CYP11A1 en STZ vs. C. Este hallazgo se corroboró por inmunohistoquímica y se observó igual distribución de ambas proteínas, con marca en túbulo contorneado distal y en rama ascendente del asa de Henle. La síntesis de P5 (pg/ug proteína.hr) fue significativamente menor en STZ vs. C (C= 60,4±28,9, STZ= 2,5±0,6\*). El contenido de P4 y T disminuyó significativamente en riñones STZ. Este estadio temprano de diabetes provoca un déficit en la expresión de proteínas esteroideogénicas y en la capacidad biosintética del precursor de hormonas esteroideas P5, consistentes con el decremento en el contenido de P4 y T. Considerando que las hormonas sexuales pueden condicionar la susceptibilidad renal ante injuria, estos hallazgos sugieren que la alteración en la esteroideogénesis local podría estar implicada en el desarrollo de nefropatía diabética.

### 433. (366) DIMORFISMO SEXUAL DEL CRECIMIENTO RENAL COMPENSADOR (CRC) EN RATAS WISTAR ADULTAS

Oddo E.<sup>1</sup>; Toro A.<sup>2</sup>; Corbera N.<sup>3</sup>; Martín R.<sup>4</sup>; Ibarra F.<sup>5</sup>; Azurmendi P.<sup>6</sup>; Arrizurieta E.<sup>7</sup>

Nefrología Experimental, Iim Alfredo Lanari, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

oddod.elisabet@lanari.fmed.uba.ar

La nefrectomía unilateral (uNx) genera un CRC en el riñón remanente tanto en machos (M) como en hembras (H). Sin embargo, muy pocos estudios han investigado la posible existencia de una diferencia de género en la respuesta a la uNx. Se estudiaron ratas Wistar de distinto sexo, enteras y gonadectomizadas (Gx) con y sin uNx efectuada a los 90 días de vida. Se estudió el crecimiento renal compensador midiendo el peso renal al tiempo de la uNx y a los 150 días de vida y el número y tamaño celular por medio del contenido tisular de proteínas, RNA y DNA. La masa renal aumentó un 45% tras la uNx en MuNx, de 1.53±0.076 a 2.2±0.59g (p<0.001) y un 28% en MGxuNx, de 1.1±0.04 a 1.41±0.07 (p<0.05) mientras que en HuNx y HGxuNx el incremento fue menor, no alcanzando significación estadística. El contenido de proteínas y RNA en H y M enteros y HGx aumentó tras la uNx (p<0.05, p<0.05 y p<0.005, respectivamente), pero no en MGxuNx. El número de células, estimado por el contenido tisular de DNA, aumentó en MuNx, HuNx y MGxuNx (1.38±0.08, 1.32±0.05 y 1.33±0.08) respecto de sus controles no uNx (0.86±0.04, 0.83±0.04 y 1.06±0.04, p<0.05), no observándose aumento en las HGxuNx. La relación proteína/DNA y RNA/DNA mostró los valores más bajos en MGxuNx 104.93±6.92 y 0.98±0.041 (p<0.05 y p<0.005, respectivamente) comparados con los demás grupos (132.34 - 171.94 para proteína/DNA y 1.92 - 3.05 para RNA/DNA). Las ratas M muestran la mayor respuesta compensadora, mientras que los MGxuNx exhiben un menor CRC con menor tamaño celular. Estos hallazgos indican la presencia de un dimorfismo sexual en el CRC estudiado en ratas Wistar a los 2 meses después de la uninefrectomía.

**434. (265) EFECTO DE LA ACIDOSIS SOBRE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL (AQP8MT) EN CÉLULAS DE TÚBULO PROXIMAL RENAL HUMANAS**

Molinas S.<sup>1</sup>; Trumper L.<sup>2</sup>; Marinelli R.<sup>3</sup>  
 IFISE CONICET<sup>1</sup>; Farmacología. Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas; CIUNR<sup>2</sup>; molinas@ifise-conicet.gov.ar

La síntesis mitocondrial de  $\text{NH}_4^+$  en las células proximales (amoniogénesis) y su posterior excreción urinaria es una respuesta renal clave para la regulación del equilibrio ácido-base durante la acidosis metabólica. AQP8 facilita el transporte difusivo de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  y se localiza en membrana interna mitocondrial de las células proximales, por lo que nuestra hipótesis de trabajo supone que participaría en el transporte mitocondrial de  $\text{NH}_4^+$  en acidosis. En estudios previos reportamos que en corteza renal, AQP8mt se encuentra aumentada en respuesta a la acidosis metabólica crónica en ratas. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de la acidosis sobre la respuesta amoniogénica y la expresión de AQP8mt en la línea celular HK2 (derivada de células de túbulo proximal renal humano). Las HK2 fueron incubados en medio de cultivo a pH 7,4 (C) y pH 6,8 (A) durante 24 o 48 h (n= 4-5 por grupo). Se evaluó por inmunoblotting la expresión de glutaminasa (GA, enzima clave de la amoniogénesis) y de AQP8 en fracciones enriquecidas en mitocondrias, y se midió la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo. Luego de 24 h de acidosis la expresión de GA en mitocondrias no se diferenció del control, mientras que luego de 48 h se encontró un aumento significativo (+120%,  $P < 0,05$ ). Este aumento coincidió con una mayor concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo (24 h: C=1,1±0,4; A= 1,3±0,3; 48 h: C=1,3±0,1; A=1,9±0,3\*  $\mu\text{molNH}_4^+/\mu\text{g}$  proteína, \* $P < 0,05$  vs C). Se corroboró la expresión de AQP8 en mitocondrias en esta línea celular. La expresión de AQP8mt no presentó cambios a las 24 h de acidosis, mientras que a las 48 h se observó un aumento significativo (+74%,  $P < 0,05$ ). Estas evidencias sugieren que las células HK2 conservan la capacidad de responder ante la acidosis produciendo y excretando mayor cantidad de  $\text{NH}_4^+$ . La mayor excreción de  $\text{NH}_4^+$  se encontró asociada a un aumento de AQP8mt, sugiriendo un rol de esta proteína en la respuesta adaptativa de las células proximales humanas a la acidosis.

**435. (777) ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPASA RENAL Y EN LA EXCRECIÓN DE  $\text{Na}^+$  EN RATAS HEMBRAS ADULTAS OVARIECTOMIZADAS.**

Di Ciano L.<sup>1</sup>; Azurmendi P.<sup>2</sup>; Toledo J.<sup>3</sup>; Oddo E.<sup>4</sup>; Arrizurieta E.<sup>5</sup>; Ibarra F.<sup>6</sup>  
 Laboratorio de Riñón Experimental Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 eldisi@yahoo.com.ar

En trabajos anteriores (Kidney Blood Press Res. 2009) mostramos que la ovariectomía en ratas Wistar (oVx) a los 60 días, produjo aumento de kalikreina urinaria y descenso de la presión sistémica (PAM) sin cambiar el filtrado glomerular estudiadas a los 150 días de vida. En este mismo esquema de trabajo, evaluaremos si la oVx modifica la expresión de la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa renal (NKA), la excreción de  $\text{Na}^+$  ( $\text{ENa}^+$ ) y la PAM en ratas hembras enteras (H) y oVx con dieta normosódica (NS, NaCl 0.24% en agua de bebida) e hipersódica (HS, NaCl 1%) por 5 días. Se estudió en homogenatos de corteza y médula renal la expresión (por Western-Blot) de la subunidad alfa1 NKA, y su estado de defosforilación en Ser 23 (sitio de PKC), usando beta actina como corrección interna. En dieta NS, la expresión en médula de NKA alfa1 y la expresión de Ser 23 defosforilada aumentó un  $10 \pm 1\%$  post oVx ( $p < 0.05$ ), sin diferencias en corteza. La  $\text{ENa}^+$  (mEq/g riñón/d), diuresis y PAM no fue diferente entre ratas oVx y H. En dieta HS, la expresión en médula de NKA alfa 1 y la expresión de Ser 23 defosforilada siguió siendo mayor en oVx que en H. No se observaron cambios en corteza. La  $\text{ENa}^+$  fue menor en oVx que en H ( $3.9 \pm 0.1$  vs  $4.6 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$ ), sin diferencias en la diuresis. La PAM se incrementó en oVx respecto H ( $135 \pm 9$  vs  $116 \pm 7$ ,  $p < 0.05$ ). Las hembras oVx adultas tienen una expresión aumentada de NKA en médula renal y una capacidad de excreción de  $\text{Na}^+$  disminuida ante una ingesta elevada de dicho ión.

Ambos factores contribuirían al aumento de la PAM luego de la dieta hipersódica en oVx, vinculándolos al déficit de hormonas femeninas.

## REPRODUCCION 4

**436. (81) EFECTO DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BAJAS DOSIS DE BISFENOL A SOBRE EL DESARROLLO FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA**

Kass L.<sup>1</sup>; Altamirano G.<sup>2</sup>; Bosquiazzo V.<sup>3</sup>; Luque E.<sup>4</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>5</sup>  
 Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes (Leth), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 lkass@fbc.unl.edu.ar

Previamente demostramos que el bisfenol A (BPA) modifica la morfología de la glándula mamaria incrementando su susceptibilidad al desarrollo tumoral. Nuestro objetivo fue evaluar si la funcionalidad de la glándula mamaria se ve afectada por la exposición a BPA. Ratas preñadas de la cepa Wistar fueron expuestas por vía oral a 0 (control), 0.5 o 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  BPA desde el día 9 (D9) de gestación hasta el destete. A los 90 días de edad las crías hembras fueron preñadas, obteniéndose muestras de mama y sangre en D18 y D21 de preñez. Los niveles séricos de estradiol ( $\text{E}_2$ ), progesterona ( $\text{P}_4$ ) y prolactina (PRL) fueron cuantificados por radioinmunoensayo. En las muestras de mama se analizaron por inmunohistoquímica el receptor de estrógeno alfa ( $\text{RE}\alpha$ ), el de progesterona (RP) y el factor transcripción Stat 5 a/b fosforilado. Por RT-PCR en tiempo real se evaluó la expresión del ARNm del receptor de prolactina (RPRL),  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -LALBA) y  $\beta$ -caseína ( $\beta$ -CAS). La concentración sérica de  $\text{E}_2$  y PRL no presentó diferencias entre los grupos experimentales; en cambio, en BPA 50 los niveles séricos de  $\text{P}_4$  en D21 no mostraron la disminución previa que caracteriza al parto (BPA 50  $30.99 \pm 2.66$  ng/ml vs Control  $19.59 \pm 1.86$  ng/ml,  $p < 0.05$ ). Esto último podría indicar una posible falla en la activación de la luteólisis. La expresión de  $\text{RE}\alpha$ , RP y Stat 5 a/b fosforilado no fue diferente entre los grupos experimentales. En cambio, el tratamiento perinatal con BPA produjo una menor expresión de los ARNm de  $\alpha$ -LALBA y  $\beta$ -CAS que se correlacionó con una disminución en la expresión del ARNm del RPRL. La  $\alpha$ -LALBA y  $\beta$ -CAS son componentes importantes de la leche materna, la menor expresión de estas proteínas durante la gestación sugiere que la calidad nutricional de la leche y en consecuencia la nutrición de las crías podría estar alterada.

**437. (223) HISTOPATOLOGÍA UTERINA: TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO EN ANIMALES EXPUESTOS PERINATALMENTE A BAJAS DOSIS DE BISFENOL A**

Bosquiazzo V.<sup>1</sup>; Vigezzi L.<sup>2</sup>; Ramos J.<sup>3</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>4</sup>; Luque E.<sup>5</sup>  
 Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes Fac de Bioquímica y Cs Biológicas Universidad Nacional del Litoral<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 vlbosqui@fbc.unl.edu.ar

La etiología de los desórdenes reproductivos más frecuentes en el tracto reproductor femenino y la manera en que los agentes ambientales interfieren con los mismos, no han sido totalmente dilucidadas. Nuestro objetivo fue estudiar si la exposición perinatal a Bisfenol A (BPA) favorece el desarrollo de lesiones uterinas en ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo. Ratas preñadas (Wistar) fueron expuestas a través del agua de bebida con BPA 0 (control), 0.5 o 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  desde el día 9 de gestación hasta el destete. A los 12 meses de edad, las hembras fueron ovariectomizadas y 10 días después tratadas con 17 $\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ , 1mg/ml) por vía sc durante 3 meses. Se diseccionaron los cuernos uterinos y se incluyeron en parafina. La histopatología uterina se caracterizó mediante tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de citoqueratinas (CK8 y CK34 $\beta$ E12), p63 y MCM-2 (*Minichromosome Maintenance Protein-2*). El análisis histológico demostró una variedad de lesiones uterinas: glándulas

quísticas, hipertróficas, con atipias nucleares (núcleos hipocrómicos), metaplasias escamosas y glándulas con glándulas hijas. En los animales expuestos a BPA0.5 la densidad de glándulas con glándulas hijas aumentó significativamente (control  $0.1 \pm 0.1$  vs BPA0.5  $1.81 \pm 0.77$ ;  $p < 0.05$ ), mientras que la densidad de glándulas con metaplasias escamosas aumentó en los animales de BPA50, sin alcanzar diferencia estadística significativa ( $p = 0.33$ ). Estas estructuras presentaron baja actividad proliferativa (evaluada por la expresión de MCM-2) en todos los grupos experimentales y al igual que las glándulas normales fueron inmunoreactivas para la CK luminal (CK8). Las metaplasias glandulares expresaron marcadores de células basales (CK34 $\beta$ E12 y p63) en más de un estrato celular. Los resultados sugieren que la exposición a bajas dosis de BPA podría reprogramar el desarrollo tisular uterino modificando la respuesta al E2 e incrementando la susceptibilidad a lesiones que ocurren en la vida adulta.

#### 438. (369) EXPRESION DE RECEPTORES ESTEROIDES DURANTE EL DESARROLLO NEONATAL DEL OVARIO DE OVEJA

Rivera O.<sup>1</sup>; Varayoud J.<sup>2</sup>; Rodríguez H.<sup>3</sup>; Belmonte N.<sup>4</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>5</sup>; Luque E.<sup>6</sup>

Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Lomas de Zamora<sup>1</sup>; Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral<sup>2 3 5 6</sup> [erivera@yahoo.com](mailto:erivera@yahoo.com)

Previamente demostramos que la exposición neonatal de corderas a dosis bajas de Dietilestilbestrol (DES) o Bisfenol A (BPA) disminuye la reserva de folículos estimulando el desarrollo folicular y la atresia. BPA disminuyó el peso ovárico y aumentó la incidencia de folículos multiovulares. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión de receptores esteroideos en ovarios de corderas para contribuir a explicar la posible vía de acción de estos xenoestrógenos. Por inmunohistoquímica, en ovarios de día postnatal 1 (DPN1), DPN5, DPN10 y DPN30, se evaluó la expresión de receptores de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ), RE $\beta$  y andrógenos (RA) en el estroma cortical y medular. La mayoría de las células del estroma medular fueron positivas para RE $\alpha$  en DPN1 y DPN5; pocas células positivas en el estroma cortical. En DPN10 RE $\alpha$  disminuyó haciéndose negativo en DPN30. No se observó RE $\alpha$  en primordiales y baja expresión en granulosa de preantrales. En DPN1, RE $\beta$  fue positivo en corteza y médula con baja expresión en primordiales. RE $\beta$  tuvo alta expresión en estroma cortical y medular en DPN5 y DPN10, disminuyendo el DPN30. Desde DPN5 en adelante hubo alta expresión de RE $\beta$  en ovocitos y granulosa de folículos en crecimiento. RA presentó alta expresión en casi todos los compartimientos, con pequeñas modificaciones entre los días estudiados. La alta expresión de RE $\beta$  observada sugiere que las alteraciones en corderas expuestas a DES o BPA podrían ser mayormente mediadas por la expresión temprana de éste receptor. Sin embargo, no podemos descartar que alguno de los efectos pueda ser mediado a través de RE $\alpha$  y/o algún otro mediador celular.

#### 439. (617) CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO E INFLAMATORIO DEL LÍQUIDO FOLICULAR DE PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

Faut M.<sup>1</sup>; De Zúñiga I.<sup>2</sup>; Colaci D.<sup>3</sup>; Amalfi S.<sup>4</sup>; Barrios E.<sup>5</sup>; Oubiña A.<sup>6</sup>; Terrado Gil G.<sup>7</sup>; Motta A.<sup>8</sup>  
CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1</sup>; PREGNA-Medicina Reproductiva<sup>2 3 5 6 7</sup>; CEFYBO-CONICET-UBA<sup>4 8</sup>;  
[monicafaut@gmail.com](mailto:monicafaut@gmail.com)

El Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) es una endocrinopatía heterogénea, caracterizada por hiperandrogenemia, quistes ováricos y oligo o anovulación. Las pacientes con SOP tienen gran número de folículos pequeños que no logran desarrollarse y ser ovulados cayendo en atresia folicular. Se ha reportado que un desbalance en el estado redox del líquido folicular explicaría, en parte, estos efectos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el estado oxidativo de folículos preovulatorios en mujeres SOP. Se

analizó el líquido folicular (LF) de 20 mujeres sometidas a IVF/ICSI, 10 pacientes con SOP y 10 pacientes con diagnóstico de infertilidad masculina (controles). Se analizaron, por espectrofotometría, los niveles de malondealdehído (MDA), como parámetro de liperoxidación (LPO) y glutatión total (GSht) y la actividad de superóxido dismutasa (SOD), como antioxidantes. Se cuantificaron, por RIA, los niveles de la luteotrófica prostaglandina E (PGE) y la luteolítica PGF2 $\alpha$ . Los niveles de LPO y de SOD no se modificaron en LF de SOP con respecto a los controles mientras que los niveles de GSht aumentaron ( $0,007 \pm 0,001$  vs  $0,0039 \pm 0,001$  umol/ mg proteínas). Por otro lado, los niveles de PGE fueron significativamente mayores en LF de SOP ( $3,71 \pm 0,7$  vs  $0,54 \pm 0,3$  pg/mg proteínas) al igual que la PGF2 $\alpha$  ( $8,4 \pm 0,8$  vs  $2,9 \pm 0,7$  pg/mg proteínas). Estos resultados muestran un incipiente desbalance oxidativo en los LF provenientes de pacientes SOP mediante la generación excesiva de GSht, lo que impediría un aumento en la LPO. Por otro lado, los LF de pacientes con SOP presentan un estado pro-inflamatorio caracterizado por elevadas concentraciones de PGs. Estas alteraciones pro-oxidantes y pro-inflamatorias explicarían, en parte, las fallas en el desarrollo folicular de pacientes con SOP.

#### 440. (389) ARN MENSAJERO DE FMR1: EXPRESIÓN DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR DE RATA Y SUS VARIANTES DE SPLICING EN EL OVARIO. ESTUDIOS PRELIMINARES.

Ferder L.<sup>1</sup>; Parborell F.<sup>2</sup>; Chiauzzi V.<sup>3</sup>; Eduardo C.<sup>4</sup>; Tesone M.<sup>5</sup>; Dain L.<sup>6</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 3 4</sup>; Departamento de Química Biológica FCEYN UBA<sup>5</sup>; Centro Nacional de Genética Médica Anlis<sup>6</sup> [ferder@dna.uba.ar](mailto:ferder@dna.uba.ar)

La falla ovárica prematura (FOP) es un síndrome de patogénesis multicausal que se caracteriza por amenorrea primaria o secundaria antes de los 40 años, hipoestrogenismo e hipergonadotropismo con distintos grados de atresia folicular. Entre las posibles causas, se ha descrito una asociación entre el estado de premutación en el gen FMR1 y la aparición de FOP. Es sabido que el producto del gen, la proteína FMRP, se expresa en varios tejidos incluyendo el ovario, pero su función y su expresión a lo largo del desarrollo folicular se desconocen. El objetivo del trabajo fue estudiar la expresión del mensajero de FMR1 en el modelo de foliculogénesis en rata así como la identificación de posibles isoformas del gen debidas a *splicing* alternativo. Se utilizaron ratas prepúberes de 18 días sin tratamiento, ratas inyectadas por 3 días con DES (1mg/rata, ejemplares con ovarios inmaduros), o bien superovuladas con una dosis única de 25 UI/rata de PMSG (ejemplares enriquecidos en folículos preovulatorios). El estudio de las isoformas se realizó mediante RT-PCR con *primers* ubicados en distintos exones del gen en los cuales se han descrito eventos de *splicing*. La expresión del mensajero en ovario se analizó por PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando al gen ribosomal 18S como gen "housekeeping". El estudio de las isoformas reveló la presencia de distintas variantes debidas, entre otros, al *splicing* del exón 12. Por su parte, del análisis por qRT-PCR del gen FMR1 no observamos diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes estadios. Estos resultados preliminares estarían indicando que, a diferencia de lo que observamos en trabajos previos sobre la expresión de la proteína, la expresión del ARNm no sufriría variación a lo largo de la foliculogénesis. Asimismo y a diferencia de lo descrito para la hipófisis, en el ovario se expresaría un ARNm que contiene al exón 12 del gen.

## ONCOLOGIA 7

#### 441. (221) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS EN LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DERIVADOS DE LA DOXORUBICINA (DOX). ROL DE LA PROTEÍNA QUINASA C DELTA (PKCD).

Díaz Bessone M.<sup>1</sup>; Berardi D.<sup>2</sup>; Campodónico P.<sup>3</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>4</sup>; Todaro L.<sup>5</sup>; Urteger A.<sup>6</sup>



Instituto de Oncología Angel H. Roffo<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 mariadiazbessone@hotmail.com

En este trabajo nos propusimos estudiar si la sobreexpresión de PKC $\delta$  en células mamarias murinas es capaz de alterar la susceptibilidad a la muerte celular inducida por dos quimioterápicos derivados de la Dox (AD198 y AD288), y evaluar las vías de señalización implicadas en este proceso. El mecanismo de acción del AD288 involucra la generación de daño en el ADN, mientras que el AD198 induciría apoptosis por activación de PKC $\delta$ . Mediante western blot determinamos que las células NMuMG-PKC $\delta$  presentan un aumento en los niveles de expresión y/o activación de distintas moléculas y vías involucradas en sobrevida como Bcl-2, pBad, PI3K/Akt y NF- $\kappa$ B. Al mismo tiempo, la sobreexpresión de PKC $\delta$  generó una evidente resistencia a la citotoxicidad inducida por ambos ADs (sobrevida: AD198, 80 $\pm$ 10% vs. 41 $\pm$ 8% y AD288, 90 $\pm$ 15% vs. 60 $\pm$ 10% en NMuMG-PKC $\delta$  y NMuMG-vector respectivamente). A fin de evaluar el rol de la vía PI3K/Akt en la resistencia a la muerte inducida por los dos ADs, las células se trataron con LY294002, inhibidor de PI3K. La inhibición de esta vía en las células NMuMG-PKC $\delta$  triplicó el efecto citotóxico del AD198, mientras que no alteró la susceptibilidad a la muerte inducida por AD288 (LD50 AD198 3,1 $\pm$ 0,9 uM vs LD50 AD288 15,6 $\pm$ 1,3 uM, p<0,05). Se observó un efecto similar en las células transfectadas con el vector vacío. El rol de la vía de NF- $\kappa$ B en la resistencia a la muerte inducida por los dos ADs se determinó mediante la transfección transitoria con una variante de su represor I $\kappa$ B. La inhibición de esta vía incrementó significativamente la susceptibilidad a la muerte celular inducida por ambas drogas (LD50 AD198: 1,24 $\pm$ 0,09 uM y LD50 AD288: 5,78 $\pm$ 0,6 uM). En este trabajo demostramos que las señales antiapoptóticas generadas por PKC $\delta$ , en las células mamarias murinas normales NMuMG pueden revertirse inhibiendo las vías de sobrevida PI3K/Akt y/o NF- $\kappa$ B, dependiendo en parte del mecanismo de acción de la droga citotóxica utilizada.

**442. (337) EFECTOS DEL INTERFERÓN  $\alpha$  (IFN) Y DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE  $\beta$ 1 (TGF) SOBRE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA EN LAS LÍNEAS DE HEPATOCARCINOMA CELULAR (HCC) HEPG2 Y HUH7.**

Ceballos M.<sup>1</sup>; Parody J.<sup>2</sup>; Alvarez M.<sup>3</sup>; Ingaramo P.<sup>4</sup>; Francés D.<sup>5</sup>; Carnovale C.<sup>6</sup>; Carrillo M.<sup>7</sup>  
 IFISE-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
 pauliceballos@yahoo.com.ar

La incidencia del HCC en pacientes con hepatitis crónicas se reduce tras la terapia con IFN, pero en HCC establecido los resultados son controversiales. El TGF endógeno es un importante mediador fisiológico de apoptosis en el hígado y actúa a través de las proteínas Smads. Existen evidencias de *cross-talk* entre las vías del TGF y Wnt/ $\beta$ -catenina en la progresión tumoral. La vía Wnt/ $\beta$ -catenina se encuentra frecuentemente activada en HCC e involucra la acumulación citosólica de  $\beta$ -catenina y su migración al núcleo, donde promueve la proliferación celular tras unirse al factor TCF4. Decidimos estudiar el estado de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y el efecto del IFN y TGF sobre dicha vía, las proteínas Smads, la proliferación y apoptosis, en líneas de HCC. Tratamos células HepG2 y huh7 con IFN y/o TGF, durante 48hs. En células tratadas con IFN o TGF observamos una disminución en los niveles de  $\beta$ -catenina en núcleo (immunoblotting). HepG2: IFN -76%\*, TGF -52%\*. huh7: IFN -68%\*, TGF -85%\* y aumento de Smads en lisado (immunoblotting). Smad2-3-p: IFN +50%\*, TGF +80%\*. Smad4: IFN +20%\*, TGF +50%\*. Smad7: IFN +30%\*, TGF +50%\*. datos similares en ambas líneas), disminución de la unión TCF4/ $\beta$ -catenina en lisado (co-immunoprecipitación), disminución en la proliferación (MTS. 6 días de tratamiento. HepG2: IFN -39%\*, TGF -85%\*. huh7: IFN -46%\*, TGF -62%\*) y aumento de la apoptosis (actividad caspasa 3. HepG2: IFN +98%\*, TGF +68%\*, huh7: IFN +76%\*, TGF +45%\*), respecto de células sin tratar (\*p<0,05). El tratamiento con ambas citoquinas aumentó significativamente los efectos observados. Estos resultados indican la atenuación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por IFN y TGF, mediante disminución de  $\beta$ -catenina en el núcleo y de su unión a TCF4. Esta modulación involucraría a las proteínas Smads y desencadenaría el arresto

y muerte celular. En conclusión, los tratamientos con IFN y TGF afectan la vía Wnt/ $\beta$ -catenina sinérgicamente, contrarrestando la activación de la misma en ambas líneas de HCC.

**443. (541) EVALUACIÓN DE GENES VINCULADOS AL DESARROLLO TUMORAL EN HIPERPLASIAS Y TUMORES DE CÉLULAS DE LEYDIG DE UN MODELO DE RATONES TRANSGÉNICOS**

Quintana S.<sup>1</sup>; Lapyckyj L.<sup>2</sup>; Venara M.<sup>3</sup>; Rey R.<sup>4</sup>; Di Clemente N.<sup>5</sup>; Picard J.<sup>6</sup>; Chemes H.<sup>7</sup>; Vazquez-Levin M.<sup>8</sup>  
 Centro de Investigaciones Endocrinológicas CEDIE-CO-NICET<sup>1 3 4 7</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET-UBA)<sup>2 8</sup>; Endocrinologie et Génétique de la Reproduction et du Développement (INSERM).<sup>5 6</sup>  
 quintanasilvina@yahoo.com.ar

Contamos con un modelo experimental de ratones transgénicos que expresan el oncogen SV40 T bajo el control del promotor de la Hormona Antimülleriana. Estos animales desarrollan hiperplasias diploides de células de Leydig hasta los 20 días, que sufren transición a hiperplasias y luego tumores hipodiploides. Evaluamos el perfil transcripcional de hiperplasias y tumores en animales clasificados con evaluaciones histológicas. Se determinaron los niveles del ARNm del marcador esteroideogénico StAR (steroidogenic acute regulatory protein) y de marcadores de desarrollo tumoral: EGFR (Epidermal growth factor receptor), PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten), Mad2 (mitotic arrest-deficient 2), Telomerasa, Ciclinas D1 y D3. Se estudiaron 3 testículos hiperplásicos de 10 a 15 días de edad (diploides), 7 hiperplásicos de 3 a 12 meses y 3 tumores de 10 meses a 3 años (todos hipodiploides). Se realizó extracción de ARN, retrotranscripción y PCR en tiempo real (gen endógeno: GAPDH; calibrador: testículo control de 3 meses). **Resultados:** La naturaleza esteroideogénica de hiperplasias y tumores fue confirmada por la expresión de *StAR* en todas las muestras. Los niveles de *StAR*, ciclina D1 y *PTEN* disminuyeron (p<0,05) en los tumores respecto de las hiperplasias hipodiploides. No hubo diferencias en los niveles de ARNm de EGFR, Telomerasa, Mad2 y Ciclina D3 entre hiperplasias y tumores hipodiploides. Si bien los niveles de Mad2 fueron menores que el calibrador en todas las hiperplasias y tumores, hubo una disminución de un orden de magnitud entre hiperplasias diploides e hiperplasias y tumores hipodiploides. Dado que Mad2 es un regulador mitótico vinculado a la generación de aneuploidía en diversos tumores, podría intervenir en la transición diploide a hipodiploide de las células hiperplásicas en este modelo de ratones transgénicos. La disminución de los niveles de ARNm del supresor tumoral *PTEN* podría estar asociada con la progresión de hiperplasia a tumor.

**444. (706) EFECTO DE ALENDRONATO SOBRE LA INTERACCIÓN DE ESFEROIDES CON LA MATRIZ EXTRACELULAR.**

Molinuevo M.<sup>1</sup>; Lastra M.<sup>2</sup>  
 Grupo de Investigaciones en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Dpto Cs Biológicas, Fac Cs Exactas, Universidad Nacional de La Plata<sup>1 2</sup>  
 silvinamolinuevo@yahoo.com.ar

Las interacciones célula-célula y célula-matriz determinan la supervivencia celular, el desarrollo y reparación de tejidos y el establecimiento de metástasis tumorales. Los esferoides son cultivos de células en tres dimensiones donde las células interactúan preferentemente entre sí, al desarrollarse sobre matrices que inhiben la adhesión celular. Cuando un esferoide se dispone en una matriz adecuada tiende a migrar y formar nuevamente una monocapa celular. La migración de las células hacia la MEC puede ser modulada por diferentes drogas. En este trabajo evaluamos los efectos del bifosfonato alendronato (Ale) sobre la interacción de las células que forman los esferoides (osteosarcoma UMR106) entre sí; y la interacción de los esferoides con la MEC (colágeno de tipo I (Col1, 1 $\mu$ g/ml); gelatina (Gel, 1mg/ml) y fibronectina (Fn, 10 $\mu$ g/ml). Los estudios histológicos muestran que las células forman agregados compactos, con un esqueleto de actina formando ani-

llos en los bordes celulares. Cuando los esferoides son tratados con Ale  $10^{-6}$ M durante 24h ocurre la relocalización de las fibras de actina del citoesqueleto mostrando una distribución más difusa. Por otro lado, cuando los esferoides son puestos en contacto con las matrices de Col1, Gel o Fn las células migran desde el esferoide hacia matriz mostrando el citoesqueleto de actina polarizado hacia el eje de migración y desarrollando adhesiones focales. Sin embargo el tratamiento con Ale  $10^{-6}$ M inhibe la migración desde el esferoide hacia las matrices en forma dosis – respuesta a las 24h (efecto máximo a  $10^{-5}$  M:  $56\pm 3\%$  vs Col1;  $60\pm 4\%$  vs Gel;  $75\pm 4$  vs Fn,  $p<0.01$ ). Además, Ale causa la reorganización del citoesqueleto produciendo un patrón más difuso con adhesiones focales menos desarrolladas. En conclusión, encontramos que el tratamiento con alendronato inhibe la migración celular, afectando las interacciones entre las células y con la MEC.

#### 445. (708) ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DEL 1 ALFA,25(OH)<sub>2</sub> VITAMINA D<sub>3</sub> Y SU NUEVO ANÁLOGO EM1.

Salomón D.<sup>1</sup>; Grioli S.<sup>2</sup>; Buschiazio M.<sup>3</sup>; Gravina N.<sup>4</sup>; Vitale C.<sup>5</sup>; Mascaró E.<sup>6</sup>; Radivoy G.<sup>7</sup>; Fall Y.<sup>8</sup>; Curino A.<sup>9</sup>; Facchinetti M.<sup>10</sup>

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca CCT CONICET Bahía Blanca<sup>1 2 3 4 9 10</sup>; Laboratorio de Química Orgánica, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.<sup>5 6 7</sup>; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, España.<sup>8</sup>*  
dsalomon@criba.edu.ar

La hormona esteroidea 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitaminaD<sub>3</sub> (calcitriol) tiene efectos antineoplásicos en varios tipos de cáncer pero su actividad hipercalcemiantes afecta su potencialidad como agente antitumoral. Es por ello que se desarrollan análogos sintéticos del calcitriol que posean efectos antitumorales sin ser hipercalcemiantes. El objetivo de este trabajo fue evaluar la acción antineoplásica del nuevo análogo de calcitriol EM1 en diferentes líneas tumorales, comparándola con la ejercida por el calcitriol. EM1 ejerce una disminución significativa en la supervivencia de la línea de glioma T98G partiendo de la dosis fisiológica 1 nM ( $p\leq 0,05$ ), efecto que fue mayor que el ejercido por el calcitriol. Se observó que esta reducción en la proliferación/supervivencia fue acompañada de un aumento en los niveles proteicos de VDR, p21<sup>waf1/cip1</sup> y p27<sup>kip1</sup>, y una disminución de ciclina D1, mientras que los niveles de la proteína p53 no se vieron afectados. Estos resultados fueron confirmados por qPCR para VDR y p21<sup>waf1/cip1</sup>. Más aún, EM1 indujo un aumento de los niveles de p21 en glioma mientras que el calcitriol los redujo. De forma similar, en un modelo celular de sarcoma de Kaposi que involucra la sobreexpresión del receptor acoplado a proteína G viral (vGPCR) en la línea endotelial murina SVEC, EM1 ejerció un fuerte efecto antiproliferativo (10 nM;  $p\leq 0,01$ ), acompañado por el aumento en los niveles de VDR y p27, mientras que las células no malignas (SVEC) no respondieron al tratamiento. La línea de carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello HN12, la de carcinoma mamario LM3 y de carcinoma colorrectal HCT116 no respondieron al EM1. Por otra parte, se realizaron ensayos de calcemia en ratones CF1 observándose que el EM1 (5-20  $\mu$ g/kg) a diferencia del calcitriol no provoca hipercalcemia. Los resultados de estos estudios aportan evidencia acerca de la potencial utilidad de este nuevo análogo como droga antitumoral.

#### 446. (740) LA TERAPIA CON EL GEN INTERFERON-BETA PRODUCE AUMENTO DE OXIDANTES INTRACELULARES Y PERDIDA DEL POTENCIAL MITOCONDRIAL

Villaverde M.<sup>1</sup>; Gil Cardeza M.<sup>2</sup>; Rossi U.<sup>3</sup>; Glikin G.<sup>4</sup>; Finocchiaro L.<sup>5</sup>

*Instituto de Oncología Ángel H. Roffo<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
marcelavillaverde@hotmail.com

En nuestro laboratorio demostramos que la lipofección del gen interferon beta humano (hIFN $\beta$ ) complejado con liposomas catiónicos es altamente efectivo en distintas líneas tumorales humanas. Más aún, es efectivo en la línea de melanoma humano,

M8, resistente al tratamiento con la proteína recombinante beta (rhIFN $\beta$ ). Con el fin de dilucidar cuales son los mecanismos diferenciales entre el tratamiento génico y la proteína recombinante comparamos: a) la producción de especies oxidantes (DCDHF-DA), b) el potencial mitocondrial (MitotrackerRedCMXRos) y c) la sensibilidad al estrés oxidativo (MTS), en dos líneas tumorales humanas: i) M8 (sensible al hIFN $\beta$  y resistente a la rhIFN $\beta$ ) y ii) EW7 (sarcoma de Ewing, sensible a ambos tratamientos). Las líneas fueron sembradas en monocapas y i) lipofectadas con el gen  $\beta$ gal o hIFN $\beta$ ; ii) incubadas con rhIFN $\beta$ (1000 UI/ml, 1 pulso por día durante 3 días) o iii) incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-1000  $\mu$ M). A los 5 días post tratamiento encontramos que la lipofección del gen hIFN $\beta$  fue capaz de aumentar las especies oxidantes y promover la caída del potencial mitocondrial en ambas líneas mientras que rhIFN $\beta$  presentó estos efectos en la línea sensible EW7 pero no fue capaz de hacerlo en la línea resistente M8. Por otro lado, EW7 resulto 10 veces más sensible al estrés oxidativo que M8 (EW7<sub>IC50</sub>:35  $\mu$ M vs M8<sub>IC50</sub>:380  $\mu$ M). Por lo tanto, concluimos que el incremento de las especies oxidantes en paralelo a la caída del potencial mitocondrial serían eventos necesarios para la efectividad del interferón beta. Es probable que, la resistencia al estrés oxidativo sumada a la baja capacidad de hIFN $\beta$  de generar una concentración efectiva de oxidantes contribuya a la resistencia observada en M8. En cambio, la transferencia genética, al potenciar mecanismos mitocondriales amplificadores de la apoptosis, ofrecería una estrategia más efectiva que el uso de la proteína recombinante para una neoplasia como el melanoma, altamente resistente a las terapias convencionales

## FARMACOLOGIA 4

#### 447. (240) EFECTO DEL TEMPOL SOBRE LA RESPUESTA ANTIHIPERTENSIVA DEL NEBIVOLOL EN RATAS NORMOTENSAS E HIPERTENSAS POR ADMINISTRACIÓN DE L-NAME

Polizio A.<sup>1</sup>; Bertera F.<sup>2</sup>; Chiappetta D.<sup>3</sup>; Gorzalczy S.<sup>4</sup>; Taira C.<sup>5</sup>; Höcht C.<sup>6</sup>

*Departamento De Farmacología, UBA.<sup>1 2 4 5 6</sup>; Departamento de Tecnología Farmacéutica, UBA<sup>3</sup>*  
apolizio@ffybu.uba.ar

El nebivolol es un bloqueante beta-adrenérgico de tercera generación que además produce un efecto vasodilatador dependiente del óxido nítrico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la preadministración del antioxidante tempol sobre la respuesta del nebivolol en ratas Sprague Dawley normotensas e hipertensas por la inhibición de la óxido nítrico sintasa con L-NAME. Se utilizaron 20 ratas divididas en 4 grupos: Control (C), Control + Tempol (CT, 172 mg/L en el agua de bebida durante 7 días), L-NAME (H, 400 mg/L en el agua de bebida durante 14 días) y L-NAME + tempol (HT, tratadas con 400 mg/L, 14 días + 172 mg/L, 7 días, en el agua de bebida, respectivamente). El día del experimento se canuló la arteria carótida y la vena femoral, administrándose nebivolol 3 mg/kg por vía intravenosa y registrándose el cambio en la presión arterial media (PAM). El tratamiento con tempol no modificó la PAM basal en ninguno de los dos grupos. Las ratas tratadas con L-NAME registraron un incremento de la PAM. La respuesta antihipertensiva del nebivolol fue significativamente mayor en el grupo H ( $\Delta$ PAM:  $-20.4\pm 5.4\%$ ,  $p<0.05$ ) con respecto a las ratas C ( $\Delta$ PAM:  $-0.7\pm 1.7\%$ ). En el grupo de ratas normotensas, el tratamiento con tempol potenció significativamente el efecto hipotensor del nebivolol (C: PAM:  $-0.7\pm 1.7\%$ ; CT:  $\Delta$ PAM:  $-28.3\pm 3.1\%$   $p<0.05$ ). En cambio, el tratamiento conjunto de tempol con L-NAME no modificó la respuesta antihipertensiva en las ratas hipertensas por inhibición de la óxido nítrico sintasa (H:  $\Delta$ PAM:  $-20.4\pm 5.4\%$ ; HT:  $\Delta$ PAM:  $-21.7\pm 2.6\%$   $p<0.05$ ). En conclusión, la mayor respuesta antihipertensiva al nebivolol en ratas L-NAME sugiere la participación del sistema nervioso simpático en el mantenimiento de la presión arterial en este modelo de hipertensión experimental. La administración del antioxidante tempol potencia la respuesta cardiovascular del nebivolol por un mecanismo óxido nítrico dependiente.

**448. (459) ESTUDIO DE TOXICIDAD AGUDA EN RATÓN DE TRES PLANTAS ARGENTINAS CON ACTIVIDAD INSECTICIDA: HYBANTHUS PARVIFLORUS, HYBANTHUS BIGIBBOSUS Y OVIDIA ANDINA.**

Miño J.<sup>1</sup>; Tarcaya V.<sup>2</sup>; Cufre I.<sup>3</sup>; Broussalis A.<sup>4</sup>  
 Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA<sup>1,2</sup>; Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (UBA-CONICET). Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA<sup>3,4</sup>.  
 jmimo@ffyba.uba.ar

*Hybanthus parviflorus*, *Hybanthus bigibbosus* (Violaceae) y *Ovidia andina* (Thymelaeaceae) presentan actividad insecticida sobre sistemas experimentales (Broussalis et al., Crop Protection 29:953-6, 2010). El objetivo del presente trabajo es la evaluación de la toxicidad aguda, efectos sobre sistema nervioso central (SNC) y toxicidad dérmica y ocular de extractos de *H. parviflorus*, *H. bigibbosus* y *O. andina* en ratón. Se usaron extractos etanólicos de *H. parviflorus* y *H. bigibbosus* y diclorometánico de *O. andina*. Todos los tratamientos se realizaron vía p.o. Se evaluó para cada extracto la toxicidad aguda hasta los 5g/kg en 24hs. Los animales se observaron hasta los 15 días. Los efectos sobre SNC se estudiaron en ratones Swiss: Potenciación del tiempo de sueño por pentobarbital (PB) 40mg/kg, actividad motora espontánea, exploración en hole-board y efectos sobre memoria utilizando la prueba de retención de una respuesta de evitamiento inhibitorio (RREI). Se evaluó en conejos albinos la irritación primaria dérmica (IPD) y la ocular por el método de Draize. Para todos los extractos la toxicidad aguda es mayor de 5g/kg.

Tratamiento	Tiempo sueño PB	Actividad espontánea	Exploración
Control	24.70±2.08	821.70±45.47	61.50±2.67
<i>H. parviflorus</i> (5g/kg)	28.60±2.42	871.80±20.42	61.80±8.49
<i>H. bigibbosus</i> (5g/kg)	29.60±2.56	908.80±24.81	71.80±3.46
<i>O. andina</i> (5g/kg)	62.30±6.51*	222.20±47.76*	21.40±4.67*

En las columnas se representa la media (min)±SEM. \*P<0.001 vs control (ANOVA seguido de test de Bonferroni). El tratamiento post trial en el test de RREI con *O. andina* no afectó el aprendizaje. Los extractos no produjeron irritación ocular pero fueron levemente irritantes en el test de IPD. De acuerdo a los resultados de toxicidad aguda se concluye que *H. parviflorus* y *H. bigibbosus* son no tóxicas, sin efectos adversos sobre SNC. *O. andina* no produce mortalidad aunque si efectos depresores sobre el SNC. Las tres especies generan una leve irritación dérmica. Investigación financiada con aportes del proyecto UBACYTB404

**449. (781) QUIMIOTERAPIA INTRA-ARTERIAL SUPERSELETTIVA: FARMACOCINÉTICA DEL TOPOTECAN EN HUMOR VÍTREO DE CERDOS**

Buitrago E.<sup>1</sup>; Bramuglia G.<sup>2</sup>; Ceciliano A.<sup>3</sup>; Fandiño A.<sup>4</sup>; Asprea M.<sup>5</sup>; Sierre S.<sup>6</sup>; Chantada G.<sup>7</sup>; Schaiquevich P.<sup>8</sup>  
 Cátedra De Farmacología, FFYB - UBA<sup>1,2</sup>; Departamento de Radiología Intervencionista, Hospital de Pediatría JP Garrahan.<sup>3,6</sup>; Departamento de Oftalmología y Hematología-Oncología, Hospital de Pediatría JP Garrahan<sup>4</sup>; Departamento de Cuidado de Animales de Laboratorio, Hospital de Pediatría JP Garrahan.<sup>5,7</sup>; CONICET- Unidad de Farmacocinética clínica, Hospital de Pediatría J.P. Garrahan.<sup>8</sup>  
 buitragoemanuel@hotmail.com

La técnica de administración de quimioterapia intra-arterial oftálmica está siendo muy utilizada a nivel internacional en el tratamiento del Retinoblastoma (Rb). Sin embargo, no existen estudios preclínicos de farmacocinética que reporten sobre la penetración de la droga a nivel ocular y su exposición sistémica. El Topotecan (TPT) es administrado por vía endovenosa en el tratamiento del Rb y su administración sistémica se asocia con una alta incidencia de eventos adversos graves como mielosupresión. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la viabilidad

de una ruta alternativa para la administración local, y caracterizar la farmacocinética del TPT en el humor vítreo (HV) luego de la administración super-selectiva en la arteria oftálmica (IAO) de un modelo animal porcino. **Métodos:** Se realizó el cateterismo selectivo de la arteria oftálmica en cerdos a los que se les administró por infusión pulsátil durante 30 minutos una única dosis (1mg) de TPT. Las muestras de sangre se obtuvieron de la arteria femoral, mientras que las de HV utilizando la técnica de micro-dialísis en intervalos de 30 minutos hasta las 4 hs post-administración. En ambos casos las muestras fueron analizadas por HPLC. **Resultados:** Luego de la administración de TPT por vía IAO en cerdos, la exposición vítreo media expresada como AUC y C<sub>max</sub> fue de 299.8 ng/ml\*h y 131.8 ng/ml, respectivamente, siendo 29 y 16 veces mayor a la exposición sistémica media (AUC<sub>pl</sub>: 10.6 ng\*h/ml, C<sub>max,pl</sub>: 8.1 ng/ml). **Conclusiones:** Se logró caracterizar la farmacocinética del TPT en HV luego de la administración IAO. La administración de TPT IAO en cerdos mostró altas concentraciones de TPT en HV durante el tiempo estudiado lo que representa una potencial alternativa a la quimioterapia sistémica para el tratamiento del Rb.

**450. (438) MODELO MATEMÁTICO DE LA HOMEOSTASIS DEL SISTEMA GLUCOSA-INSULINA EN LA RATA NORMAL**

Lombarte M.<sup>1</sup>; Campetelli G.<sup>2</sup>; Fina B.<sup>3</sup>; Lupo M.<sup>4</sup>; Basualdo M.<sup>5</sup>; Rigalli A.<sup>6</sup>;  
 Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Medicina. UNROSARIO; CIFASIS-CONICET-UTN-FRRO. Rosario.<sup>1,2</sup>  
<sup>5</sup>; Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Medicina. UNROSARIO<sup>3,4,6</sup>  
 arigalli@conicet.gov.ar

Existen algunos modelos matemáticos de la interacción glucosa-insulina para humanos sanos y diabéticos. Los modelos requieren un número importante de ecuaciones diferenciales y parámetros, muchos de ellos de gran dificultad para poder obtenerse. Su principal utilidad ha sido probar estrategias de control para desarrollar la ingeniería conceptual de un páncreas artificial. El objetivo de este trabajo es plantear un modelo simplificado de la homeostasis del sistema glucosa-insulina para la rata normal. Esto posibilita realizar experimentos preliminares para desarrollar una metodología para el cálculo de los parámetros individuales a partir de las evoluciones temporales de glucemia (G) e insulinemia (I). La expectativa es luego extrapolarlo para seres humanos. El modelo tiene dos ecuaciones diferenciales que representan las variaciones de G e I, expresadas en función de sus respectivos valores basales y actuales, además del umbral renal. Incluye constantes asociadas al funcionamiento hepático (k4), absorción intestinal (ka y ko), de consumo tisular (k7) y variaciones de glucosa a nivel renal (k5). Para la insulina se consideran las constantes de secreción (k1) y de desaparición plasmática (k6). El modelo se validó con ratas Sprague-Dawley de 70 días (n=5). Se administró una ingesta oral de 0,6 g/100g de pc y se midió G e I durante 180 min. A partir de estos datos se obtuvo una estimación de los parámetros empleando una herramienta computacional para el ajuste no lineal. Los valores de las constantes fueron ko=0.0021±0,0008 mg/dl min, k1=0.61±0,09 pmol.dl/min.mg.l, k4=6x10<sup>-5</sup>±1x10<sup>-6</sup> mg.l/min pmol.dl, k6=0.019±0,009 /min, k7=2.9x10<sup>-4</sup>±7x10<sup>-5</sup> mg.l/min. pmol.dl, ka=0.038±0,012 min<sup>-1</sup>, media±SD. La predicción del modelo mostró un muy buen ajuste de los datos experimentales. Por tanto, la metodología propuesta permite hallar los valores de los parámetros para cada rata, prescindiendo de valores promedios o de bases de datos.

**451. (686) ESTUDIO DEL EFECTO ANTIADIPOGÉNICO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE ROSMARINUS OFFICINALIS L. EN LA DIFERENCIACIÓN DE PREADIPOCITOS 3T3-L1**

Gaya M.<sup>1</sup>; Repetto V.<sup>2</sup>; Piwien Pilipuk G.<sup>3</sup>; Moreno S.<sup>4</sup>  
 Fundación Instituto Leloir, I.I.B.B.A -CONICET<sup>1,2,3,4</sup>  
 smoreno@leloir.org.ar

Diversos fitoquímicos son capaces de regular el ciclo de vida de adipocitos, hecho que recibe considerable atención debido

a las limitaciones y efectos colaterales de las drogas que se disponen actualmente para el tratamiento de obesidad, diabetes tipo2 y dislipidemias. El *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sintetiza una gran cantidad de polifenoles antioxidantes, grupo ubicuo de metabolitos secundarios. En este trabajo investigamos el efecto de dichos compuestos sobre la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1. Con tal fin, evaluamos la capacidad de los polifenoles de romero para inhibir la acumulación de triglicéridos por tinción con Oil Red O y su efecto sobre la viabilidad celular utilizando el reactivo de MTS. Tanto el extracto de romero como su principal polifenol, el ácido carnósico, inhibieron la diferenciación adipocítica a concentraciones que no afectaron la viabilidad celular luego de sólo 24 horas de tratamiento (30 µg/ml y 7,5 µg/ml respectivamente). Los eventos moleculares que tienen lugar durante el proceso de adipogénesis involucran factores de transcripción de expresión temprana (C/EBPβ) y tardía (PPARγ). C/EBPβ se presenta en dos formas: LAP (Liver Activating Protein) y LIP (Liver Inhibitory Protein), siendo la primera la mayoritaria. Cuando se induce la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 en presencia de los polifenoles de romero, encontramos un aumento de la isoforma inhibitoria LIP en relación a las isoformas activadoras LAP de C/EBP β. De manera relevante, no observamos aumento en el nivel de expresión de PPARγ que ocurre cuando la diferenciación adipocítica tiene lugar. En síntesis, estos resultados demuestran que los polifenoles del romero ejercen su efecto antiadipogénico interfiriendo en la expresión de factores de transcripción cruciales en la adquisición del fenotipo adipocítico. De este modo, compuestos de romero resultarían beneficiosos en el tratamiento de la obesidad y enfermedades relacionadas.

**452. (491) EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE DEXAMETASONA SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA Y LAS ACTIVIDADES METABÓLICAS DE ENZIMAS DE FASE 1 EN EL HIGADO Y EN LA MUCOSA INTESTINAL DE OVINOS.**

Mate L.<sup>1</sup>; Virkel G.<sup>2</sup>; Ballent M.<sup>3</sup>; Lifschitz A.<sup>4</sup>; Sallovitz J.<sup>5</sup>; Iezzi S.<sup>6</sup>; Lanusse C.<sup>7</sup>

Lab. Farmacología; FCV; UNCPBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
mlmate@vet.unicen.edu.ar

La dexametasona (DEX) es un glucocorticoide con efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, utilizado para estudiar diferentes mecanismos de expresión de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos. Por ejemplo, el tratamiento prolongado con DEX induce la expresión de CYP3A4 en humanos y modula la expresión de varias enzimas y sus respectivas actividades metabólicas en bovinos. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la administración crónica de DEX (7 días a razón de 3 mg/kg/día) sobre la actividad y la expresión genética de diferentes enzimas de fase 1 en el hígado y en la mucosa intestinal de ovinos. Se prepararon microsomas hepáticos y de la mucosa intestinal para cuantificar las actividades metabólicas CYP3A, CYP1A y flavin-monooxigenasa (FMO) utilizando sustratos específicos de cada una. El nivel de expresión de estas enzimas se determinó a través de la cuantificación de los ARN mensajeros (ARNm) específicos utilizando PCR en tiempo real. El tratamiento crónico con DEX incrementó ( $p < 0.01$ ) las actividades metabólicas CYP3A-dependientes (triacetiloleandomicina N-desmetilasa = 310% y eritromicina N-desmetilasa = 195%) a nivel hepático. No hubo un aumento significativo de la expresión hepática del ARNm de CYP3A. Se observó una disminución de las actividades CYP1A (70%,  $p < 0.001$ ) y FMO (28%,  $p < 0.05$ ) a nivel hepático, no relacionada con los niveles de expresión de los ARNm de ambas enzimas. La actividad metabólica CYP3A-dependiente (eritromicina N-desmetilasa) fue 37.5% mayor ( $p < 0.05$ ) en la mucosa intestinal de los animales tratados con DEX, aunque no se detectaron diferencias significativas en los niveles del ARNm específico de esta enzima. DEX modificó en diferente grado la actividad y la expresión de las enzimas de fase 1 estudiadas. El efecto de la exposición a diferentes xenobióticos sobre la capacidad metabólica hepática e intestinal en ruminantes continúa bajo estudio en nuestro laboratorio.

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 4**

**453. (538) TRÁFICO DE nNOS A MITOCONDRIA EN EL ESTRÉS CELULAR POR DEPRIVACIÓN DE FACTORES TRÓFICOS**

Perez H.<sup>1</sup>; Alippe Y.<sup>2</sup>; Cecilia P.<sup>3</sup>; Carreras M.<sup>4</sup>; Poderoso J.<sup>5</sup>

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 4 5</sup>  
hernanperez82@gmail.com

La inhibición de la proliferación por privación de factores tróficos conduce al arresto o a la muerte celular. Considerando el rol de las mitocondrias en las vías de señalización en los procesos de proliferación y apoptosis, del NO en la modulación de citocromo oxidasa y la presencia de nNOS en mitocondrias (mtNOS), estudiamos la expresión de nNOS en relación al contenido matricial de NO en células NIH/3T3 durante la privación de factores tróficos. La hipótesis general es que la mtNOS, a través de la producción de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, modula vías de señalización que culminan en el arresto celular y la diferenciación. El objetivo es demostrar la correlación entre la actividad de mtNOS y el arresto del ciclo celular vía Sirt3. Para ello, las células fueron privadas de suero durante 0-72h. Desde las 24 h se observó un fuerte arresto y niveles mínimos de apoptosis ( $\leq 5\%$ ;  $p < 0,05$ ), detectados por citometría de flujo y conteo celular. El arresto en G1 fue parcialmente revertido (50%) con L-NAME 2 mM. Luego de 24 h de privación, la expresión de nNOS a nivel de mRNA y proteína comenzó a incrementarse (RT-PCR: 4 veces el control a 24 h; WB: 10 veces el control a 48 h). A las 48-72h, el incremento de nNOS fue seguido de su translocación a mitocondria, demostrado por su relativa disminución en citosol e incremento proporcional en las organelas. La citometría de flujo en células enteras y mitocondrias aisladas con DAF-FM demostró elevados niveles de NO (+50% a 48 hs), confirmado por microscopía confocal y asociado a disminución del consumo de oxígeno por inhibición de COX (-50% a 48 hs) y significativa liberación mitocondrial de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, la expresión de Sirt3 se incrementó con la privación, alcanzando un pico a las 24-48 h. Los resultados sugieren que el incremento transcripcional de la nNOS y su translocación a mitocondria con producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inicia vías de señalización a través de Sirt3 que conducen al arresto de células NIH/3T3 durante la privación de suero.

**454. (545) MECANISMO MOLECULAR DE INTERNALIZACION CRUZADA ENTRE LOS RECEPTORES H1 Y H2 DE HISTAMINA**

Alonso N.<sup>1</sup>; Notcovich C.<sup>2</sup>; Fernandez N.<sup>3</sup>; Davio C.<sup>4</sup>; Shayo C.<sup>5</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental<sup>1 2 5</sup>; Cátedra de Química Medicinal, FFyB-UBA<sup>3 4</sup>  
nati\_alonso05@hotmail.com

Los receptores a histamina pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). El receptor H1 (rH1) modula la producción de IPs, mientras que el receptor H2 (rH2) regula los niveles de AMPc. Estudios previos de nuestro laboratorio indican que dichos receptores poseen la capacidad de cointernalizar ante el estímulo con ligandos agonistas como parte de la regulación cruzada que existe entre ellos. Dado que en otros sistemas ha sido descripto que la internalización del rH1 es dependiente de caveolina, mientras que la del rH2 es dependiente de clatrina, el objetivo de este trabajo es evaluar el mecanismo de cointernalización de los rH1 y rH2 en células CHO transfectadas con ambos receptores (CHOH1-H2). Al evaluar mediante ensayos de unión el número de sitios receptores de membrana luego de 1 h de tratamiento con los agonistas específicos (2, 3-trifluorometilfenilhistamina para el rH1 y amthamina para el rH2), observamos que en este sistema la internalización del rH1 estimulada por el agonista H1 es bloqueada en un 100% por filipin (inhibidor de la endocitosis mediada por caveolina). Sorprendentemente este inhibidor también bloqueo en un 95% la internalización del

rH2 estimulada por el agonista H1. Por otro lado, al evaluar la internalización de los receptores en presencia de una construcción dominante negativa de EPS15, proteína necesaria para la internalización mediada por clatrina, observamos un bloqueo del 75% de la endocitosis del rH2 estimulada por el agonista H2 y una inhibición del 100% en la cointernalización del rH1 inducida por el mismo ligando. Por lo tanto estos resultados indican que el mecanismo de cointernalización de los receptores H1 y H2 a histamina en células CHO-H1-H2, no depende del tipo de receptor sino del estímulo aplicado, siendo dependiente de caveolina en caso de ser inducida por agonistas H1 y dependiente de clatrina en caso de ser inducida por agonistas H2.

**455. (585) LA TRANSLOCACIÓN DE LA DIACILGLICEROL KINASA (DAGK) Y SU ACTIVACIÓN POR PKC COMO REGULADORA DE LA TRANSLOCACIÓN DE ARRESTINA EN SEGMENTOS EXTERNOS DE VERTEBRADOS.**

Zulian S.<sup>1</sup>; Natalini P.<sup>2</sup>; Ilicheta De Boscherio M.<sup>3</sup>; Giusto N.<sup>4</sup>

*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca UNS CONICET*<sup>1 2 3 4</sup>

<sezulian@criba.edu.ar>

Uno de los mecanismos de desactivación de la acción de la luz en células fotorreceptoras de la retina de vertebrados es la translocación de enzimas ligadas a la fototransducción lo que favorece la adaptación a la luz. Mientras que transducina transloca hacia el segmento interno (RIS), arrestina (Arr) lo hace en el sentido opuesto. La translocación de Arr hacia los segmentos externos (ROS) es mediada por la activación de PIP2-PLC y de PKC y no tiene lugar en ausencia de fosforilación por PKC (Orisme et al, 2009). Hemos reportado la translocación de DAGK dependiente de luz en retinas de ratas adaptadas a oscuridad y también en preparaciones de ROS de retinas bovinas luego de la exposición de la copa del ojo a la luz (Zulian et al, IVO 2009). Para evaluar: 1) la relación entre la translocación por luz de DAGK y la producción de su sustrato mediado por la activación de la PIP2-PLC; 2) si la fosforilación por PKC regula la actividad de DAGK, se utilizaron ambos modelos experimentales. Para responder 1) se expusieron los ojos enucleados (ratas adaptadas a oscuridad) a la acción de la luz en ausencia y en presencia del inhibidor de PIP2-PLC, U73122. Se utilizó inmunohistoquímica empleando a-DAGKe y a-arrestina visual. U73122 antes y durante la exposición a la luz bloqueó la migración de DAGKe, manteniendo su ubicación en el RIS, mientras que la translocación de Arr también fue afectada, ya que se distribuyó entre ambos compartimientos. Para responder 2), los ROS aislados en luz se expusieron a la presencia de activadores de fosfatasa, de inhibidores de la fosforilación en Ser-Treo y de estimuladores de PKC. La actividad DAGK sobre DAGs endógenos fue inhibida por el empleo de fosfatasa exógenas y estimulada por Ac. Okadaico y por estimuladores de PKC típicas (DAG, PS y Ca<sup>++</sup>). Nuestros resultados indicarían que en la translocación de Arr, dependiente de la activación de PIP2-PLC y PKC, la translocación de la DAGK podría ser un componente regulador esencial.

**456. (635) LOS AGONISTAS INVERSOS DEL RECEPTOR H2 A HISTAMINA PUEDEN ACTIVAR OTRAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN INDEPENDIENTES DE LA MODULACIÓN DE SEGUNDOS MENSAJEROS**

Alonso N.<sup>1</sup>; Gottardo F.<sup>2</sup>; Shayo C.<sup>3</sup>; Davio C.<sup>4</sup>; Fernandez N.<sup>5</sup>

*Instituto de Biología y Medicina Experimental*<sup>1 3</sup>; *Cátedra de Química Medicinal FFyB-UBA*<sup>2 4 5</sup>

nati\_alonso05@hotmail.com

Los ligandos de los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) 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 autorregulatorios de corte de señal así como de señalizar a través de miembros de la familia de las MAPK en forma independiente de

segundos mensajeros. 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 pueden regular la actividad de ERK1/2. Mediante ensayos de concentración-respuesta realizados en células HEK293T transfectadas con el rH2 observamos que los ligandos: cimetidina famotidina, tiotidina y ranitidina disminuyen los niveles basales de AMPc, comportándose efectivamente como agonistas inversos. Al evaluar los niveles de pERK1/2 mediante western blot, a distintos tiempos de tratamiento con dichos ligandos, observamos que sólo ranitidina y tiotidina provocan un incremento a los 10 min en la fosforilación de ERK, a pesar de que los 4 ligandos ensayados disminuyen en forma similar los niveles de AMPc. Por otro lado, ensayos de unión mostraron una disminución en la cantidad de sitios receptores en la membrana plasmática luego del tratamiento con ranitidina y tiotidina (50% n=3, p<0,05) en forma similar a lo observado con el agonista, mientras que cimetidina y famotidina no conducen a la internalización del rH2. Resultados similares fueron obtenidos al evaluar la localización del rH2YFP mediante microscopía confocal. En base a estos resultados podemos concluir que de los agonistas inversos estudiados, ranitidina y tiotidina promueven la internalización del rH2 y regulan los niveles de pERK en forma independiente a la modulación de AMPc, mostrando un perfil farmacológico novedoso e importante llegado el momento de su prescripción clínica.

**457. (639) CARACTERIZACIÓN DE DOS MUTANTES EN F424 DEL RECEPTOR H1 A HISTAMINA. ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA EN LA SEÑALIZACIÓN DE OTRO RECEPTOR QUE TRANSDUCE SU SEÑAL A TRAVÉS DE LA MISMA VÍA.**

Zappia C.<sup>1</sup>; Granja Galeano G.<sup>2</sup>; Fabian L.<sup>3</sup>; Tubio M.<sup>4</sup>; Shayo C.<sup>3</sup>; Davio C.<sup>3</sup>; Monczor F.<sup>7</sup>

*Cátedra de Química Medicinal, FFyB-UBA*<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; *Instituto de Biología y Medicina Experimental*<sup>F</sup>  
danielzappia@hotmail.com

El receptor H1 a histamina (rH1) es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) y señaliza a través de la proteína Gq. Hemos descrito que el rH1 puede adquirir una conformación inactiva que secuestra proteína G e interfiere en la señalización de otros GPCRs que transducen a través de la misma vía. Otros autores observaron que mutantes en la fenilalanina 303 del dominio TM6 del receptor  $\alpha 1b$  adrenérgico coimmunoprecipitan con la proteína G en forma inactiva. Mediante estudios de alineación determinamos que la F303 esta conservada en la mayoría de los GPCRs, siendo la F424 el homólogo para el rH1. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de mutar este residuo sobre la funcionalidad del rH1. Estimamos las interacciones que presenta F424 a través del modelado por homología con la estructura del receptor  $\beta 2$  adrenérgico, utilizando el servicio SwissModel y posterior minimización con el programa NAMD. Dado que el anillo aromático de la F424 posee interacciones C-C con I420, T428, N460, N464, L69, S114, e I115, evaluamos el efecto de eliminarlo o reemplazarlo por un residuo hidrofílico al mutar F por A y por S. En el primer caso se pierden dichas interacciones y en el segundo, además se gana un enlace puente de hidrógeno con el carbonilo de M421. En base a esto, realizamos dichas mutaciones en el rH1 y evaluamos en células HEK293T transfectadas la capacidad de las mutantes de interferir en la señalización de otro GPCR que utiliza la misma vía de transducción. Al evaluar la acumulación de Ca<sup>2+</sup> intracelular en respuesta a distintas concentraciones de ATP, observamos que la presencia de las mutantes F424A y F424S y no del rH1 salvaje, reducen en un 30% y en un 50% respectivamente la respuesta del rATP sin modificar su CE50 (pCE50=5,8±0,1). Estos resultados sugieren que las mutaciones realizadas sobre el rH1 podrían inducir espontáneamente una conformación del receptor capaz de secuestrar Gq e interferir en la respuesta de otros GPCRs que señalicen por la misma vía.

**458. (647) LOS PROGESTÁGENOS REGULAN LA EXPRESIÓN DE P21WAF1/CIP1 A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE VÍAS RÁPIDAS DE SEÑALIZACIÓN Y LA UNIÓN DE**

### STAT3 AL PROMOTOR DE P21 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

Vicario R.<sup>1</sup>; Béguelin W.<sup>2</sup>; Proietti C.<sup>3</sup>; Rivas M.<sup>4</sup>; Tkach M.<sup>5</sup>; Izzo F.<sup>6</sup>; Schillaci R.<sup>7</sup>; Elizalde P.<sup>8</sup>; Diaz Flaqué M.<sup>9</sup>  
*Instituto de Biología y Medicina Experimental*<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
 rociovicario@hotmail.com

La progesterona tiene efectos bifásicos sobre la proliferación de células de cáncer de mama: estimula la proliferación en el primer ciclo celular y luego arresta las células en la fase G1/S del segundo ciclo, acompañado por un aumento de la expresión del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. El receptor de progesterona (RP) actúa como factor de transcripción dependiente de ligando. Además de los efectos clásicos del RP se han descrito efectos rápidos o no-genómicos del receptor sobre diversas vías de transducción de señales. En nuestro laboratorio se demostró que el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la activación de la proteína Stat3 y del receptor tirosina quinasa ErbB2. El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación de la expresión de p21 por MPA y las vías de señalización involucradas. Mostramos que el RP unido a su ligando regula la transcripción del gen de p21 por un mecanismo no clásico, ya que el promotor de este gen carece de elementos respondedores a progesterona (PRE). Demostramos que el MPA aumenta la expresión de la proteína p21 y induce su activación transcripcional en células C4HD, provenientes de un tumor mamario murino, y en la línea celular de cáncer de mama humano T47D. El pre-tratamiento de las células con inhibidores farmacológicos de Src o de las vías PI-3K/Akt o MAPKs, redujeron los niveles proteicos de p21 inducidos por MPA. Por otro lado el silenciamiento de Stat3 y ErbB2 con siRNA disminuyeron la expresión de p21 inducida por MPA. Finalmente, por ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, demostramos que el MPA induce el reclutamiento de Stat3 y ErbB2 a un sitio de unión a Stat3 en el promotor de p21. En conclusión, demostramos que los progestágenos inducen la expresión de p21 a través de la activación de las vías rápidas de señalización Src, PI-3K/Akt y MAPKs, que inducen la unión directa de Stat3 sobre su sitio en el promotor de p21 y el co-reclutamiento de ErbB2.

### 459. (648) SEPSIS, INOS Y DINÁMICA MITOCONDRIAL HEPÁTICA EN LA RATA

Elguero E.<sup>1</sup>; González A.<sup>2</sup>; Kersting S.<sup>3</sup>; Pavolotzki C.<sup>4</sup>; Peralta J.<sup>5</sup>; Poderoso J.<sup>6</sup>; Carreras M.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires*<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
 eugeelguero@gmail.com

Previamente se demostró daño mitocondrial en la endotoxemia experimental por LPS y en ligadura cecal (LCP) en ratas asociado a inducción de iNOS y alteraciones hepáticas. El interés de este trabajo radica en dilucidar los efectos deletéreos intramitocondriales en ambos modelos y si el importe de iNOS favorece a los mismos. Confirmamos que inoculación de 10 mg de LPS produce translocación de iNOS a mitocondrias *in vivo* 4-6 hs post-tratamiento. Experimentos de transcripción-traducción *in vitro* (TTI) con cDNA de iNOS marcado con v5 e importe en mitocondrias preincubadas con citosol de hígado de rata control demostraron escaso importe de iNOS recombinante. Sin embargo, la preincubación con citosol séptico, determinó un significativo aumento del importe de iNOS (0,06 ± 0,04 vs 0,75 ± 0,14; p<0,036); la fosforilación de iNOS por Src recombinante produjo un importe superior al observado con citosol control. Asumiendo que citosol séptico contiene numerosos mediadores inflamatorios, se estudió la regulación transcripcional (qPCR) de GTPasas que actúan sobre fisión (Drp1) y fusión mitocondrial (Mfn2). Se observó una disminución significativa del mRNA para Mfn2 en ambos modelos con una disminución acentuada a las 4-6 hs en LPS y 12-18 hs en LCP, sin modulación proporcional de Drp1. Estos cambios se acompañaron de aumento significativo de fisión (alteración de la morfología tubular mitocondrial) mediante análisis por microscopía electrónica a las 6hs de LPS (control: 65 ± 1 vs. LPS: 30 ± 7 mitocondrias tubulares/ U área, p<0,008) y 12hs de LCP (control:

65 ± 1 vs LCP: 9 ± 2 mitocondrias tubulares/ U área, p<0,000). Se concluye que a) factores presentes en el citosol séptico o fosforilación de iNOS por Src favorecen su importe, b) iNOS es importada en el período crítico de fisión consecuente a disminución de RNAm de proteínas de fusión; c) la disfunción mitocondrial séptica por fisión produce lesión secuencial del hígado como parte del síndrome multiorgánico.

### 460. (662) ROL REGULADORIO DE P21 SOBRE LA REPLICACIÓN DE ADN DAÑADO

Mansilla S.<sup>1</sup>; Soria G.<sup>2</sup>; Speroni J.<sup>3</sup>; Federico M.<sup>4</sup>; Gottifredi V.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Ciclo Celular y Estabilidad Genómica - Fundación Instituto Leloir*<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 smansilla@leloir.org.ar

Las lesiones producidas durante la duplicación del ADN pueden producir bloqueos irreversibles en la horquilla de replicación y muerte celular. Para garantizar la continuidad de la replicación el proceso conocido como síntesis a través de lesiones (TLS-translesion DNA synthesis) promueve un intercambio de polimerasas replicativas por polimerasas permisivas. Dichas polimerasas pueden acomodar bases dañadas y usarlas como molde, garantizando así la continuidad de la replicación aunque con la potencialidad de aumentar la mutagénesis. Se han identificado diversas polimerasas con especificidades distintas para cada tipo de lesión (por ej.; pol  $\zeta$ , específica para dímeros de timidina), pero poco se sabe de su regulación. Nuestro grupo identificó a p21 como un regulador negativo del cargado de pol $\zeta$  sobre ADN lesionado. Para establecer si p21 actúa como regulador negativo de TLS determinamos si su efecto se extendía a todas las polimerasas de TLS. Utilizamos mutantes estables de p21 que resisten la proteólisis inducida por irradiación UV y observamos que p21 inhibe el reclutamiento de otras polimerasas de TLS (pol $\kappa$ , pol $\eta$  y REV1) al ADN lesionado. Esto se corroboró comparando cinéticas de reclutamiento de polimerasas en líneas celulares isogénicas HCT 116 p21<sup>-/-</sup> y p21<sup>+/+</sup>. El efecto negativo de p21 sobre la activación de TLS fué confirmado utilizando un novedoso ensayo (DNA Combing) que nos permite medir la progresión de horquillas de replicación individuales. Nuestros resultados sugieren que la asociación de p21 a horquillas de replicación activas podría inhibir el reclutamiento de polimerasas permisivas a la zona de daño. En conjunto, nuestros datos indican que los niveles basales inhiben la mutagénesis innecesaria asociada a la utilización de polimerasas permisivas para la replicación de ADN intacto, mientras que la proteólisis de p21 inducida por luz UV promueve la gradual y correcta activación de TLS.

### 461. (664) REGULACION DE LOS NIVELES DE AMPc EN CELULAS TUMORALES PANCREATICAS AR42J. ROL DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS A RESISTENCIA A MULTIDROGAS (MRPS).

Díez F.<sup>1</sup>; Rodríguez M.<sup>2</sup>; Gómez N.<sup>3</sup>; García C.<sup>4</sup>; Copsel S.<sup>5</sup>; Shayo C.<sup>6</sup>; Bianciotti L.<sup>7</sup>; Davio C.<sup>8</sup>  
*Cátedra de Química Medicinal Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires*<sup>1 3 4 8</sup>; *Cátedra De Fisiopatología Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires*<sup>2 7</sup>; *Instituto de Biología y Medicina Experimental CONICET*<sup>5 6</sup>  
 diezfedez10@gmail.com

La señalización vía AMPc controla procesos celulares tales como proliferación, diferenciación y apoptosis, tanto en células normales como tumorales. La regulación de los niveles intracelulares de AMPc (AMPci) esta mediada por su degradación a través de fosfodiesterasas, desensibilización de GPCRs y recientemente se asoció también a su exclusión por medio de MRPs. En este trabajo estudiamos dicha regulación en células AR42J frente a agentes capaces de modular el AMPc. Sus niveles se evaluaron a través de un ensayo de competición de [<sup>3</sup>H]AMPc por PKA. Sorprendentemente, Amtamina (agonista H2) y prostglandina E<sub>2</sub> de manera tiempo y concentración dependiente, disminuyen el AMPci (65% vs basal en ambos casos), mientras que en acinos

pancreáticos normales inducen un incremento del mismo. Por otra parte, Forskolina y Secretina producen un incremento del AMPc alcanzando un máximo a los 5 minutos y permaneciendo elevado por encima del nivel basal por el resto del ensayo (1h). La acumulación de AMPc extracelular (AMPce) aumenta alcanzando su máximo nivel a la hora de estímulo. El tratamiento con Probenecid (inhibidor de MRPs) inhibió dicha exclusión (35 y 85% respectivamente) y al mismo tiempo causó un mayor incremento del AMPc (20 y 59% respectivamente). El patrón cinético no se modificó en presencia de MIX (inhibidor de fosfodiesterasas). Por PCR en tiempo real se detectó la expresión de MRP4, MRP5 y MRP8, y por western blot la expresión de MRP4. Estos resultados indican que los MRPs regulan los incrementos de AMPc en células AR42J favoreciendo su salida, sugiriendo que la extrusión a través de dichos transportadores puede ser un mecanismo adicional en la regulación de los niveles de AMPc en este sistema, más aún la alteración en la respuesta a ligandos clásicos asociados a incrementos intracelulares de AMPc sugieren que el metabolismo de dicho nucleótido se encuentra alterado en células tumorales respecto de acinos pancreáticos normales.

#### 462. (717) CAMBIOS DINÁMICOS EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE HETEROCHROMATIN PROTEIN (HP) 1 GAMA DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR Y EL ESTRÉS TÉRMICO

Charó N.<sup>1</sup>; Piwien Pilipuk G.<sup>2</sup>  
IIBBA-CONICET<sup>1</sup>; IByME-CONICET<sup>2</sup>  
nancycharo@hotmail.com

En estudios recientes demostramos que HP1 $\gamma$  se localiza tanto en regiones nucleares eucromáticas como heterocromáticas en preadipocitos 3T3-L1, pero al inducir su diferenciación HP1 $\gamma$  se concentra transitoriamente en el polo del núcleo opuesto al MTOC. La polarización nuclear de HP1 $\gamma$  requiere de su fosforilación en Ser 83 dependiente de la activación de PKA. Nos preguntamos entonces si la redistribución nuclear de HP1 $\gamma$  ocurría en otros procesos de diferenciación celular, como por ejemplo la miogénesis, o en respuesta al estrés. Empleando inmunofluorescencia indirecta (IFI) y microscopía confocal observamos que en mioblastos C2C12, HP1 $\gamma$  se localiza en regiones nucleares eucromáticas y heterocromáticas. Llamativamente luego de 4 días de inducida la miogénesis, HP1 $\gamma$  se localiza no sólo en los núcleos sino también en el citoplasma de los miotubos donde colocaliza parcialmente con fibras de actina teñidas con faloidina. Análisis por Western blot (WB) de las fracciones nucleares y citoplasmáticas también demuestra que en los miotubos HP1 $\gamma$  se detecta tanto en la fracción nuclear como en la citoplasmática. La inducción de la diferenciación de los mioblastos se acompaña de un aumento en la fosforilación de HP1 $\gamma$  en Ser83, y dicha forma fosforilada de HP1 $\gamma$  se detecta por IFI sólo en el núcleo. Por otra parte, durante el estrés térmico HP1 $\gamma$  se distribuye en el núcleo en foci donde colocaliza con la RNAPolIII fosforilada en Ser 2. Además, el WB demuestra que HP1 $\gamma$  se fosforila en Ser 83 entre los 15- 30 min de inducido el estrés térmico. En síntesis, HP1 $\alpha$  experimenta rápidos cambios en su distribución subnuclear dependiendo del tipo celular y del estímulo que reciba la célula. Nuestros resultados sugieren que HP1 $\gamma$  no sólo se localiza en el núcleo sino que trasloca a citoplasma en los miotubos y nos encontramos avocados a dilucidar el rol que HP1 $\alpha$  cumpliría en dicho compartimento celular.

#### 463. (786) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PEQUEÑOS ARNS TRANSCRIPTOS DEL ADN SATELITAL MAYOR Y MENOR DURANTE DISTINTOS PROCESOS DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Susperreguy S.<sup>1</sup>; Piwien Pilipuk G.<sup>2</sup>  
IIBBA - CONICET<sup>1</sup>; IByME - CONICET<sup>2</sup>  
susperreguy@fcq.unc.edu.ar

La diferenciación celular, proceso por el cual una célula adquiere un determinado fenotipo, implica un estricto control de la expresión coordinada de ciertos genes mientras el resto es silenciado. En estudios previos demostramos que al inducirse la diferenciación adipocítica de los fibroblastos 3T3-L1, C/EBP $\beta$ ,

uno de los factores que controla la expresión de genes durante la adipogénesis, se concentra en los cromocentros al unirse a sitios consenso presentes en el ADN satelital mayor. Empleando inmunofluorescencia indirecta (IFI) y microscopía confocal observamos la presencia de la RNAPol II rodeando a los cromocentros, colocalizando con C/EBP $\beta$ . Estos resultados sugieren un posible rol de C/EBP $\beta$  en el reclutamiento de la polimerasa como parte de un mecanismo regulatorio de la transcripción en un microambiente nuclear desfavorable para dicho proceso como lo es el dominio heterocromático de los cromocentros. Investigamos entonces si los niveles de pequeños RNAs transcripts a partir de ADN satelital (ARN-sat) se modificaban al inducir la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1. Datos preliminares demuestran que los niveles de ARN-sat aumentan durante las primeras 48hs post-inducción de la diferenciación adipocítica. Analizamos también si estos eventos tenían lugar durante otros procesos de diferenciación como el de miogénesis empleando mioblastos murinos C2C12. Observamos también un incremento de ARN-sat durante los primeros estadios de la diferenciación de los mioblastos C2C12. Estamos investigando qué vías de señalización podrían regular la expresión de estos ARN-sat y si factores de transcripción que se concentran en heterocromatina pericentromérica, como C/EBP $\alpha$  podrían regular el nivel de estos pequeños transcripts.

### HEMATOLOGÍA 3

#### 464. (46) SECUENCIA DE LA REPOBLACION HEMOPOYETICA EN ANIMALES APLASICOS TRASPLANTADOS CON MEDULA OSEA HIPOXICA

Mide S.<sup>1</sup>; Huygens P.<sup>2</sup>; Boyer P.<sup>3</sup>; Bozzini C.<sup>4</sup>  
Cátedra de Fisiología Facultad de Odontología UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
susanamide@fibertel.com.ar

En estudios previos se observó que la formación del microambiente hemopoyético precede a la anidación de las células stem en animales aplásicos trasplantados. Estudios *in vivo* e *in vitro* demostraron que la tensión de oxígeno regula la actividad de dichas células. Sin embargo, se desconoce el efecto de la hipoxia sobre la repoblación celular en relación al microambiente. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del inóculo hipóxico trasplantado sobre el microambiente hemopoyético en animales normóxicos. Ratones CF1 normóxicos se dividieron en grupos: Control no irradiado (C, n=10) e irradiados letalmente (I, n=40). Los animales I se subdividieron: I-Normóxico (IN, n=20) e I-Hipóxico (IH, n=20). IN e IH fueron trasplantados con 1.4x10<sup>6</sup> células de médula ósea normóxica (MON) o hipóxica (MOH), respectivamente. Los animales se sacrificaron a 7 (t7) y 14 (t14) días post-trasplante, se extrajeron fémur (MO) y bazo (B), para recuento celular, citomorfología e histopatología. El recuento celular de MO y B constituyeron la hemopoyesis total. Resultados: A t7, la hemopoyesis total (células x 10<sup>6</sup>) en IN vs IH vs C fue de 81.6 $\pm$ 3.6 vs 68.1 $\pm$ 1.4 vs 402.6 $\pm$ 3.2, respectivamente (p<0.001); La MO de IN, mostró tres líneas de diferenciación mieloide y una linfóide, con células más inmaduras que en IH, el cual mostró una intensa proliferación fibroblástica y macrofágica. En bazo, IN e IH presentaron todas progenies. A t14, la hemopoyesis total (células x 10<sup>6</sup>) en IN vs IH vs C fue de 292.0 $\pm$ 14.5 vs 408.6 $\pm$ 14.3 vs 402.6 $\pm$ 3.2 (p<0.001); En MO de IN e IH se observó predominio de elementos maduros respecto de t7. Los resultados del presente trabajo sugieren que la hipoxia del inóculo trasplantado tuvo un efecto positivo sobre el microambiente hemopoyético medular a expensas de una intensa proliferación fibroblástica y macrofágica, soporte de las células stem y progenitoras, lo que resultó en un posterior aumento de la eficiencia de anidación con mayor repoblación celular.

#### 465. (139) EFECTO IN VITRO DE PROANTOCIANIDINA EXTRAIDA DE LIGARIA CUNEIFOLIA (PLC) SOBRE LA FORMA Y RESISTENCIA OSMÓTICA ERITROCITARIA EN RATAS ALIMENTADAS CON DIETAS NORMO E HIPERLIPÉMICAS.

Crosetti D.<sup>1</sup>; Dominighini A.<sup>2</sup>; González J.<sup>3</sup>; Urli L.<sup>4</sup>; Ronco

M.<sup>5</sup>; Monti J.<sup>6</sup>; Wagner M.<sup>7</sup>; Carnovale C.<sup>8</sup>; Luquita A.<sup>9</sup>  
*Cátedra de Biofísica de la Facultad de Ciencias Médicas Instituto de Fisiología Experimental IFISE<sup>1 2 3 4</sup>; Cát. Fisiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR; CONICET<sup>5 6 8</sup>; Farmacobotánica- Farmacia y Bioquímica-UBA<sup>7</sup>; Cátedra de Biofísica, Fac. Ciencias Médicas-CIURN-UNR<sup>9</sup>*  
 crosettidiego@hotmail.com

La infusión de *Ligaria cuneifolia* (Lc) se utiliza en medicina popular para fluidificar la sangre. Proantocianidina (PLc) es una fracción de Lc. Previamente demostramos que al incubar hemáticas con fracción metanólica de Lc, produce un aumento de fragilidad osmótica y de formas estomatocíticas. **Objetivo:** Analizar el efecto directo de la fracción enriquecida en PLc sobre la forma y la resistencia osmótica eritrocitaria en ratas alimentadas con dietas normo e hiperlipémicas. **Métodos:** Ratas Wistar macho endocriadas (n=32), de 70 días de edad, se separaron en grupos alimentados con: 1-dieta estándar normolipémica (D<sub>E</sub>); 2- "dieta estándar" adicionada con colesterol (97% de pureza) 8g/kg de dieta y aceite de maíz 28% (peso/peso), hiperlipémica (D<sub>H</sub>). El día 28, se anestesiaron, se obtuvo sangre por punción cardíaca y se fraccionó en: Control (C) y Tratadas (T), a ésta última se le adicionó 3 mg/ml de PLc. Sangre de ratas D<sub>E</sub> y D<sub>H</sub>, C y T, se incubaron 30 min a 37°C. Forma eritrocitaria (distinción de formas por microscopía y cálculo del Índice Morfológico (IM) y fragilidad osmótica (FO): incubándose 30 min a 25 °C, en soluciones de NaCl (entre 0 y 290 mOsm/kg). Se dosó fotocolorimétricamente % de hemólisis y se calculó: X<sub>50</sub> ([NaCl] que produce 50% de hemólisis); b (homogeneidad de la población). Resultados: (media ± ES) IM: C<sub>DE</sub>: -0,49± 0,04; T<sub>DE</sub>: -0,89± 0,08\*; C<sub>DH</sub>: -2,59± 0,21\*\*; T<sub>DH</sub>: -2,44± 0,26 (ns vs. C<sub>DH</sub>). X<sub>50</sub>: C<sub>DE</sub>: 0,45± 0,01; T<sub>DE</sub>: 0,58± 0,03\*\*; C<sub>DH</sub>: 0,49± 0,01\*; T<sub>DH</sub>: 0,51± 0,01 (ns vs. C<sub>DH</sub>); b: C<sub>DE</sub>: 11,88± 0,26; T<sub>DE</sub>: 9,69 ± 0,45\*; C<sub>DH</sub>: 10,09 ± 0,45\*; T<sub>DH</sub>: 9,01 ± 0,43 (ns vs. C<sub>DH</sub>). (\*p<0,05 vs. C<sub>DE</sub>) (\*\*p<0,001 vs. C<sub>DE</sub>) **Conclusión:** La D<sub>H</sub> conduce a aumento de FO y a un cambio de forma de discocito a estomatocito comparada con la D<sub>E</sub>. Se evidencia un importante efecto del incremento de los lípidos en sangre sobre la curvatura y la forma eritrocitaria. El tratamiento con PLc aumentó FO y produjo cambio de forma de discocito a estomatocito únicamente en ratas D<sub>E</sub>.

#### 466. (296) ACCIÓN DE LA QUERCETINA SOBRE LAS ALTERACIONES REOLÓGICAS PRODUCIDAS POR EL ARSÉNICO (ASV) EN EL GLÓBULO ROJO HUMANO. (1ª PARTE)

Bollini A.<sup>1</sup>; Hernández G.<sup>2</sup>; Rasia M.<sup>3</sup>; Mengarelli G.<sup>4</sup>; Casco C.<sup>5</sup>; Ruiz M.<sup>6</sup>; Visconti M.<sup>7</sup>; Huarte M.<sup>8</sup>; Phiel L.<sup>9</sup>; Rubin De Celis E.<sup>10</sup>; Bazzoni G.<sup>11</sup>  
*Cátedra de Física Biológica. Fac. Cs. Médicas. UNR<sup>1 2 3 4 5</sup> 6 7 11; Cátedra de Física. Fac. de Bioquímica. UBA<sup>8 9 10</sup>*  
 anbollini@yahoo.com

Anteriormente demostramos que el arsénico (As<sup>v</sup>) altera las propiedades reológicas del glóbulo rojo (GR) por efecto oxidativo, deteriorando el comportamiento fluido de la sangre. Se ha observado que la quercetina (Qc), un flavonoide antioxidante, permite mantener el entorno del GR reducido. Hipótesis: la presencia de QC previene el efecto tóxico del As<sup>v</sup> respecto a la forma celular (FC) del GR, su fragilidad osmótica (FO) y su capacidad agregante (AE). Grs lavados, se resuspendieron e incubaron de la siguiente manera: I. en solución salina bufferada (PBS, pH:7,4, 10') (control); II. en solución Qc (3 microM) 10' (Qc); III. en solución Qc 3 microM,10'; y posteriormente en solución de As<sup>v</sup> (Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O;0,32 microM) 30' (Qc-As<sup>v</sup>); IV. en solución de As<sup>v</sup> 30' (As<sup>v</sup>). Se determinó: -FC por microscopía, informándose un índice morfológico (IM); - AE por transmisión de luz, estimándose: T (tamaño de los agregados) y V (velocidad de agregación); - FO: por fotometría a 540nm, informándose: X50 (concentración de NaCl para el 50% de hemólisis). Análisis estadístico: se especifica en cada estudio. Se presenta la media ± SEM, considerándose significativo p< 0,05.

	control	Qc	Qc-As <sup>v</sup>	As <sup>v</sup>
IM: Anova	0.74±0.29 (n:16) <sup>a,c</sup>	1.00±0.32 (n:16) <sup>a,c</sup>	1.33±0.28 (n:16) <sup>a,c</sup>	-1.49±0.11 (n:20) <sup>c</sup>
AE: Anova T	1.8913±0.003 (n:89) <sup>a</sup>	1.8677±0.005 (n:31) <sup>a,c</sup>	1.8748±0.004 (n:40) <sup>a,c</sup>	1.9040±0.003 (n:55) <sup>c</sup>
AE: Anova V	1.2517±0.04 (n:81) <sup>a,c</sup>	1.1997±0.09 (n:31) <sup>a,c</sup>	1.3188±0.05 (n:43) <sup>a,c</sup>	1.6398±0.06 (n:55) <sup>c</sup>
FO: U-Mann-Whitney	74.96±2.05 (n:8) <sup>a,b</sup>	73.51±2.13 (n:8) <sup>a</sup>	76.01±3.11 (n:8) <sup>a,c</sup>	82.17±1.38 (n:11) <sup>b,c</sup>

a:ns; b:p<0.005; c:p<0.05

El análisis de los resultados indica que, la incubación previa con Qc provoca que los GRs expuestos al As<sup>v</sup> presenten un comportamiento, en las variables estudiadas, que no difiere del control. Esto indicaría que la acción antioxidante del flavonoide, combinada con su habilidad para quelar metales y su incorporación a distintos niveles de la bicapa lipídica evita el daño celular producido por el As<sup>v</sup>.

#### 467. (488) MODULACIÓN DEL ARNM DEL FACTOR VON WILLEBRAND (VWF) EN TEJIDO PULMONAR POR ESTIMULACIÓN CON ESTRADIOL Y AGONISTAS DE RECEPTORES ESTROGÉNICOS. TRATAMIENTO LARGO EN MODELO MURINO BALB/C

Zapata V.<sup>1</sup>; Kempfer A.<sup>2</sup>; Paiva Palomino J.<sup>3</sup>; Powazniak Y.<sup>4</sup>; Lazzari M.<sup>5</sup>; Sánchez Luceros A.<sup>6</sup>  
*Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R Castex<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
 viazad@yahoo.es

**Introducción:** Durante el embarazo normal, hay un aumento progresivo del VWF y una disminución de la actividad de ADAMTS13. Se ha postulado que los estrógenos estarían involucrados en el control del eje VWF/ADAMTS13. En estudios previos hemos observado que el 17 β estradiol (E2) modula el ARNm: VWF en tejido pulmonar murino (BALB/c). **Objetivos:** Determinar si E2 ejerce o no la modulación del ARNm:VWF a través de los receptores estrogénicos (ER) α y/o β. **Métodos:** Drogas (vía oral): E2; agonista de ERα: propyl-pyrazole-triol (PPT); agonista del ERβ: diarylpropio-nitrile (DPN); y antagonista ERα methyl-piperidino-pyrazole (MPP). **Tratamientos:** en periodos largos (72 h.) en modelo in vivo de ratones Balb/c (n=5). 1- E2 75 µg; 2- E2 150 µg; 3- PPT 125 µg; 4- DPN 125 µg; 5- MPP 100 µg; 6- E<sub>2</sub> 75 µg + MPP 100 µg; 7- PPT 125 µg + MPP 100 µg; 8- Controles: vehículo. Cumplido los tratamientos, se extrajo plasma y tejido pulmonar, se determinó el VWF:Ag (U/dL, ELISA), y ARNm:VWF por real time PCR (Cuantificación relativa, incremento del ARNm:VWF respecto a β-actina). **Resultados:** VWF: Ag: no hubo diferencias entre los grupos (media 96 ± 7,1). ARNm:VWF en pulmón: 1- 3.8; 2- 1.0; 3- 3.9; 4- 1.0; 5- 1.8; 6- 1.6; 7- 2.5; 8- 1.0. (1 vs. 8 P= 0.001; 3 vs. 8 P= 0.01; 2, 4, 6, 7 vs. vehículo p= ns). **Discusión:** PPT indujo respuesta transcripcional del VWF similar al E2 75µg. A dosis de E2 150 µg/d no se observó modulación, posiblemente por saturación del sistema. El DPN no mostró tener actividad transcripcional sobre VWF, el MPP actuó como inductor débil. El MPP actuaría como una droga del grupo SERMs, modulando levemente la expresión del VWF en tejido pulmonar murino, no ejerciendo una actividad antagonista pura. **Conclusión:** Los resultados indican que la modulación del ARNm:VWF ocurriría a través de los ERα.

#### 468. (503) HEMORRAGIA MAYOR RELACIONADA A CIRUGÍAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND TIPO 2<sup>a</sup>

Woods A.<sup>1</sup>; Meschengieser S.<sup>2</sup>; Sanchez-luceros A.<sup>3</sup>; Blanco A.<sup>4</sup>; Kempfer A.<sup>5</sup>; Lazzari M.<sup>6</sup>  
*Departamento de Hemostasia y Trombosis, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
 aiwoods@hematologia.anm.edu.ar



La enfermedad de von Willebrand (VWD) tipo 2 tiene sangrado, a menudo, severo. Hay pocos reportes de hemorragias mayores (HM) en cirugías (cx). Objetivo: Hallar marcadores predictivos clínicos o de laboratorio de HM en cx en pacientes (pts) con VWD tipo 2 A previo al diagnóstico. Se analizaron 206 pts. Se calculó el bleeding score (BS) y el número de sitios de sangrado. Criterios del tipo 2A: VWF:RCo<50U/dl; VWF:RCo/VWF:Ag<0.6; ausencia de multímeros de alto e intermedio PM. Se reclutaron 51 pts, con 76 cx; que se agruparon: Grupo A: 23 pts sin HM, Cx= 29; 11 mayores, 9 menores, 6 adenoamigdalectomías y 3 cesáreas. Mujeres=65.2%. Edad=25 años (7-68). Historia familiar de sangrado (HFS)=63.2%. Grupo sang O=80%. BS: % mujeres ≥5=33.3%; % hombres ≥3=37.5%; ≥3 sitios de sangrado=mujeres=60%; hombres=25%. FVIII=60.2 U/dl; VWF:Ag=81.3U/dl; VWF:RCo=21.3U/dl; VWF:RCo/VWF:Ag=0.26. Pts con TS largo=71.4%; H post exodoncia=62.5%; epistaxis=60.8%; menorragia=71.4%; H post parto=28.5%; hematomas=43.4%. Grupo B: 28 pts con HM, Cx=47; 13 mayores, 12 menores, 10 adenoamigdalectomías y 12 cesáreas. M: 67.8%. Edad=31 años (7-72). HFS=84.2%. Grupo sang O=70%; BS=% mujeres ≥5: 36.8%; % hombres ≥3=70%; ≥3 sitios de sangrado: M: 50%; H: 60%. FVIII=55.5U/dl; VWF:Ag=76.9U/dl; VWF:RCo=22.9U/dl; VWF:RCo/VWF:Ag=0.29. Pts con TS largo=70.3%; H post exodoncia=70.5%; epistaxis=53.5%; menorragia=64.7%; H post parto=61.5%; hematomas=53.5%. Pts con HM= 54.9%. No hubo diferencias en % de mujeres, grupo sang O, edad, HFS, BS, número de sitios de sangrado, FVIII, VWF y % de pts con TS largo, entre pts con y sin HM. La H postparto fue más frecuente en pts con HM, aunque sin diferencia significativa [p=ns. RR=1.6 (0.8-3.2)]. Frecuencia de HM en cx: cesáreas=66.6%; denoamigdalectomías=62.5%; cx mayores=41.6%; cx menores=38%; total de cx=50%. El laboratorio fue ineficaz en predecir HM. Las cesáreas y adenoamigdalectomías tuvieron mayor incidencia de HM. La historia de H postparto podría predecir HM en cirugías.

#### 469. (603) ESTUDIO DE RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS DE LA ERITROPOYETINA Y SU DERIVADO MODIFICADO POR CARBAMILACIÓN

Chamorro M.<sup>1</sup>; Wenker S.<sup>2</sup>; Vittori D.<sup>3</sup>; Nesse A.<sup>4</sup>

Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.<sup>1 2 3 4</sup>  
mechamorro@qb.fcen.uba.ar

Además del efecto eritropoyético, la eritropoyetina (Epo) es reconocida por su acción antiapoptótica en tejidos no hematopoyéticos pero para este uso terapéutico debe evitarse el aumento de la masa eritroide. La Epo carbamylada (cEpo) parece cumplir este requisito. En trabajos nuestros y de otros autores se demostró la actividad neuroprotectora no-eritropoyética de cEpo. En este trabajo comparamos mecanismos de acción entre Epo y cEpo. En ensayos con inhibidores observamos que el efecto neuroprotector de Epo o cEpo en células SH-SY5Y inducidas a apoptosis es mediado por activación de PI3K y Jak2 (MTT, Hoechst). Se ha postulado la acción de Epo y cEpo a través de distintos receptores, aunque existe controversia. Por ello estudiamos la modulación de la expresión (*Western blotting*) del REpo clásico y del heteroreceptor REpo- $\alpha$  common (subunidad del receptor de IL-3), en las líneas UT-7 (Epo-dependiente) y SH-SY5Y. La expresión del REpo aumentó en células UT-7 al ser privadas de Epo o en presencia de cEpo (diferencia con Epo), mientras que en las SH-SY5Y no se observaron diferencias entre Epo y cEpo. La expresión del receptor  $\alpha$  aumentó por acción de cEpo en ambas líneas celulares. Investigamos posibles efectos competitivos entre Epo y cEpo sobre el desarrollo de unidades formadoras de colonias eritroides (CFU-E) de ratón. La adición simultánea de una elevada concentración de cEpo (200 ng/ml) inhibió la acción de Epo (20 ng/ml), efecto no observado en cultivos estimulados con Epo 1 h antes de la adición de cEpo (CFU-E/10<sup>4</sup> S/Epo 197±10; Epo 460±9; cEpo 194±11\*; Epo-cEpo10x 206±15\*; Epo<sub>in</sub>-cEpo10x 437±10\*\*; \*P<0,001 vs. Epo; \*\*NS vs. Epo, n=6). Los resultados muestran similitud de mecanismos de acción de Epo y cEpo sobre células neuronales. El aumento de la expresión del receptor  $\alpha$  en ambos tipos celulares no asegura su participación en la acción diferencial de cEpo. Los ensayos de competencia abren un nuevo interrogante en las vías de activación por Epo.

#### 470. (661) REGULACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES EN UN MODELO DE SOBRECARGA DE HIERRO Y ANEMIA AGUDA.

Giorgi G.<sup>1</sup>; Veuthey T.<sup>2</sup>; García B.<sup>3</sup>; Roque M.<sup>4</sup>

Fisiología Humana - Universidad Nacional Del Sur<sup>1 2 3 4</sup>  
giorgi\_gisela@hotmail.com

El transportador de metales divalentes (DMT1) regula eficientemente la captación de Fe en distintos estados de demanda. Se propuso estudiar la regulación de DMT1 cuando coexisten en un modelo animal dos estados del Fe: sobrecarga (demanda reducida) seguido de anemia (demanda aumentada). Se desarrolló un Modelo Acoplado de Sobrecarga de Fe seguido de Anemia Aguda. Ratones 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). Inmunoquímica: anti-DMT1 y EnVision+System-HRP. El Fe tisular se valoró por Perls. En sobrecarga de Fe, con y sin anemia, se vio expresión intracelular de DMT1 en enterocitos. En anemia sin exceso de Fe, DMT1 se localizó en membrana apical de enterocitos. En sobrecarga de Fe, con/sin anemia, en hepatocitos se identificó marcada expresión intracelular de DMT1, asociada principalmente a grandes vasos. El hígado mostró pigmentos de Fe principalmente en células de Kupffer. En bazo se observó leve expresión de DMT1 en las condiciones experimentales estudiadas. En túbulo proximal renal se vio marcada expresión intracelular y apical de DMT1, en anemia con y sin sobrecarga de Fe. En tejido conectivo renal y duodenal se identificó hemosiderina en exceso de Fe. La presencia de DMT1 intracelular en enterocitos del Modelo Acoplado reflejaría la limitada absorción duodenal en exceso del nutriente. La expresión hepática de DMT1 indica el almacenamiento del Fe en exceso. La localización intracelular y apical de DMT1 renal sugiere la captación de Fe desde el ultrafiltrado glomerular, en sobrecarga seguida de anemia. Concluimos que la regulación de la expresión de DMT1 sería tejido-específica: el riñón respondería a la señal "anemia", mientras que el hígado y duodeno responderían a la señal "exceso de Fe".

#### 471. (672) EXPORTACIÓN DE HIERRO EN AUSENCIA DE HEPICIDINA

Danna M.<sup>1</sup>; Nemeth E.<sup>2</sup>; Ganz T.<sup>3</sup>; Roque M.<sup>4</sup>

Fisiología Humana - Universidad Nacional Del Sur<sup>1 4</sup>; David Geffen School of Medicine - University of California<sup>2 3</sup>  
cdanna@uns.edu.ar

Se conoce que la interacción regulatoria entre hepcidina y su receptor específico, el exportador Ferroportina (FPN), determina la disponibilidad de Fe sistémico. Sin embargo, no se ha estudiado aún la acción de FPN en ausencia de hepcidina, su regulador negativo. Nuestro objetivo fue estudiar la expresión y distribución celular de FPN en presencia y ausencia de hepcidina en ratones C57BL/6 wild type (WT) y knock-out para hepcidina (KO). El ARN se extrajo y procesó para RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando primers específicos para FPN A y para FPN B. La expresión de FPN se analizó por técnicas de western blot e inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo monoclonal específico anti-FPN de ratón. En enterocitos de ratones WT, se detectó expresión de FPN intracelular y en membrana basolateral, mientras que en ratones KO se identificó intensa expresión de FPN sólo en membrana basolateral. En bazo de ratones KO se observó que la expresión de FPN fue más intensa en macrófagos de la pulpa roja, respecto a ratones WT. En hígado de ratones WT, se identificó menor expresión de FPN en células de Kupffer, respecto a la intensa expresión observada en ratones KO. En macrófagos del epitelio bronquial de ratones KO se identificó mayor expresión de FPN, respecto a ratones WT. Se observó menor expresión del ARNm de FPNA, transcripto regulado por Fe, en ratones KO respecto a WT en los tejidos estudiados, con excepción del epitelio pulmonar. La expresión del transcripto no regulado por Fe (FPNB) fue mayor en duodeno sólo en ratones WT. El principal hallazgo fue la elevada expresión de FPN en ausencia de hepcidina en tejidos involucrados con la absorción, reciclaje y detoxificación de

Fe. La intensa expresión de FPN en ratones KO se debe a la falta de inhibición de hepcidina, mostrando que el control de la exportación de Fe es altamente dependiente de hepcidina. Nuestros resultados indican el rol incuestionable de hepcidina sobre FPN y su función como regulador central del Fe.

**472. (117) ESTUDIO DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y SU CORRELACIÓN CON PROPIEDADES DE LA MEMBRANA ERITROCITARIA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO**

Spengler M.<sup>1</sup>; Svetaz M.<sup>2</sup>; Leroux B.<sup>3</sup>; Bertoluzzo S.<sup>4</sup>; Carrara P.<sup>5</sup>; Van Isseldyk F.<sup>6</sup>; Petrelli D.<sup>7</sup>; Torrente J.<sup>8</sup>; Zilli M.<sup>9</sup>; Bosch P.<sup>10</sup>

Facultad Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario<sup>1</sup>; Sección Inmunidad Celular, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>2</sup>; Médica Dermatóloga<sup>3</sup>; Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>4</sup>  
5 6 7 8 9 10

isabelspengler@hotmail.com

En los enfermos con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es común la enfermedad cardiovascular con prematura aterosclerosis. El objetivo del presente trabajo fue investigar si en el LES tiene lugar la injuria oxidativa y si esto afecta propiedades de la membrana eritrocitaria tales como la deformabilidad (DE) y su fluidez lipídica (FL). Se estudiaron 39 pacientes mujeres con LES y 50 mujeres controles sanas de similar edad. Se midió el grado de peroxidación lipídica (PL) determinando las concentraciones de malonildialdehído (nM de MDA/ml de concentrado globular) por TBARS, la DE a través de filtración de los glóbulos rojos con membranas de policarbonato con poros de 5mm de diámetro (e informada por su inversa el índice de rigidez (IR)) y FL por polarización por fluorescencia utilizando TMA-DPH (Trimethylammonium-Diphenylhexatriene) como marcador. La FL se informó como anisotropía (A) que está relacionada inversamente con dicho parámetro. Para el análisis estadístico se utilizó la t de Student y el coeficiente de correlación de Pearson. Los resultados mostraron que las mujeres con LES presentaban valores significativamente mayores con respecto a las mujeres controles de: MDA (3,64±0,71 vs 2,95±0,61, p<0,005), IR(10,03±3,89 vs 7,11±1,26, p<0,01) y de A (0,18±0,02 vs 0,14±0,01, p<0,005). Además se encontró correlación estadísticamente significativa entre MDA y A (r =0,45; p<0,05) y entre MDA e IR (r =0,57; p<0,01). Estos resultados soportan la idea que la injuria oxidativa tiene lugar en el LES y que, a través de la peroxidación lipídica afecta propiedades de la membrana como la DE y FL. Dichos cambios podrían contribuir a alteraciones intravasculares observados en el LES.

**473. (205) REGULACIÓN DEL INTERCAMBIO CL-/HCO3- POR fMLP EN NEUTRÓFILOS HUMANOS**

Giambelluca M.<sup>1</sup>; Vargas L.<sup>2</sup>; Gende O.<sup>3</sup>; Alvarez B.<sup>4</sup>  
Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1 2 3 4</sup>  
ogende2@yahoo.com.ar

Si bien la respuesta de los neutrófilos a diversos agentes quimiotácticos ha sido inequívocamente ligada a alcalinización citoplasmática, aun no se ha establecido la participación de los transportadores de bicarbonato. Con el objeto de estudiar el efecto del tripéptido bacteriano fMLP sobre la actividad del intercambiador aniónico Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, se determinó la velocidad de recuperación del pH intracelular (pH<sub>i</sub>) en neutrófilos cargados con el indicador fluorescente BCECF sometidos a una sobrecarga alcalina por lavado de CO<sub>2</sub> en un medio libre de cloruro. En una solución salina pobre en bicarbonato (0.62 mM) la velocidad de recuperación del pH<sub>i</sub> después de incorporar NaCl 50 mM fue 12.3 ± 0.7 UR (UR=pH<sub>i</sub>/seg.10<sup>-4</sup>), se redujo con el inhibidor de anhidrasa carbónica metazolamida 100 microM a 3.1 ± 3 UR y con un bloqueante de transportadores aniónicos, SITS 100 microM a 5.9 ± 1.2 UR. La recuperación con LiCl fue similar a la observada con NaCl pero no se produjo (0.2 ± 0.5 UR) con gluconato de sodio. Cuando se estimuló con fMLP 5 minutos antes del agregado de cloruro la recuperación del pH<sub>i</sub> fue más lenta :8.6 ± 1.0 UR vs. 11,2 ±

1.7 UR en sus controles apareados (ctrl). El estímulo con fMLP simultáneo al agregado de NaCl también produjo una reducción de la recuperación. El efecto inhibitorio sobre la recuperación del pH<sub>i</sub> no se vió afectado por el bloqueo del intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>. El efecto depresor del fMLP también se produjo cuando se estudió la recuperación de una carga alcalina con TMA (6.6 ± 0.3 UR vs 7.8 ± 0.6 UR ctrl) o NaCO<sub>3</sub>H (16 ± 3 UR vs 22±3 ctrl). Como conclusión, el aumento del pH<sub>i</sub> producido por fMLP se ve facilitado por dos procesos simultáneos: la activación del intercambiador alcalinizante Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y la inhibición del intercambiador acidificante Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

**474. (317) ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE Y MECANISMO DE ACCIÓN DE UN POLISACÁRIDO SULFATADO EXTRAÍDO DE ALGAS DE LA COSTA ARGENTINA.**

Fernández P.<sup>1</sup>; Ciancia M.<sup>2</sup>; Quintana I.<sup>3</sup>  
Facultad de Agronomía Universidad De Buenos Aires; CIHIDECAR, CONICET<sup>1 2</sup>; Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Dpto Química Biológica, FCEyN, UBA<sup>3</sup>  
vfernand@agro.uba.ar

Las algas marinas sintetizan polisacáridos sulfatados con gran variedad de estructuras y actividad biológica. Dada la alta incidencia de trombosis en la población mundial y la necesidad de agentes antitrombóticos alternativos a la heparina, dichos polisacáridos resultan de interés por su potencial efecto anticoagulante. En nuestro laboratorio se ha caracterizado un arabinano (Ar) proveniente del alga verde *Codium vermilara*, formado por unidades (1'→3)-β-L-Arap con una relación molar sulfato/arabinano de 1,81/1. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad anticoagulante de Ar y su mecanismo de acción. Se realizaron pruebas globales de coagulación (TP: Tiempo de Protrombina; TT: Tiempo de Trombina; APTT: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada) en plasma humano citratado incubado con concentraciones crecientes de Ar y de heparina (1-100µg/ml); como control se utilizó solución fisiológica. Los valores expresan la media ± En PT no se observaron cambios con ninguno de los compuestos.

	Concentración(ug/ml)	TT (s)	APTT (s)
Control	0	22,2 ± 0,3	39,6 ± 0,1
Arabinano	1	27,4 ± 1,5	49,3 ± 4,2
	10	164 ± 18	176 ± 9
	25	>230	>400
Heparina	1	>230	142 ± 19
	10	>230	>400

El mecanismo de acción anticoagulante de Ar fue evaluado mediante ensayos amidolíticos en presencia y ausencia de antitrombina (AT) purificada (n=4). En las condiciones de ensayo utilizadas, se observaron diferencias significativas (p<0,05) respecto del control: la inhibición máxima observada con Ar fue de 63 % ± 5 (ensayo en ausencia de AT) y 78% ± 2 (en presencia de AT). En ambos casos, el efecto fue dependiente de la concentración. La heparina no mostró inhibición directa de trombina, y en presencia de AT se alcanzó un máximo de inhibición de 67% ± 8. Conclusión: Ar mostró importante efecto anticoagulante a través de, al menos, dos mecanismos de acción: inhibición directa de trombina y potenciación de antitrombina.

**475. (339) EFECTOS CITOTÓXICOS DEL ARSENITO DE SODIO, MG-132, ÁCIDO CAFEINIL-ETIL-ÉSTER (CAPE) Y SUS COMBINACIONES SOBRE LÍNEAS CELULARES LEUCÉMICAS MIELOIDES Y LINFÓIDES**

Lombardo T.<sup>1</sup>; Cavaliere V.<sup>2</sup>; Papademetrio D.<sup>3</sup>; Simunovich T.<sup>4</sup>; Costantino S.<sup>5</sup>; Blanco G.<sup>6</sup>; Alvarez E.<sup>7</sup>  
Cátedra de Inmunología, IDEHU-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
tlombardo@ffy.uba.ar

El Arsénico en su forma 3+ es usado en el tratamiento de leucemia promielocítica con buenos resultados. Sin embargo su uso en otras neoplasias hematológicas está limitado por sus efectos

tóxicos, dada la necesidad de utilizar dosis elevadas. Una forma de disminuir esta dosis es el tratamiento combinado con drogas que actúen de manera sinérgica. Por esto, nuestro objetivo fue evaluar el tipo de interacción farmacológica existente entre las combinaciones de arsenito de sodio (AsNa) con el inhibidor de proteasoma MG-132 y el inhibidor de NF- $\kappa$ B, CAPE en cuanto a la inducción de muerte en las líneas leucémicas: Raji (linfoide) y U937 (promonocítica). Para ello las células se expusieron a AsNa, MG132 y CAPE por separado y luego en combinaciones, determinándose el porcentaje de células vivas y muertas por el método de FDA-PI mediante citometría de flujo. Se calculó la Dosis Letal 50 (DL50) y se determinó el coeficiente de interacción (CI) para las combinaciones AsNa-MG132 y AsNa-CAPE. Además se evaluó el efecto de las drogas sobre la proliferación celular por el método de Timidina Triaída y se calculó la Dosis Inhibitoria 50 (DI50). Resultados:

	Línea		DL50 (uM)		DI50(uM)	
	AsNa	MG-132	CAPE	AsNa	MG-132	CAPE
Raji	10,0±0,4	0,61±0,05	196±12	1,3±0,2	0,12±0,02	42±5
U937	7,4±0,3	2,10±0,08	253±18	3,7±0,3	0,40±0,05	80±3
	U937		Raji			
	AsNa-MG		AsNa-CAPE		AsNa-CAPE	
Relación	1:4		60:1		1:12	
CI <sub>DL50</sub>	0,61±0,08		1,39±0,18		1,56±0,23	
					1,12±0,10	

La combinación AsNa-MG-132 mostró sinergismo en la línea U937, permitiendo reducir la dosis de As, por el contrario, esta combinatoria resultó en antagonismo para la línea Raji sugiriendo un mecanismo citotóxico selectivo según el fenotipo leucémico. La interacción AsNa-CAPE fue antagónica en todos los casos. Todas las drogas inhibieron la proliferación celular a bajas dosis. En la línea Raji pero no en U937 el AsNa mostró gran diferencia entre la DL50 y la DI50 lo que indicaría un mecanismo de acción diferente de esta droga sobre ambos tipos celulares.

#### 476. (514) ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS GENES HOXA9 Y JUNB EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

Bucci P.<sup>1</sup>; Tedeschi F.<sup>2</sup>; Cardozo M.<sup>3</sup>; Zalazar F.<sup>4</sup>  
Laboratorio de Práctica Profesional. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad Nacional Del Litoral<sup>1 2 3 4</sup>  
pamelabucci@hotmail.com

**Objetivo:** Evaluar los niveles de los transcritos *hoxa9* y *junB* en pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica (LMC) de pobre pronóstico. **Metodología.** Se purificó ARN de leucocitos de sangre periférica de pacientes con LMC (n=13). Para establecer su pronóstico, a todos los pacientes se les calculó el índice de Sokal al momento del diagnóstico. Los transcritos *hoxa9* y *junB* (así como *bcr-abl* y *abl*) fueron amplificados *in vitro* por RT-PCR. El transcripto *abl* sirvió como normalizador en cada muestra. El análisis del rearrreglo *bcr-abl* fue utilizado para el diagnóstico molecular. En la reacción de Transcripción Reversa se utilizaron la enzima M-MLV y *random primers*. La amplificación de segmentos correspondientes a los genes *hoxa9*, *junB*, *bcr-abl* y *abl* se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de secuencia. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis, en geles de agarosa teñidos con Bromuro de Etidio. La intensidad de las bandas fue evaluada por densitometría utilizando el programa Scion Image (Scion Corp.). Los niveles de expresión de los genes *hoxa9* y *junB* fueron graficados como expresión relativa a la del gen constitutivo *abl*. El test de Wilcoxon fue utilizado para evaluar las diferencias en la expresión relativa de cada gen, en las muestras de cada paciente. **Resultados.** En 2 muestras consecutivas, todos los pacientes mostraron cambios en los niveles de expresión relativa de ambos genes, que fueron estadísticamente significativos (p<0.05) en fases avanzadas de la enfermedad. Además, estos cambios estuvieron inversamente relacionados: se observaron incrementos en los niveles de *hoxa9*

que fueron acompañados por una marcada disminución en la expresión de *junB*. No hubo relación entre los cambios observados y el rearrreglo molecular *bcr-abl* presente. **Conclusiones.** Estos resultados aportarían datos para evaluar el impacto de la sobreexpresión o infraexpresión simultánea de genes de interés en la evolución de la LMC.

#### 477. (528) REGULACIÓN INTRACELULAR DEL FACTOR VON WILLEBRAND (VWF) POR ADAMTS13 EN HUVEC TRATADAS CON ESTRADIOL (E2).

Powazniak Y.<sup>1</sup>; Kempfer A.<sup>2</sup>; Paiva Palomino J.<sup>3</sup>; Calderazzo Pereyra J.<sup>4</sup>; Hernandez Lois G.<sup>5</sup>; Zapata V.<sup>6</sup>; Lazzari M.<sup>7</sup>

Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R Castex. Academia Nacional de Medicina, FONCYT, CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

yaninapowazniak@gmail.com

VWF y ADAMTS13 son sintetizados y almacenados en las HUVEC. Previamente, reportamos que E2 produce un aumento de mRNA de VWF y ADAMTS13 en HUVEC, sin embargo sólo observamos un aumento en los niveles de proteína de ADAMTS13. Ha sido reportado que, en células HeLa que coexpresan VWF y ADAMTS13, la pro-ADAMTS13 cliva al pro-VWF intracelularmente. El objetivo de este estudio fue demostrar que ADAMTS13 es capaz de clivar al VWF intracelularmente en HUVEC, y por lo tanto los niveles de proteína de VWF no aumentan en los tratamientos con E2. **Materiales y Métodos** Para la transfección de las HUVEC se utilizó lipofectamina. Las HUVEC (3x10<sup>5</sup> células/ml) fueron transfectadas con HuSH 29-mer non-effective (scrambled) pRS vector (1µg/well), y con short hairpin RNA (shRNA, 30 µM) para ADAMTS13 por 18 h. **Tratamientos:** 1nM E2 o vehículo. El método de Real Time PCR se utilizó para la cuantificación relativa de los mRNAs. El sobrenadante de los cultivos y los lisados celulares fueron cuantificados por ELISA para VWF y semicuantificados por SDS-PAGE y transferencia a nitrocelulosa e inmunodetección con anticuerpo anti-ADAMTS13. Diferencia significativa cuando P <0.001 (ANOVA). **Resultados** El análisis de caracterización e identificación para ADAMTS13 demostró que la transfección con shRNA de ADAMTS13, pero no la de HuSH pRS, atenuó la expresión de ADAMTS13 en HUVEC sin afectar la expresión de VWF. No se encontraron diferencias significativas en los niveles del mRNA de VWF en HUVEC tratadas con E2 y transfectadas con HuSH pRS o shRNA de ADAMTS13. Se observó un aumento significativo, de 2 y 3 veces, en los niveles de VWF del sobrenadante e intracelular en HUVEC tratadas con E2 y transfectadas con shRNA de ADAMTS13 con respecto a las HUVEC transfectadas con HuSH pRS. **Discusión** ADAMTS13 podría interferir con VWF intracelular, ya que en las condiciones de silenciamiento del gen de ADAMTS13, el estradiol lleva a un aumento significativo de los niveles de proteína de VWF.

#### 478. (680) POLIMORFISMOS (SNP) EN HOMOCIGOSIS. UNICA MODIFICACION GENETICA DE ADAMTS13 EN UNA PURPURA TROMBOCITOPENICA TROMBOTICA CONGENITA

Calderazzo Pereyra J.<sup>1</sup>; Powazniak Y.<sup>2</sup>; Sánchez Luceros A.<sup>3</sup>; Bazack N.<sup>4</sup>; Lazzari M.<sup>5</sup>

Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R Castex; SECyT, CONICET<sup>1 2 3 5</sup>; Hospital de Niños Pedro Elizalde<sup>4</sup>

jccalderazzo@yahoo.com

La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es una enfermedad caracterizada por trombosis microvascular, asociada con la deficiencia de ADAMTS13. Se han identificado más de 70 mutaciones en el gen de ADAMTS13 en PTT heredada. La mayoría de las mutaciones se localizan en el N-terminal de ADAMTS13, lo que indica la importancia de estos dominios sobre el clivaje del factor VWF. Donadelli et al (2006), encontraron varios SNP dentro de exones y en los límites de los intrones en pacientes en los que no identificaron mutaciones. Sugirió que esos SNP influirían en las anomalías funcionales de ADAMTS13. Presentamos un

caso de un niño de 9 meses con anemia hemolítica microangiopática (Hb = 8 g/dl) y trombocitopenia (plaquetas = 31x10<sup>9</sup> /L). Un nuevo episodio de PTT se produjo a los 10 meses. Durante el seguimiento hasta la edad de 10 años, el paciente fue tratado con infusión de plasma. Los métodos utilizados para la evaluación del paciente y su madre fueron: actividad de ADAMTS13 y inhibidor de ADAMTS13 (Technozym ELISA), multímeros de VWF (SDS-electroforesis en gel de agarosa y detección inmunoenzimática) y secuenciación total del gen de ADAMTS13 (29 exones) para la detección de mutaciones o SNP. Los resultados fueron: la actividad de ADAMTS13 = 3 U/dL (rango normal= 40-130 U/dL). Inhibidor de ADAMTS13= 7 U/mL (rango normal <12 U/mL). Multímeros extragrandes del VWF =44% (rango normal <15%). La actividad de ADAMTS13 de la madre del paciente fue 73 U/dL. El paciente es homocigota para los SNP (heterocigota conocidos) G798A y T88C, la madre del paciente es heterocigota para ambos. Conclusión Los SNP (en estado homocigota) posiblemente combinados en el gen parecen ser responsables de la deficiencia de ADAMTS13 y los episodios de PTT del paciente. Los SNP que se identifican en este paciente serían la representación de la diversidad de las anomalías a lo largo del gen de ADAMTS13.

#### 479. (690) C1272F: UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL DOMINIO A1 ASOCIADO A FENOTIPO 2A DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND

Woods A.<sup>1</sup>; Sanchez-luceros A.<sup>2</sup>; Kempfer A.<sup>3</sup>; Powazniak Y.<sup>4</sup>; Calderazzo Pereyra J.<sup>5</sup>; Blanco A.<sup>6</sup>; Meschengieser S.<sup>7</sup>; Lazzari M.<sup>8</sup>

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires.<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
aiwoods@hematologia.anm.edu.ar

El tipo 2A de la enfermedad de von Willebrand (VWD) es la variante cualitativa más frecuente. La mayoría de las mutaciones (56,7%) se localizan en el dominio A2, mientras que 23,9% se localizan en los dominios D' y CK y 19,4% en el dominio A1. Se describe una nueva mutación en el dominio A1, asociada al fenotipo 2A en un paciente y su madre. Paciente (P) con hemorragias mayores (HM) que requirió tratamiento con HemateP, dado que no hubo respuesta con desmopresina. Bleeding score (BS)=10. Madre (M): HM post parto, menorragia y hematomas. BS=8. Padre y hermana: sin síntomas hemorrágicos. El exón 28 del gen del VWF se amplificó por fragmentos y se secuenció. Diseñamos los primers, evitando la amplificación del pseudogen. La enzima de restricción PST1 se usó para digerir el fragmento 1-2. Análisis fenotípico: P: TS>9 min; FVIII:C=30 IU/dl; VWF:Ag=28 IU/dl; VWF:RCo<5 IU/dl; VWF:RCo/VWF:Ag <0,15; VWF:CB=7 IU/dl; VWFpp/VWF:Ag=3,38. M: TS>9 min; FVIII:C=35IU/dl; VWF:Ag=44IU/dl; VWF:RCo<5 IU/dl; VWF:RCo/VWF:Ag <0,10; VWF:CB=17 IU/dl; VWFpp/VWF:Ag=3,1; ambos con ausencia de multímeros de alto e intermedio PM. Análisis genotípico: Digestión con PST1: alelo normal: fragmentos de 22, 125 y 144 pb. Alelo mutado: fragmentos de 22 y 269 pb. P: fragmentos de 22, 125, 144 y 269 pb, como resultado de la sustitución heterocigota. La secuenciación del fragmento 1-2 del P y su M mostraron la sustitución 3815G>T, en el dominio A1, resultando en C1272F, que no se halló en 100 alelos normales. La unión S-S entre C1272 y C1458 es crucial para formar la estructura normal del "loop" en el dominio A1. La sustitución de C1272 por F deja la C1458 libre, generando ruptura de la unión S-S y del "loop", alterando la normal multimerización y función del VWF. El aumento de VWFpp/VWF:Ag se asocia con sobrevida acortada del VWF. Estos hallazgos sugieren que la C1272F, es responsable del fenotipo 2A del paciente y su madre. Sin embargo, estudios de expresión serán necesarios para confirmar este rol.

#### 480. (699) EFECTO DE LIGANDOS DEL RECEPTOR TOLL-LIKE SOBRE FERROPORTINA Y HEPICIDINA EN MACRÓFAGOS MEDULARES

Danna M.<sup>1</sup>; Nemeth E.<sup>2</sup>; Ganz T.<sup>3</sup>; Roque M.<sup>4</sup>  
Fisiología Humana - Universidad Nacional Del Sur<sup>1 4</sup>; David Geffen School of Medicine - University of California<sup>2 3</sup>  
cdanna@uns.edu.ar

Ferroportina (FPN) cumple un rol crítico en la exportación de Fe en macrófagos en la inflamación, utilizando vías de señalización mediadas por el receptor *Toll-like 4* (TLR4). Nuestro objetivo fue estudiar en macrófagos de médula ósea la respuesta a la inflamación, de las isoformas de FPN (A y B) y de su regulador hepcidina, mediada por los subtipos del receptor Toll-like. Macrófagos de médula ósea de ratones C57BL/6 se aislaron y cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina-estreptomina. Las células se trataron con Fe amonio-citrato (FAC-20µM) y con ligandos de TLR específicos para TLR4: LPS; TLR5: flagelina; TLR2: PAM3. El ARN se extrajo con Trizol y se procesó para RT-PCR cuantitativa en tiempo real utilizando primers específicos para: FPNA, FPNB, hepcidina. El aumento de ARNm de FPNA y FPNB se indujo con FAC. En el caso de la isoforma regulada por Fe, FPNA, por tratamiento con los ligandos específicos de TLRs: LPS, flagelina y PAM3, disminuyó el ARNm, siendo más notable en presencia de LPS y PAM3. En el caso del transcripto no regulado por Fe, FPNB, se observó disminución en presencia de flagelina, y aumento en presencia de LPS, sin cambios con PAM3. Cuando se evaluó en macrófagos la respuesta inflamatoria sobre hepcidina inducida por ligandos de TLR, se observó aumento de su expresión, siendo LPS el principal inductor. Nuestros resultados mostraron que la respuesta a la inflamación de FPNA no depende únicamente de la señalización mediada por TLR4, sino que otros subtipos como TLR2 cumplirían un rol importante. Los resultados obtenidos de la isoforma de FPNB, sugieren una modulación diferencial sobre la exportación de Fe, que dependería del tipo de estímulo. Un aporte interesante de nuestro trabajo fue determinar que la producción de hepcidina por macrófagos es altamente dependiente del TLR4 en inflamación. Concluimos que en macrófagos de médula ósea FPN sería regulada negativamente en forma dual, por TLR y por la hepcidina autocrina.

### GENÉTICA 3

#### 481. (320) EXPRESIÓN DE TP73 EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA, SU RELACIÓN CON EL ESTADO DE METILACIÓN DEL GEN

Stanganelli C.<sup>1</sup>; Sanchez ávalos J.<sup>2</sup>; Bezares R.<sup>3</sup>; Slavutsky I.<sup>4</sup>  
Dept de Genética, Academia Nacional de Medicina<sup>1 4</sup>; Servicio de Hematología, Instituto Alexander Fleming<sup>2</sup>; Servicio de Hematología, Hospital Teodoro Álvarez<sup>3</sup>  
cstanganelli@hematologia.anm.edu.ar

La metilación aberrante de las islas CpG ubicadas en los promotores constituye un mecanismo epigenético de inactivación génica. El gen *TP73* (1p36.3) presenta varias isoformas de las cuales *TAp73* tiene actividad supresora de tumor y capacidad para inducir apoptosis y detención del ciclo celular. Nuestro grupo ha demostrado una alta frecuencia de metilación de *TAp73* en pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) (Haematologica 2009; 94 (Suppl 2): 485). El objetivo de este trabajo es determinar el nivel de expresión de *TAp73* en pacientes con el gen metilado (LLC-M) y no metilado (LLC-U). Se evaluaron 21 muestras sangre periférica (SP) de 19 pacientes (11 varones; edad media 63 años, estadio Rai:0:61%, II:31% y IV:8%), empleando como controles células mononucleares (MN) y linfocitos B CD19+ de individuos normales. Se analizó metilación del ADN con técnica de MSP (Methylation-Specific PCR) seguida de secuenciación. Se evaluó expresión mediante PCR en Tiempo Real con técnica de SybrGreen. El 57% de los pacientes mostró metilación de *TAp73*. Se observó aumento de expresión en los pacientes con LLC-U (0,01530; rango: 0,00009-0,05219) respecto de células MN de controles (0,00021; rango: 0,00011-0,00313) (p=0,045) (test Mann-Whitney). No hubo diferencias significativas entre MN y linfocitos B CD19+ (p=0,17). Si bien los pacientes con LLC-M (0,00601; rango: 0,00005-0,17555) presentaron menor expresión que aquellos con LLC-U, la diferencia no alcanzó significación estadística. El análisis de los datos mostró una correlación inversa entre edad y nivel de expresión de *TAp73* (r=-0,507; p=0,027). La menor

expresión detectada en LLC-M sería uno de los mecanismos que contribuiría a la apoptosis deficiente presente en esta patología, favoreciendo la sobrevida de las células leucémicas. Asimismo, estos hallazgos sugerirían la existencia de un nivel crítico de metilación para el silenciamiento transcripcional de *TAp73*.

#### 482. (429) EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN GÉNICA EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE

Stella F.<sup>1</sup>; Fantl D.<sup>2</sup>; Arbelbide J.<sup>3</sup>; Slavutsky I.<sup>4</sup>;  
 Depto. de Genética, Academia Nacional de Medicina<sup>1,4</sup> ;  
 Servicio de Hematología, Hospital Italiano, Buenos Aires,  
 Argentina<sup>2,3</sup>  
 fla\_stella@yahoo.com.ar

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia de células B caracterizada por una infiltración atípica de células plasmáticas en la médula ósea (MO). El curso clínico es variable, no siendo suficientes los factores pronóstico clásicos para predecir la evolución de la patología. Diferentes estudios postulan una probable asociación entre el perfil genético del tumor y el pronóstico de los pacientes. En este trabajo se evaluó la expresión de los genes *MCL1*, *GSTP1* y *DKK1* en células de MO de 32 pacientes con MM (17 varones; edad media: 66 años; rango: 30-86 años; estadios Durie & Salmon: I: 28%, II: 36%, III: 36%; ISS: 1: 10%; 2: 20%, 3: 70%), y en linfocitos de sangre periférica de 7 controles normales. Se efectuó extracción de ARN, síntesis de ADNc por RT-PCR y cuantificación mediante PCR en tiempo real. El 28% de los pacientes mostró sobreexpresión de *MCL1*, el 28,5% de *GSTP1* y el 52% de *DKK1*. El análisis de los niveles de expresión génica mostró una importante heterogeneidad, pudiendo identificarse dos grupos de expresión para cada gen tomando como punto de corte la media de los controles (Tabla 1):

Tabla 1: Perfiles de expresión (X±DS) en pacientes con MM y controles

Grupo	MCL1	GSTP1	DKK1
Control	0,96±0,72	0,05±0,02	1,22E-07±2,57E-07
Alta expresión	2,94±2,78	0,18±0,20	2,03E-04±3,19E-04
Baja expresión	0,22±0,29*#	0,01±0,01*# <sup>1&amp;</sup>	2,34E-09±5,20E-09

Diferencias significativas respecto de controles \*p=0.0001; entre grupos #p=0.001 y <sup>1&</sup>p=0.003

La comparación del total de casos con los parámetros clínicos mostró una correlación positiva entre la expresión de *MCL1* y los niveles de  $\beta$ 2microglobulina (p=0,0001) y el porcentaje de infiltración en MO con los niveles de *DKK1* (p=0,0113). No se observó correlación entre los niveles de expresión de los genes evaluados. Los datos obtenidos muestran la heterogeneidad del MM y reflejan la capacidad de estos genes para separar subgrupos de pacientes, sugiriendo un probable rol de los mismos como factores pronóstico de la enfermedad.

#### 483. (521) ESTUDIO DE LOS MECANISMOS FISIOPATOGÉNICOS ASOCIADOS A LA PATOLOGÍA ÓSEA EN ENFERMEDAD DE GAUCHER

Mucci J.<sup>1</sup>; Suqueli Garcia M.<sup>2</sup>; De Francesco P.<sup>3</sup>; Scian R.<sup>4</sup>;  
 Fossati C.<sup>5</sup>; Delpino M.<sup>6</sup>; Rozenfeld P.<sup>7</sup>  
 Laboratorio de Investigación en el Sistema Inmune Instituto  
 de Estudios de la Inmunidad Humoral <sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>  
 jmucci@biol.unlp.edu.ar

La enfermedad de Gaucher (EG) es una patología genética de almacenamiento lisosomal, causada por la deficiencia de la enzima beta-glucosidasa (GBA). Las manifestaciones óseas incluyen osteopenia y osteonecrosis. En la EG se sabe que la inflamación es un factor clave en la patogénesis y se ha descrito un aumento de marcadores de resorción ósea mediada por osteoclastos tales como Catepsina K y TRAP. El objetivo es investigar si existe inducción de osteoclastogénesis en dos modelos *in vitro* de la EG, uno murino utilizando macrófagos de la línea celular J774 (M) y uno humano mediante empleo de células monoclonales

de sangre periférica de individuos normales (H). Las células M y H se cultivaron en presencia de Condritol  $\beta$ -epóxido (CBE), un inhibidor de la GBA, con el agregado de diferentes concentraciones de LPS y se midió la producción de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. Se observó un aumento de la secreción de citoquinas en los cultivos H que contenían CBE y LPS con respecto a los que se trataron con LPS solo. En cambio, no se detectó diferencias apreciables para los cultivos M. Los sobrenadantes de los cultivos H y M se utilizaron para tratar cultivos de monocitos humanos de la línea THP-1 y cultivos de precursores de médula ósea en presencia de M-CSF, respectivamente. Se midió la inducción de osteoclastogénesis mediante la determinación de TRAP y MMP-9, y la expresión de los genes RANK, CTSK y CCL2 mediante qPCR. Se observó un aumento en la inducción de osteoclastogénesis para las células tratadas con sobrenadantes de células estimuladas con CBE con respecto a los controles y un aumento aun mayor cuando se trataron con aquellos que provenían de células estimuladas con CBE y LPS, en ambos modelos. Como conclusión, ambos modelos *in Vitro* de Enfermedad de Gaucher exhibieron un aumento en la inducción de osteoclastogénesis. El modelo humano, a diferencia del murino, mostró una respuesta inflamatoria más acentuada.

#### 484. (623) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC).

Gonzalez M.<sup>1</sup>; De Brasi C.<sup>2</sup>; Ferri C.<sup>3</sup>; Bengió R.<sup>4</sup>; Bianchini M.<sup>5</sup>; Larripa I.<sup>6</sup>  
 IIHEMA, Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires<sup>1</sup>  
<sup>2,3,4,5,6</sup>  
 marianag6@yahoo.com.ar

La LMC es un desorden mieloproliferativo crónico caracterizado por la presencia del reordenamiento genético *BCR-ABL*. Este gen híbrido activa constitutivamente varios caminos de señalización estimulando la proliferación y supervivencia de progenitores mieloides. En este trabajo se estudió el nivel de expresión de los genes *CaMKII $\delta$* , *Ki67* (involucrados en la proliferación celular) y *BCR-ABL* en diferentes fases de la enfermedad: al diagnóstico, fase crónica en remisión (FCRem), fase crónica en recaída (FCRec) y fases avanzadas. Se estudiaron 60 pacientes y 18 controles (dadores normales). El análisis de la expresión de los genes *CaMKII $\delta$* , *Ki67* y el control endógeno  $\beta$ -2-microglobulina ( $\beta$ 2M), se realizó mediante PCR en tiempo real empleando SyBR Green y oligonucleótidos *primers* diseñados para este estudio. La cuantificación relativa de *BCR-ABL/ABL*, se realizó utilizando el método Taqman. Se observó que el nivel de expresión de *CaMKII $\delta$*  y *Ki67* fue significativamente más alto en los pacientes al diagnóstico (360,4±282; 0,5±0,4), FCRec (53,5±14,4; 0,10±0,08) y fases avanzadas (26,5±6,8; 0,12±0,06) respecto del grupo control (2,22±0,7; 0,002±0,001) p<0,001; p<0,05 respectivamente. Los valores obtenidos en el grupo FCRem (1,55±0,6; 0,0001±0,00003) no presentaron diferencias significativas respecto al grupo control. El estudio de correlación entre los genes de proliferación y los niveles de expresión del transcripto *BCR-ABL* mostraron una correlación positiva con el gen *CaMKII $\delta$*  (Sperman p< 0,0003). Nuestros resultados indican que los genes *CaMKII $\delta$*  y *Ki67* estarían sobreexpresados al diagnóstico, en pacientes resistentes y en fases avanzadas de la LMC, sugiriendo un desbalance con la consecuente estimulación de la proliferación celular. Si bien ambos genes serían marcadores de progresión de esta patología, la correlación encontrada con *BCR-ABL* indicaría que *CaMKII $\delta$*  podría ser útil para predecir respuesta al tratamiento y/o progresión a etapas más avanzadas de la enfermedad.

#### 485. (684) IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL CYP3A5 Y CYP2B6 EN INFECCIÓN POR VIH ASOCIADA A PORFIRIA CUTÁNEA TARDÍA EN LA POBLACIÓN ARGENTINA

Lavandera J.<sup>1</sup>; Martínez M.<sup>2</sup>; Parera V.<sup>3</sup>; Rossetti M.<sup>4</sup>; Batlle A.<sup>5</sup>; Buzaleh A.<sup>6</sup>;  
 Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias  
 (CIPYP), CONICET<sup>1,2,3,4,5,6</sup>  
 chacabuco27@hotmail.com

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT), la más común de las Porfirias, se desencadena debido a distintos factores incluyendo fármacos. En Argentina, la asociación PCT-virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es alta. Las drogas inhibidoras de proteasas y de transcriptasa reversa usadas en la terapia para VIH, difieren en su metabolización debido a polimorfismos del CYP3A5 y CYP2B6 respectivamente. No hay estudios de genotipificación de estas isoformas en Argentina ni en individuos con PCT. El objetivo fue evaluar el rol de polimorfismos del CYP3A5 y CYP2B6 en la asociación PCT-VIH. Se estudió la frecuencia de los alelos CYP3A5\*3, CYP3A5\*6 y CYP2B6\*6 en individuos controles (n=29), PCT (n=29) y PCT-VIH (n=8) por RFLP. El porcentaje de CYP3A5\*3 fue para el grupo control: 17% (5:29) en heterocigosis y 83% (24:29) en homocigosis; en los PCT: 21% (6:29) en heterocigosis y 79% (23:29) en homocigosis; y en los PCT-VIH: 25% (2:8) en heterocigosis y 7,5% (6:8) en homocigosis. La frecuencia alélica del CYP3A5\*3 fue 0,91 (control); 0,89 (PCT) y 0,87 (PCT-VIH), sin diferencias significativas. El alelo CYP3A5\*6 no se halló en ninguno de los grupos. Al evaluar el CYP2B6\*6, se observó un porcentaje del 34% (10:29) en heterocigosis y 3,5% (1:29) en homocigosis en el grupo control. Mientras que en el grupo PCT, 45% (13:29) eran heterocigotas y 10% (3:29) homocigotas. En los PCT-VIH, 50% (4:8) eran heterocigotas y 12,5% (1:8) homocigotas. La frecuencia alélica difirió entre el grupo control (0,21) y los individuos con Porfiria pero fue similar entre PCT infectados (0,31) o no (0,33) con VIH. Los resultados para el grupo control concuerdan con lo descrito en otras poblaciones caucásicas, en particular para el alelo CYP3A5\*3 que existe en una frecuencia muy alta. En la población analizada, aunque pequeña, el polimorfismo genético del CYP3A5 no estaría implicado en el desencadenamiento de la PCT en individuos VIH; aunque habría mayor prevalencia del CYP2B6\*6 en individuos PCT.

- 486. (692) PRIMER CASO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE EN HETEROCIGOSIS COMPUESTA EN ARGENTINA**  
 Piñeiro Pauwels M.<sup>1</sup>; Gerez E.<sup>2</sup>; Batlle A.<sup>3</sup>; Parera V.<sup>4</sup>; Rossetti M.<sup>5</sup>  
*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias*<sup>1 2 3 4</sup>  
*Departamento Química Biológica FCEyN- UBA*  
 belen81\_rosario@hotmail.com

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es un desorden hepático agudo producido por una deficiencia en la Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D) (50%). Se caracteriza por un aumento en la expresión de la primera enzima del camino del hemo, la ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintetasa 1 (ALA-S1) y la consiguiente acumulación de intermediarios tóxicos de esta vía. Es una patología autosómica dominante, sin embargo, existen reportados seis casos de PAI en homocigosis dominante y heterocigosis compuesta en los cuales se observó una prominente manifestación neurológica y retraso psicomotor y en algunos casos eritrodoncia. Estudiamos una paciente con dolor abdominal y ataques neurológicos característicos de pacientes con PAI que también presentaba síntomas cutáneos leves y eritrodoncia. El objetivo de este trabajo fue analizar bioquímica y genéticamente al probando para establecer un diagnóstico diferencial de este caso de Porfiria. Los resultados bioquímicos en orina: ALA: 3,4 mg/24h (VN: = 4mg/24h), PBG: 15,5 mg/24h (VN: = 2mg/24h), porfirinas urinarias: 8459 mg/24h (VN: = 250mg/24h), Copro: 19%, Penta: 6%, Hexa: 1%, Hepta: 4%, Uro: 70% (VN: 100% Copro); en sangre: IPP: 5,30 a  $\lambda$  619 nm (VN: = 1,30), porfirinas totales 427  $\mu$ g/100ml GR (VN: 150  $\pm$  40  $\mu$ g/100ml); en materia fecal: porfirinas totales: 655  $\mu$ g/g seco (30-130  $\mu$ g/g seco), indicaron la presencia de un componente eritropoyético. El valor de la PBG-D fue de 37,73 U/ml GR (VN: 75,47  $\pm$  11,96 U/ml GR) El diagnóstico genético se realizó en sangre periférica por PCR y secuenciación automática y los resultados indicaron la presencia de dos mutaciones p.G111R y p.E258G en el gen de la PBG-D, poniendo en evidencia un caso de PAI en heterocigosis compuesta. El aumento secundario de la ALA-S llevaría a la acumulación de ALA y PBG en hígado y células eritropoyéticas, donde la síntesis de hemo es sumamente activa, explicando así la acumulación de porfirinas en GR y su llegada a través de la circulación a huesos y tejidos.

**487. (765) HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA Y PORFIRIA CUTÁNEA TARDÍA EN ARGENTINA**

Martinez J.<sup>1</sup>; Colombo F.<sup>2</sup>; Varela L.<sup>3</sup>; Gerez E.<sup>4</sup>; Méndez M.<sup>5</sup>; Batlle A.<sup>6</sup>; Rossetti M.<sup>7</sup>; Parera V.<sup>8</sup>  
*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias Cippyp CONICET, Hospital de Clínicas UBA ; Departamento de Química Biológica FCE y N UBA*<sup>1 2 3 4 6 7 8</sup> ; *Centro de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre Madrid España*<sup>5</sup>  
 javier\_martinez114@hotmail.com

La hemocromatosis hereditaria (HH) es una enfermedad metabólica muy frecuente en la población caucásica. Se observan depósitos de hierro especialmente en hígado, siendo la cirrosis la manifestación más importante. Existen 6 tipos de HH, cada una ligada a un gen específico siendo el gen HFE responsable de HH tipo I. Del estudio de las mutaciones C282Y y H63D en HFE en distintas poblaciones, se observó un aumento en la frecuencia de las mismas con respecto a la población control, siendo más frecuentes en el norte de Europa y de América que en la población mediterránea. La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se produce por deficiencia parcial de la Uroporfirinógeno decarboxilasa. Presenta fotosensibilidad, fragilidad cutánea, hiperpigmentación e hipertricosis. La manifestación clínica de la PCT está asociada a factores desencadenantes, entre los cuales se encuentra la sobrecarga de hierro, observándose, generalmente siderosis hepática y evidencia bioquímica de sobrecarga de hierro. En otras poblaciones se observó una mayor frecuencia de las mutaciones en el gen HFE, en pacientes PCT. Nuestro objetivo fue estudiar la prevalencia en Argentina de C282Y y H63D en pacientes PCT (n=103) y en sujetos control (n=93). Se amplificaron los exones 2 y 4 de FECH con primers específicos y los productos se secuenciaron automáticamente o se digirieron con enzimas de restricción. El 60% del grupo PCT y el 64,5% de los controles no portaban estas mutaciones. En el grupo PCT, el 34,9% presentaba H63D (26,2% heterocigotas, 5,8% homocigotas y 2,9% doble heterocigotas) y el 7,8% C282Y (2,9% en heterocigosis, 1,9% en homocigosis y 2,9% eran doble heterocigotas). En el grupo control, 30,1% portaba la H63D (28% en heterocigosis, 2,1% en homocigosis) y no se detectó la C282Y. No se observaron diferencias significativas entre la población PCT y el grupo control, indicando que en nuestro país el desencadenamiento de la PCT no estaría asociado a la presencia de estas mutaciones.

**488. (801) ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES TUMOR NECROSIS FACTOR- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) E INTERFERON- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) EN PACIENTES CON FALLA MEDULAR: ANEMIA APLÁSICA (AA) Y SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS (SMD)**

Bestach Y.<sup>1</sup>; Sieza Y.<sup>2</sup>; Sciuccati G.<sup>3</sup>; Bengió R.<sup>4</sup>; Verri V.<sup>5</sup>; Giunta M.<sup>6</sup>; Larrira I.<sup>7</sup>; Belli C.<sup>8</sup>  
*Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina*<sup>1 4 7 8</sup> ; *HIGA "San Martín", La Plata*<sup>2</sup> ; *Hospital Nacional de Pediatría "Dr. Garrahan", Buenos Aires*<sup>3</sup> ; *Servicio de Hematología, H.G.A "C. Durand", Buenos Aires*<sup>5</sup> ; *"Instituto Privado de Hematología y Hemoterapia", Paraná*<sup>6</sup>  
 bestachyessica@hotmail.com

Tanto la AA como los SMD presentan citopenias periféricas y deficiencias en la función hematopoyética. Estas patologías poseen zonas de intersección clínica que dificultan su diagnóstico diferencial: un 15% de pacientes con AA evolucionan a SMD y un 15% de pacientes con SMD presentan médulas óseas hipocelulares. Los niveles séricos de las citoquinas pro-inflamatorias TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , típicas de la respuesta inmune celular T helper 1 e involucradas en la supresión de la hematopoyesis o falla medular, se encuentran elevados en estos pacientes. Las variantes alélicas -308A del TNF $\alpha$  y 1349(CA)<sub>12+</sub> del IFN $\alpha$  se asocian con su respectiva mayor expresión. En este estudio se analizaron los polimorfismos -308G/A del gen TNF $\alpha$  (PCR-RFLP) y 1349(CA)<sub>n</sub> del IFN $\alpha$  (PCR-poliacrilamida) en 44 pacientes (12 AA y 32 SMD; edad media: 47 años; relación de sexo M/F: 23/21) y en 56 individuos

sanos. Las frecuencias genotípicas halladas para el TNF $\alpha$  fueron de 0,80 G/G, 0,18 G/A y 0,02 A/A en los pacientes vs. 0,91, 0,07 y 0,02, en los controles, respectivamente. Mientras que, para el IFN $\alpha$  fueron de 0,22 CA $_{12}$ + /CA $_{12}$ +, 0,41 CA $_{12}$ + /CA $_{12}$ - y 0,37 CA $_{12}$ - /CA $_{12}$ - vs. 0,20, 0,32 y 0,48 en los controles, respectivamente. Si bien no se observaron diferencias significativas entre ambas poblaciones, existe una tendencia en la presencia tanto de genotipos como de alelos asociados a una mayor producción de estas citoquinas en este grupo reducido de pacientes. Se observó que 32/44 (73%) pacientes vs. 30/56 (54%) controles sanos mostraron al menos uno de los alelos asociados a mayor producción de citoquinas ( $p=0.0501$ ). Estos pacientes presentaron mayores recuentos de neutrófilos en sangre periférica al diagnóstico ( $p=0.0266$ ). Si bien la población analizada es reducida, los datos sugieren que el estudio de estos polimorfismos, asociados a un incremento de producción de citoquinas, ayudaría a individualizar posibles candidatos para terapias inmunomoduladoras en estas patologías.

**489. (810) DETECCIÓN DE MUTACIONES EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC) APLICANDO HIGH RESOLUTION MELTING (HRM)/ARMS-QPCR.**

Ferri C.<sup>1</sup>; Cuello M.<sup>2</sup>; Bengioli R.<sup>3</sup>; Gonzalez M.<sup>4</sup>; Bianchini M.<sup>5</sup>; Larripa I.<sup>6</sup>

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
clnafer@yahoo.com.ar

La LMC se caracteriza por la presencia del reordenamiento genético BCR-ABL, que codifica la oncoproteína P210<sup>BCR-ABL</sup>, con actividad tirosina kinasa (TK) incrementada. Actualmente el tratamiento de elección son los inhibidores de TK, por su alta efectividad. Sin embargo en algunos casos puede desarrollarse resistencia, debido fundamentalmente a la presencia de mutaciones en el dominio TK del ABL, siendo la mutación T315I la de peor pronóstico. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia de mutaciones en la ATP binding del ABL mediante el método de screening HRM y luego confirmar y cuantificar por ARMS-QPCR la mutación T315I en pacientes con LMC resistentes al tratamiento con ITK. El cDNA obtenido a partir del RNA total, se amplificó mediante PCR en presencia de Eva-green y analizado por HRM, o bien cuantificado mediante sonda Taqman por ARMS-QPCR. Las curvas de calibración y sensibilidad del método se realizaron utilizando un segmento genómico con la mutación T315I y su alelo normal clonados en sus respectivos plásmidos. La sensibilidad del método HRM fue del 5% y del ARMS-QPCR del 0,1%. Se analizaron 20 pacientes que habían sido previamente estudiados por secuenciación automática, presentando la mutación T315I en solo 2 casos (2/20, 10%). Aquellos casos que por HRM mostraron un perfil asociado a un cambio de base (3/20, 15%) fueron posteriormente estudiados por ARMS-QPCR para confirmar y cuantificar la mutación. En los dos pacientes identificados por secuenciación la mutación representó el 37% y 36% de las células tumorales, mientras que el caso no detectado previamente por secuenciación la mutación se evidenció en un 4%. El aumento de la sensibilidad de detección y posterior cuantificación del clon mutado indican que esta metodología sería más conveniente para el seguimiento de pacientes con signos clínico-genético de resistencia a los inhibidores de TK, teniendo en cuenta su implicancia clínica.

**490. (549) ESTUDIO GENÉTICO CLÁSICO DEL COMPORTAMIENTO DE UN ADENOCARCINOMA DE MAMA EN UN MODELO MURINO**

Cáceres J.<sup>1</sup>; Pagura L.<sup>2</sup>; Rico M.<sup>3</sup>; Di Masso R.<sup>4</sup>; Rozados V.<sup>5</sup>

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>1 2 3 4 5</sup>  
jmcaceres2000@gmail.com

El cáncer de mama es una enfermedad compleja y multifactorial. Actualmente los modelos murinos son los más adecuados para el análisis de la progresión tumoral en el ser humano por su proximidad taxonómica, su conocimiento genómico y bioquímico.

El adenocarcinoma de mama M-406 surgió espontáneamente en una hembra de la línea de ratón CBI en el IGE y desde entonces se lo mantiene *in vivo* por injertos intraperitoneales (i.p.) en su huésped singéico. CBI es la línea testigo de un experimento de selección artificial por conformación corporal de la que deriva la línea CBI-. Cuando ratones CBI- son desafiados con M-406 éste crece y regresa en el 100% de los individuos, tanto machos como hembras (resistencia). Por el contrario, en CBI el tumor crece exponencialmente y presenta un 100% de letalidad (susceptibilidad). El estudio de la respuesta al desafío con M-406 en la filial 1 (F1) producto del cruzamiento recíproco entre ambas líneas puso en evidencia el comportamiento dominante de la susceptibilidad al tumor con ausencia de efectos maternos y de dimorfismo sexual. Con el objetivo de estudiar el comportamiento del tumor en la F2, se desafiaron 185 individuos (92 hembras y 93 machos) con M-406 (día 0) vía s.c. El crecimiento del tumor se controló tres veces por semana y se evaluó el porcentaje de toma, regresión y la velocidad de crecimiento. Se observó 100% de toma con un 21,62% de regresión, (40/185, proporción 3:1;  $\chi^2=1,042$ ,  $p>0,05$ ). La velocidad de crecimiento no mostró efecto del sexo. En algunos individuos ( $n=4$  en machos y  $n=5$  hembras) el tumor mostró un crecimiento más lento que podría asociarse a un fenotipo desviante. Se confirma: (1) la condición recesiva de la resistencia al crecimiento de M-406 observada en CBI-; (2) que los genes involucrados serían autosómicos y no estarían influenciados en su expresión por el sexo ni por fenómenos epigenéticos de impronta. Los fenotipos desviantes podrían sugerir otros tipos de interacciones génicas.

**491. (581) PATRONES DE INACTIVACION DEL CROMOSOMA X Y NIVELES DE ACTIVIDAD DEL FVIII:C EN MUJERES PORTADORAS Y NO PORTADORAS DE MUTACIONES CAUSALES DE HEMOFILIA A SEVERA.**

Radic P.<sup>1</sup>; Tetzlaff T.<sup>2</sup>; Candela M.<sup>3</sup>; Rossetti L.<sup>4</sup>; Larripa I.<sup>5</sup>; De Brasi C.<sup>6</sup>

Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires<sup>1 3 4 5 6</sup>,  
Universidad Nacional de General Sarmiento<sup>2</sup>  
pradic@hematologia.anm.edu.ar

La inactivación al azar de uno de los dos cromosomas X en mujeres permite compensar la dosis génica con varones XY. En mujeres portadoras de hemofilia A (HA) severa, se espera que la actividad del FVIII (FVIII:C) correlacione inversamente con la inactivación del cromosoma X en fase con la HA. Esta correlación teórica aún no fue mostrada en la práctica. Esto puede ser debido a: (a) imposibilidad de analizar muestras de hígado, (b) dificultades para determinar la fase entre el X inactivo y la mutación sobre el F8 y (c) el error experimental y variabilidad biológica propios de la FVIII:C. Para estudiar este problema nosotros analizamos la correlación entre el FVIII:C y el patrón de inactivación del cromosoma X (XIP) en 34 portadoras de HA-severa y 20 no-portadoras (controles) bajo distintas hipótesis teóricas. Los valores de XIP fueron calculados en leucocitos de sangre periférica usando el sistema HUMARA. Los genotipos de portadoras heterocigotas y no portadoras fueron caracterizados por un algoritmo de análisis exhaustivo del gen del F8 desarrollado por nosotros. Las portadoras mostraron un FVIII:C promedio de 45IU/dl (DS 30IU/dl) y un XIP promedio del 72% (DS 15%); y las no-portadoras un FVIII:C promedio de 92IU/dl (DS 23IU/dl) y un XIP promedio del 65% (DS 9%). No se observó correlación entre XIP y FVIII:C en las tablas de contingencia ni en portadoras ni en no-portadoras. La correlación XIP/FVIII:C fue reevaluada analizando las diferencias entre los datos observados y los esperados bajo distintos modelos teóricos mostrando una modesta correlación en portadoras con el modelo V (correlación lineal y fase no-conocida) contra diversos modelos alternativos. Este análisis y la presencia de cuatro casos de portadoras afectadas de HA y XIP sesgado extremo sugieren que los patrones de inactivación del X medidos en muestras de sangre están asociados a los niveles de FVIII:C en portadoras heterocigotas de mutaciones severas del F8.

**492. (608) DIAGNÓSTICO PRENATAL DE ATROFIA MUSCULAR ESPINAL: EXPERIENCIA EN 29 FAMILIAS**

**Moya G.<sup>1</sup>**; Masllorens F.<sup>2</sup>; Chertkoff L.<sup>3</sup>; Ferreiro V.<sup>4</sup>; Gonzalez B.<sup>5</sup>; Foscaldi S.<sup>6</sup>; Diaz S.<sup>7</sup>  
*Fundación Genos; UCA<sup>1</sup>; Fundación Genos; Hospital Posadas<sup>2</sup>; Fundación Genos; Hospital Garrahan<sup>3</sup>; Fundación Genos; División Neurocirugía, Hospital de Clínicas "José de San Martín"<sup>4</sup>; Fundación Genos<sup>5 6 7</sup>*  
*gramoya@gmail.com*

La atrofia muscular espinal es un desorden genético caracterizado por debilidad muscular progresiva debido a la degeneración y pérdida de las neuronas del asta anterior de la médula espinal. Es la segunda afección de herencia autosómica recesiva, con una prevalencia de 1 cada 10.000 recién nacidos vivos y una frecuencia de portadores de 1 en 50. Antes del conocimiento de las bases moleculares de esta enfermedad se clasificaba en cuatro tipos clínicos, aunque actualmente se considera como un espectro de gravedad clínica continua. Se han descrito dos genes asociados el *SMN1* y *SMN2*. El gen *SMN1* (survival motor neuron 1) sería el gen principal responsable. Alrededor del 95-98% de los pacientes son homocigotas para la delección de los exones 7 y 8 de *SMN1* y entre un 2-5% son compuestos heterocigotos para esta delección y una mutación puntual del gen *SMN1*. Durante el período 2000-2009, 29 familias con antecedentes de atrofia muscular espinal concurren a nuestro centro para estudios de diagnóstico prenatal previo consulta de asesoramiento genético. En todas se realizó biopsia de vellosidades coriales a partir de la semana 11 de gestación, para estudio directo de la delección del gen *SMN1* y análisis citogenético. En todos los casos se realizó el estudio molecular y se descartó contaminación materna. Todos los casos con resultados normales, fueron confirmados al nacimiento. Dada la prevalencia de portadores de esta enfermedad y la gravedad del pronóstico, se recomienda que familias con antecedente de Atrofia Muscular Espinal sean derivadas a una consulta de asesoramiento genético.

**493. (627) ANALISIS DE POLIMORFISMOS EN LOS GENES GLUTATION-S-TRANSFERASA GSTM1 Y GSTT1 EN ENFERMEDAD CELÍACA**

**Weich N.<sup>1</sup>**; La Motta G.<sup>2</sup>; Crivelli A.<sup>3</sup>; Gómez J.<sup>4</sup>; Slavutsky I.<sup>5</sup>; Larripa I.<sup>6</sup>; Fundia A.<sup>7</sup>  
*Depto. de Genética, IHema, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires<sup>1 5 6 7</sup>; Hospital Interzonal de Agudos General San Martín, La Plata<sup>2 3 4</sup>*  
*nataliaweich@hotmail.com*

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía autoinmune que presenta predisposición a neoplasias e inestabilidad cromosómica (CIN), cuyo origen es aún desconocido. Los genes Glutacion-S-Transferasa (GSTs) constituyen uno de los mayores sistemas encargados de preservar la integridad del ADN mediante la detoxificación de carcinógenos, drogas y otros xenobióticos. Las isoformas GSTM1 y GSTT1 tienen variantes polimórficas nulas por delección homocigota del gen presentando diferencias en su capacidad enzimática y la susceptibilidad al cáncer. El objetivo de este trabajo fue realizar la genotipificación de GSTM1 y GSTT1 en población normal y celíaca a fin de evaluar la influencia de otros factores genéticos subyacentes a la inestabilidad genómica en EC. Se estudiaron muestras de sangre periférica (SP) de 100 dadores sanos y 20 pacientes al momento del diagnóstico. Teniendo en cuenta que los genotipos de línea germinal y del tejido afectado pueden diferir en EC debido a las alteraciones genéticas asociadas a CIN, se compararon muestras apareadas de SP y biopsias de intestino delgado (BID) de 9 pacientes. GSTM1 y GSTT1 se amplificaron por PCR multiplex incluyendo el gen  $\beta$ -globina como control interno y se analizaron en geles de agarosa (2%) con Bromuro de Etidio. El 10% de las muestras se estudió por duplicado con una concordancia del 100%. No hubo diferencias entre los genotipos de las muestras apareadas de SP y BID de cada individuo, demostrando que estos polimorfismos no son modificados por la enfermedad. Las frecuencias de genotipos nulos en el grupo control fueron: GSTM1 (35%), GSTT1 (6%) y GSTM1/GSTT1 (5%). Los pacientes presentaron: GSTM1 nulo (30%) y GSTT1 nulo (5%). No se encontraron diferencias entre pa-

cientes con distinto genotipo y las variables clínicopatológicas así como tampoco con el grado de CIN de estos pacientes estudiado previamente. Estos resultados preliminares sugieren que GSTM1 y GSTT1 no están comprometidos en esta patología.

**494. (715) CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES MISENSE EN PACIENTES ARGENTINOS CON PORFIRIA VARIEGATA**

**Granata B.<sup>1</sup>**; Méndez M.<sup>2</sup>; Parera V.<sup>3</sup>; Batlle A.<sup>4</sup>; Enríquez De Salamanca R.<sup>5</sup>; Rossetti M.<sup>6</sup>  
*CIPYP CONICET<sup>1 3 4 6</sup>; Centro de Investigación Hospital Universitario 12 de Octubre; Madrid España<sup>2 5</sup>*  
*xoyxoana@yahoo.com.ar*

Las Porfirias son desórdenes metabólicos causados por la deficiencia parcial primaria de una de las enzimas del camino biosintético del hemo. Cuando la enzima deficiente es la protoporfirinógeno oxidasa (PPOX), se produce la Porfiria Variegata. Ésta es de herencia autosómica dominante, hepática, sintomatología mixta, manifestación adulta, penetrancia incompleta y asociada a un descenso del 50% de la actividad enzimática. Recientemente, en 18 pacientes aparentemente no relacionados, encontramos 4 defectos de splicing, 3 mutaciones missense y 2 pequeñas delecciones. Las mutaciones missense, estaban ausentes en 50 individuos normales y los valores de actividad enzimática del paciente y familiares asintomáticos fueron de aproximadamente el 50% con respecto a los controles. El objetivo de este trabajo fue corroborar que estas mutaciones, p.E34V, p.W224G y p.G332A, eran realmente la causa de la enfermedad mediante la expresión procarriótica de las mismas. Utilizando como templado el vector pTRC-PPOX wt, que contiene el cDNA normal de la PPOX, obtuvimos los tres constructos correspondientes a las enzimas mutadas mediante mutagénesis sitio dirigida, con los cuales se transformaron bacterias *E.coli* JM109. Las bacterias transformadas se crecieron hasta fase logarítmica y se indujeron con 5mM de IPTG. Luego se centrifugaron, se resuspendieron en buffer y se lisaron por sonicación. Los desechos celulares se separaron por centrifugación y el sobrenadante se empleó como fuente enzimática para determinar la actividad in vitro. De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 1) todas las mutaciones provocan un marcado descenso de la actividad enzimática, corroborándose así que estas son responsables del desarrollo de la Porfiria en los pacientes que las portan.

Constructo	Actividad específica (nmol PROTO/mg/h)	Actividad residual (%)
pTRC	0.21	0
pTRC - PPOX-wt	13.27	100
pTRC - PPOX- E34V	0.51	2.29
pTRC - PPOX - W224G	0.76	1.22
pTRC - PPOX - G332A	0.20	0

**495. (724) ROL DE VARIANTES DE SECUENCIAS DEL GEN BETA 2 AR EN LA INSULINO-RESISTENCIA DE PACIENTES CON SINDROME DE POLIQUISTOSIS OVÁRICA**

**Tellechea M.<sup>1</sup>**; Muzzio D.<sup>2</sup>; Avila N.<sup>3</sup>; Frechtel G.<sup>4</sup>; Cerrone G.<sup>5</sup>  
*Departamento de Microbiología Inmunología y Biotecnología FFYB UBA<sup>1 2 3 5</sup>; División Genética, Hospital de Clínicas "José De San Martín", UBA<sup>4</sup>*  
*marianatellechea78@hotmail.com*

La actividad lipolítica en células grasas es regulada por catecolaminas que actúan a través de receptores adrenérgicos, entre ellos el receptor Beta 2 adrenérgico (B2AR) que se expresa en células del tejido graso estimulando la lipólisis e insulino-resistencia (IR). *Objetivos:* 1. Estudiar la asociación de SNPs individuales y haplotipos del gen B2AR con PCOS (Síndrome de Poliquistosis Ovárica) 2. Estudiar en la sub-población de PCOS, la asociación de los mismos con fenotipos intermedios (obesidad, IR y metabolismo lipídico). *Métodos:* Se realizaron determinaciones clínicas y



bioquímicas en 116 mujeres controles y 165 pacientes con PCOS. La genotipificación (PCR-SSCP y confirmación por PCR-RFLP y secuenciación) permitió identificar haplotipos en fase de 4 SNPs: rs1042711(T-47TC), rs1801704(T-20TC), rs1042713(G46A) y rs1042714 (G79C). Se analizaron diferencias en tasas de prevalencia y en variables continuas entre casos y controles y en la sub-población de casos. La hipótesis nula fue rechazada si el nivel de significancia fue menor que 0,05. **Resultados:** Fueron identificados los siguientes genotipos: TTAC/TTAC(1), CCGG/CCGG(2), TTGC/TTGC(3), CCGG/TTAC(4), TTGC/TTAC(5) y CCGG/TTGC(6). 1. No se observó asociación con PCOS. No se observó diferencia significativa en variables continuas en función de SNPs individuales o haplotipos entre casos y controles. 2. En la población con PCOS, CCGG/X presentó mayor insulina ( $p=0,049$ ) y HOMA ( $p=0,008$ ) y TTGC/X mayor insulina ( $p=0,08$ ). rs1042714C presentó menor QUICKY ( $p=0,016$ ), y rs1042714CC mayor insulina ( $p=0,018$ ) y HOMA ( $p=0,02$ ). rs1042711T y rs1801704T presentaron menor QUICKY ( $p=0,03$ ); rs1042711TT y rs1801704TT mayor insulina ( $p=0,018$ ) y HOMA ( $p=0,008$ ). **Conclusión:** Los SNPs estudiados no estarían asociados a PCOS; sin embargo, rs1042714(G79C) y los SNPs del 5'UTR (rs1042711 y rs1801704) tendrían un efecto sobre la IR en PCOS. Se necesita analizar un mayor número de casos y de SNPs para determinar con claridad la utilidad del análisis haplotípico del gen B2AR completo.

**496. (726) PATRON COMUN DE VARIANTES DE SECUENCIA DEL GEN DE LA FERROQUELATASA EN LA POBLACIÓN ARGENTINA**

Colombo F.<sup>1</sup>; Martinez J.<sup>2</sup>; Melito V.<sup>3</sup>; Battle A.<sup>4</sup>; Rossetti M.<sup>5</sup>; Parera V.<sup>6</sup>

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias Cipyp CONICET Hospital de Clínicas UBA ; Departamento de Química Biológica FCEN UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
fpcolombo@hotmail.com*

La Protoporfiria Eritropoyética (PPE) se produce por una deficiencia parcial de la enzima Ferroquelatasa debido a la asociación en trans de variantes del gen FECH. El 96% de los pacientes presenta herencia autosómica pseudodominante como resultado de la herencia combinada (en el 99% de los casos), de un alelo mutado y un alelo de baja expresión formado por las variantes c.1-251G, c.68-23T, c.315-48C. El restante 4% presenta herencia autosómica recesiva. El gen FECH cuenta con más de 524 variantes genéticas que contribuirían a modular la penetrancia y expresividad de la enfermedad. Nuestro objetivo fue determinar patrones comunes de herencia de variantes del gen FECH, determinando las posibles asociaciones en cis, en busca de desarrollar herramientas rápidas de diagnóstico. Se analizaron las variantes intragénicas c.1-251A>G, c.68-23C>T, c.315-48T>C, c.798G>C y c.921G>A del gen, en 203 individuos (pacientes PPE, familiares, pacientes con otras porfirias y sujetos control. Se amplificaron las regiones que contenían cada variante y los productos se digirieron con endonucleasas específicas. Las variantes c.798G>C y c.921G>A (ESE), se asociaron no aleatoriamente en todos los alelos estudiados formando los haplotipos GG o CA. Del estudio de las variantes c.1-251A>G, c.68-23C>T, c.315-48T>C, sólo las dos primeras mostraron asociaciones no aleatorias. El 96,18% de los alelos estudiados formaron los haplotipos AC o GT. Sólo para el 75% de los alelos GT se observó cosegregación con la variante c.315-48C. La estrecha relación entre variantes de FECH permitiría genotipificar sólo alguna de éstas y proporcionaría información para predecir el resto, desempeñándose como marcador genético para identificar haplotipos comunes con mayor rapidez. Sin embargo no se pueden utilizar como herramienta de diagnóstico debido a que no se encontraron asociaciones no aleatorias que involucren a las variantes que modulan la penetrancia de la PPE.

**497. (754) FIBROSIS QUISTICA: IMPORTANCIA DEL ANALISIS PRENATAL DE MUTACIONES FRECUENTES EN EL GEN CFTR.**

Gonzalez B.<sup>1</sup>; Foscaldi S.<sup>2</sup>; Moya G.<sup>3</sup>; Masllorens F.<sup>4</sup>; Diaz S.<sup>5</sup>; Ferreiro V.<sup>6</sup>

*Fundación Genos<sup>1 2 5</sup>; Fundación Genos; UCA<sup>3</sup>; Fundación Genos; Hospital Posadas<sup>4</sup>; Fundación Genos; División Neurocirugía, Hospital de Clínicas "José de San Martín"<sup>6</sup>  
belugonza@hotmail.com*

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad hereditaria más frecuente en la población caucásica. Su patrón hereditario es autosómico recesivo, siendo la frecuencia de portadores 1 en 27 en la población general. Es producida por mutaciones en el gen CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) en el cromosoma 7 (7q31). Es una enfermedad multisistémica, que afecta principalmente los sistemas gastrointestinal, pulmonar y reproductivo, con una amplia variabilidad en su presentación clínica. En muchos casos puede llevar a la muerte a temprana edad, especialmente si no se cuenta con el tratamiento adecuado. Debido a la alta prevalencia, al riesgo de repetición de la enfermedad, y a que la intervención temprana mejora el pronóstico de la patología, se sugiere la realización de estudios prenatales en familias con antecedentes de la misma. Como estrategia diagnóstica general para el diagnóstico prenatal, en primer lugar se analizan las 29 mutaciones más frecuentes del gen CFTR mediante el kit Elucigene™ CF29 v.2 (Tepnel®) en la pareja consultante con el objeto de identificar las mutaciones familiares presentes. En los casos informativos se analiza mediante el mismo kit de PCR alelo-específica las muestras prenatales y en todos los casos se descarta contaminación con sangre materna. Se analizaron 6 muestras de vellosidades coriales, 2 de líquido amniótico, 6 mujeres embarazadas y un padre de una gestación en curso, pertenecientes a 15 familias con antecedentes relevantes de FQ. Una vellosidad y 1 líquido amniótico resultaron heterocigotas para la mutación DF508, 1 vellosidad resultó doble heterocigota para las mutaciones DF508 y N1303K y otra positiva para la mutación R117H. El resto de las muestras prenatales analizadas no presentaron ninguna de las 29 mutaciones estudiadas. Los resultados obtenidos y el correcto asesoramiento genético permiten a los padres y al médico responsable establecer las estrategias más adecuadas para el apropiado control perinatal.

**498. (755) EFECTO DE LA VARIANTE C.603 A>G DEL GEN URO-D SOBRE LA MANIFESTACIÓN CLÍNICA DE LA PORFIRIA CUTÁNEA TARDÍA HEREDITARIA**

Marcucci V.<sup>1</sup>; Colombo F.<sup>2</sup>; Battle A.<sup>3</sup>; Parera V.<sup>4</sup>; Rossetti M.<sup>5</sup>

*Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>  
val\_gen5@hotmail.com*

La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) es un desorden hereditario de la biosíntesis del Hemo, causado por una deficiencia parcial de la enzima Uroporfirinógeno Decarboxilasa (URO-D). Existen 2 tipos principales: adquirida (PCT-A) y hereditaria (PCT-H) esta última, de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. Es desencadenada por factores epigenéticos como sobrecarga de hierro, drogas hepatotóxicas, hormonas, abuso de alcohol entre otros. Nuestro objetivo fue analizar la prevalencia poblacional de la variante polimórfica c.603 A>G del gen de la URO-D que interviene en un sitio regulador de splicing (ESE) y su efecto sobre la manifestación clínica de la enfermedad. Usando la herramienta bioinformática ESEfinder se determinó para la variante polimórfica un puntaje mayor que para variante normal, lo que indica que ese sitio ESE adquiriría mayor funcionalidad con la variante c.603 G que con la variante ancestral c.603 A. Se analizó su presencia en 68 individuos (27 pacientes PCT, 4 familiares y 37 controles) mediante la técnica de HemiNested-ASO PCR. Al comparar los resultados obtenidos en pacientes y controles para la variante c.603 A no se encontraron diferencias significativas entre ellos (frecuencia alélica 0,85 y 0,89 respectivamente). Se observaron 2 pacientes PCT-H portadores de la variante c.603 G en homocigosis que presentaron sintomatología clínica menos severa que otros del mismo grupo. Debido al número pequeño de pacientes, no se puede establecer con certeza una asociación entre la variante polimórfica y la expresividad de

la PCT, sin embargo los datos obtenidos permitirían sugerir que una vez desencadenada la Porfiria, la variante c.603 G atenuaría su sintomatología clínica.

## ENDOCRINOLOGIA 5

### 499. (188) EXPRESION DE UNA NUEVA VARIANTE 3' DEL TRANSCRIPTO INTRON 9 DE LA ENZIMA CITOCROMO P450AROMATASA EN PLACENTA HUMANA A TERMINO.

Sainz R.<sup>1</sup>; Saraco N.<sup>2</sup>; Pepe C.<sup>3</sup>; Iniguez G.<sup>4</sup>; Rivarola M.<sup>5</sup>; Mericq V.<sup>6</sup>; Belgorosky A.<sup>7</sup>  
Hospital de Pediatría J P Garrahan<sup>1 2 3 5 7</sup>; Instituto de Investigaciones Materno Infantil, Hospital San Borja Arriaran, Santiago, Chile.<sup>4 6</sup>  
rominasainz@hotmail.com

La aromatasa (cP450arom) es un complejo enzimático que cataliza la conversión de los andrógenos a estrógenos. En la placenta humana, la cP450arom está localizada exclusivamente en el sincitiotrofoblasto. Durante la gestación se observa un aumento de la concentración de la enzima sin variaciones en su naturaleza y localización. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la institución.

El splicing alternativo de la región codificante de cP450arom fue descrita previamente en otras especies pero no en humanos. Además, se conoce que eventos de splicing alternativo estarían involucrados en la regulación de la expresión de cP450arom. Nuestro objetivo fue evaluar la expresión de la variante intron 9 (IN9) en placenta (pl). Fue extraído el ARN total de 17 PI de nacimientos de 6 niños (m) y 11 niñas (f). Los ARNm de cP450arom fueron evaluados por RT-PCR en tiempo real y la proteína por western blot. Encontramos que la expresión de la variante IN9 en PI, cuyo transcripto en relación a la cP450arom total (CYP19) o la cP450arom activa (Arom) fue significativamente mayor en m (IN9/CYP19: 7.74 ± 5.04 e IN9/Arom: 10.82 ± 7.33 UA, media ± SD, n=6) que en f (IN9/CYP19: 1.77 ± 1.53 e IN9/Arom: 2.10 ± 2.36 UA, mean ± SD, n=11), p=0.006.

Describimos por primera vez una nueva variante de transcripto de la Aro que tiene una expresión género-específica. Como IN9 es un transcripto de cP450arom truncado y una proteína sin actividad, proponemos que la expresión de esta variante podría estar involucrada en la regulación de la actividad aromatasa en PI.

### 500. (243) LOS ANDRÓGENOS INACTIVAN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN CANÓNICA DEL WNT EN PAPILAS DÉRMICAS (DP) INHIBIENDO LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO PILOSO (HFSC) DURANTE EL DESARROLLO DE LA ALOPECIA ANDROGENÉTICA (AGA).

Attorresi A.<sup>1</sup>; Leirós G.<sup>2</sup>; Del Priore S.<sup>3</sup>; Balañá M.<sup>4</sup>  
Instituto de Ciencia y Tecnología Dr César Milstein (CONICET). Fundación Cassará<sup>1 2 3 4</sup>  
attorresi@fundacioncassara.org.ar

La formación del HF se inicia cuando las DP, de origen mesenquimal, envían señales paracrinas a las células madre epidérmicas multipotentes del folículo piloso (HFSC). Los HF humanos de cuero cabelludo tienen un crecimiento susceptible a la acción andrógena ejercida a través de la modulación de la actividad de la DP que en la AGA causan miniaturización de los HF. Mientras que los andrógenos tienen efecto regresivo en el crecimiento de los HF sensibles, la vía Wnt/β-catenina afecta positivamente el crecimiento del pelo de mamífero. Este estudio propone estudiar la interacción de la vía androgénica con la vía de señalización Wnt/β-catenina en las DP e investigar los efectos de los andrógenos sobre la diferenciación de las HFSC. La relación de expresión de β-catenina citoplasmática/total es 4 veces menor (p<0.05) en las DP tratadas con dihidrotestosterona (DHT) mostrando que los andrógenos son capaces de inhibir la vía canónica de Wnt en DP, disminuyendo el pool citoplasmático de β-catenina. El análisis de los medios condicionados de las DP por geles bidimensionales

y HPLC reveló un perfil de proteínas diferencialmente secretadas por acción de DHT. Como modelo de las interacciones epitelio-mesénquima que inducen la diferenciación de las HFSC, se utilizaron co-cultivos de DP con HFSC o tratamiento de HFSC con medios condicionados de DP de pacientes con AGA. La DHT inhibe significativamente la diferenciación a pelo de las HFSC, utilizando como marcador de diferenciación la expresión de la keratina de pelo K6hf (unidades arbitrarias de intensidad de banda ±DS Control: 0.17±0.09, DP: 1±0.3, DP+DHT: 0.17±0.07). Dicho efecto es revertido cuando las DP se tratan con LiCl, activador de la vía de la β-catenina (DP+LiCl: 1.41±0.2; DP+LiCl+DHT: 1.33±0.15). Estos resultados sugieren que los andrógenos modularían la secreción de factores paracrinos implicados en la diferenciación normal de HFSC, inactivando la vía de señalización canónica de Wnt.

### 501. (255) ESTUDIOS DEL EFECTO DE GHRELINA SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL (HHA)

Cabral A.<sup>1</sup>; Valdívila-torres S.<sup>2</sup>; Suescun M.<sup>3</sup>; Zigman J.<sup>4</sup>; Raingo J.<sup>5</sup>; Perelló M.<sup>6</sup>  
Instituto Multidisciplinario de Biología Celular<sup>1 2 3 5 6</sup>; Cátedra de Endocrinología Facultad de Ciencias Exactas UNLP<sup>3</sup>; Department of Internal Medicine (Divisions of Hypothalamic Research and Endocrinology & Metabolism) University of Texas Southwestern Medical Center (UTSW), Dallas, Texas, 75390, USA<sup>4</sup> agustinacabral177@hotmail.com

La ghrelina es una hormona producida principalmente por las células del estómago. El receptor GHSR (*Growth Hormone Secretagogue Receptor*) media las acciones de ghrelina sobre el consumo de alimento y la actividad de los ejes neuroendocrinos. Se sabe que ghrelina activa el eje HHA actuando sobre las neuronas hipotalámicas productoras de CRF (*Corticotropin-Releasing Factor*). Sin embargo, los circuitos neuronales que median esta acción y su relevancia fisiológica permanecen desconocidos. Con el objeto de establecer si la acción de ghrelina es requerida para la función normal del eje HHA comparamos la actividad basal y la respuesta al estrés de ratones salvaje y ratones deficientes de GHSR. Nuestros resultados indican que ambos grupos poseen similares valores basales de glucocorticoides (5.6±0.4 vs 5.3±0.3 µg/dL, respectivamente). Sin embargo, en situaciones de estrés agudo o crónico, la respuesta del eje HHA de los animales deficientes de GHSR es menor a la de los animales control (corticosterona: 17.3±0.9 vs 21.0±1.1 µg/dL y 71.5±8.3 vs 94.9±8.8 µg/dL para ayuno y agresión crónica, respectivamente). La administración de ghrelina en animales control aumenta la expresión de CRF en el núcleo paraventricular hipotalámico (1.0±0.3 vs 3.2±0.4 unidades relativas de ARNm para CRF) y activa el eje HHA. Para determinar si las neuronas CRF pueden responder directamente a ghrelina se determinó si expresan GHSR. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* contra GHSR y de unión de ghrelina indican que las neuronas CRF no expresan GHSR. En conclusión, nuestros estudios indican que la acción de ghrelina es requerida para la normal respuesta al estrés del eje HHA y que esta acción estimuladora de ghrelina sobre las neuronas CRF se produce indirectamente. En estudios futuros intentaremos entender los mecanismos que median la vía indirecta de acción de ghrelina sobre las neuronas CRF.

Financiado por "Returning Home Programme" de IBRO y Fundación Florencio Fiorini.

### 502. (299) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA SECRECIÓN DE OCITOCINA

Luce V.<sup>1</sup>; Burdet B.<sup>2</sup>; Zorrilla Zubilete M.<sup>3</sup>; Rettori V.<sup>4</sup>; De Laurentiis A.<sup>5</sup>  
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos, CEFY-BO-CONICET-UBA, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 4 5</sup>; 1era Cátedra de Farmacología Facultad de Medicina UBA<sup>2 3</sup>  
valeria\_luce@yahoo.com.ar

El sistema endocannabinoides participa en el control neuroendocrino del eje hipotálamo-hipofisario en la homeostasis y la reproducción. Los endocannabinoides (EC) son liberados por las neuronas magnocelulares hipotalámicas y los receptores de EC

tipo CB1 han sido localizados en estas neuronas. Hemos demostrado que el EC anandamida (AEA) inhibe la secreción de ocitocina (OXT) desde la neurohipófisis y la aumenta desde el hipotálamo, indicando un efecto diferencial del sistema EC en la regulación de la secreción de OXT. La óxido nítrico sintasa (NOS) se expresa en las neuronas magnocelulares y su inhibición aumenta la secreción de OXT in vivo. Previamente demostramos que el NO actuaría como freno al estímulo de la AEA sobre la secreción hipotalámica de OXT in vitro. Asimismo, en el presente estudio observamos un efecto inhibitorio del NO ( $p < 0.01$ ) sobre la secreción neurohipofisaria de OXT (radioinmunoensayo) y una activación de la NOS (método de radioconversión de [ $^{14}\text{C}$ ]arginina a [ $^{14}\text{C}$ ]citrulina) por AEA ( $p < 0.01$ ) en la neurohipófisis de ratas Sprague Dawley machos. Además, resultados previos empleando antagonistas de receptores de EC indican que el subtipo CB1 hipotalámico y el subtipo CB2 neurohipofisario participan del control que ejerce la AEA sobre la secreción de OXT. En este estudio evaluamos la expresión hipotalámica del mRNA de CB1 y CB2 por q-PCR y observamos que ambos están presentes pero la evaluación por Western blot indica que solo se encuentra la proteína de CB1. Por otro lado, en la neurohipófisis hay una gran expresión tanto de mRNA como de proteína CB2, siendo indetectable el CB1. Concluimos que los efectos opuestos de AEA sobre la secreción de OXT observados a nivel hipotalámico y neurohipofisario estarían dados por las diferentes vías intracelulares activadas por ambos subtipos de receptores cannabinoides. (BID PICT 06-0258, CONICET PIP 02546).

### 503. (357) FACTORES PROTEICOS SECRETADOS POR CELULAS EPITELIALES MAMARIAS: EFECTO SOBRE LA CASCADA DE SEÑALIZACION PARA LA PRODUCCION DE LIPIDOS

Calzadilla P.<sup>1</sup>; Cosentino S.<sup>2</sup>; Calvo J.<sup>3</sup>; Guerra L.<sup>4</sup>  
FCEYN UBA<sup>1 2 3 4</sup> pablo\_calza@hotmail.com

La diferenciación de los preadipocitos es regulada por factores de transcripción (FT) como C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$  y PPAR $\gamma$  que llevan a la acumulación de triglicéridos (Tg). Se purificó y caracterizó un factor proteico (TgIF) secretado por células mamarias murinas (NMMG) que inhibe la acumulación de lípidos en adipocitos de ratón (cultivos primarios y línea 3T3-L1); utilizando MALDI se demostró que TgIF podría ser la galactosa 3-O-sulfotransferasa (GST). Dado que la purificación no ha sido a homogeneidad; se evaluó el efecto del TgIF purificado sobre la expresión de los FT mencionados en 3T3-L1, y el efecto de la GST recombinante obtenida por transfección de células BHK21 que no producen TgIF. Los preadipocitos se diferenciaron a adipocitos (utilizando 3-isobutil-1-metil xantina, dexametasona e insulina) en presencia o ausencia de TgIF. Se realizó un estudio temporal (6 días) de la expresión de FT durante la diferenciación en: células controles no diferenciadas (CC), células diferenciadas (CD) y células diferenciadas tratadas con TgIF (CDF). La expresión de FT se relativizó por actina y por CC. La expresión de todos los FT disminuyó en presencia de TgIF; con máximo de inhibición al día 2 para C/EBP $\beta$ , (CD:  $9.38 \pm 1.19$  UA vs CDF:  $3.04 + 0.11$  UA,  $p < 0.01$ ) y C/EBP $\delta$  (CD:  $13.09$  UA  $\pm 2.39$  vs CDF:  $5.19 + 2.02$  UA,  $p < 0.01$ ), y máxima inhibición al día 6 para PPAR $\gamma$  (CD:  $2.95 \pm 0.32$  UA vs CDF:  $0.61 + 0.37$  UA,  $p < 0.01$ ). Como paso previo a su estudio, la enzima GST clonada en pSVK 3 (cedida por K Honke) se amplificó en bacterias JM utilizando como marcador de selección ampicilina, se confirmó la transformación mediante digestión con enzimas de restricción. Se demostró que el TgIF purificado modifica la expresión de los FT responsables de la acumulación de Tg, sugiriendo que esta enzima actuaría de forma secundaria sobre la cascada de señalización para la producción de lípidos. El estudio de la inhibición de la acumulación de Tg por la enzima recombinante está en proceso en el laboratorio.

### 504. (393) MENOPAUSIA Y PERFIL TIROIDEO.

Melillo C.<sup>1</sup>; Prener P.<sup>2</sup>; Cabral A.<sup>3</sup>; Alaniz F.<sup>4</sup>; Alaniz E.<sup>5</sup>; Suescun M.<sup>6</sup>  
Cátedra de Endocrinología Facultad de Ciencias Exactas UNLP<sup>1</sup>; Laboratorio Central Hospital San Juan de Dios<sup>2</sup>;

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular<sup>3</sup>; Instituto Medico Materde<sup>4</sup>; Cátedra de Endocrinología Facultad de Ciencias Exactas UNLP; Instituto Multidisciplinario de Biología Celular<sup>6</sup>  
claudiamelillo@gmail.com

Estudios experimentales y clínicos sugieren que los ejes Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo y Ovárico interactúan en condiciones fisiológicas y patológicas. En el envejecimiento ocurren alteraciones en los ejes endocrinos. Los trastornos tiroideos y autoinmunes son más frecuentes en mujeres y aumentan en cada década de la vida. El hipotiroidismo y la menopausia comparten síntomas clínicos y alteraciones metabólicas. Objetivo: estudiar eventuales modificaciones en el eje tiroideo en mujeres menopáusicas. Se seleccionaron 91 mujeres menopáusicas entre 40 y 80 años (G1); 70 hombres con igual edad (G2) y 90 mujeres en edad reproductiva (G3). Se determinaron los niveles séricos de Tirotrófina (TSH), Triiodotironina (T3), Tiroxina (T4), Tiroxina Libre (T4L), Anticuerpos Anti-Tiroperoxidasa (a-TPO) y Anti-Tiroglobulina (a-TG), por Quimioluminiscencia (DPC-IMMULITE). La TSH media fue significativamente mayor en G1 respecto de G2 y G3 ( $X \pm ES$ ; G1:  $4.128 \pm 0.3247$  vs G2:  $2.340 \pm 0.1593$  y G3:  $1.801 \pm 0.1430$  mUI/L,  $p < 0.05$ ). T4, T3 y T4L medias fueron similares en G1, G2 y G3. Los títulos de a-TPO y a-TG hallados en el 12% de G1 superaron el valor de corte para el método utilizado, sugiriendo un aumento de autoinmunidad con respecto a la población fértil. Las TSH en el 76% de la población en G2 y 74% en G3 resultaron en el rango de referencia (0.40-4.00 mUI/L). En tanto que en G1 dichos valores correspondieron al 50% ( $n=46$ ). Al analizar el grupo G1 en función del tiempo transcurrido a partir de la menopausia, no se observaron cambios significativos en las diferentes hormonas. No obstante, en la primera década pos-menopausia se detectó un aumento aproximado del 35% en la TSH sérica respecto a las décadas subsiguientes. En conclusión, se observó una estrecha relación entre menopausia y aumento en los niveles de Tirotrófina, por consiguiente sería adecuado un seguimiento del eje tiroideo en esta etapa de la vida para diferenciarla del hipotiroidismo y establecer un adecuado tratamiento.

### 505. (505) BISFENOL A MODIFICA LOS MECANISMOS NEUROINMUOENDOCRINOS QUE REGULAN EL EJE REPRODUCTOR AFECTANDO SU RESPUESTA ANTE UN EVENTO INFLAMATORIO

Gámez J.<sup>1</sup>; Cardoso N.<sup>2</sup>; Penalba R.<sup>3</sup>; Lavalle J.<sup>4</sup>; Carbone S.<sup>5</sup>; Ponzo O.<sup>6</sup>; Scachi P.<sup>7</sup>; Reynoso R.<sup>8</sup>  
Laboratorio de Endocrinología. Depto. de Fisiología. Fac. Medicina. UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
juanmgomez@gmail.com

La disrupción del sistema endocrino afecta al sistema inmune. El organismo es capaz de tolerar el efecto de una toxina generando una respuesta apropiada, pero la toxicidad se incrementa al exponerlo previamente a agentes que lo han sensibilizado. Bisfenol A (BPA) alteraría el sistema inmune incrementando la toxicidad de la toxina y afectaría su regulación reduciendo la producción de NO y de TNF $\alpha$  inducida por LPS. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto del BPA, sobre los mecanismos neuroinmunoendocrinos que regulan el eje reproductor y su respuesta durante la inflamación sistémica, en animales macho adultos expuestos a BPA desde el inicio de la gesta y durante la lactancia. Se administró BPA en el agua de bebida (Dosis aproximada de exposición =  $0.125$  mg/kg/día) a la rata madre y etanol al 0.1% (grupo control), ( $n=10$ /grupo). Los grupos estudiados fueron: 1) control; 2) animales tratados con BPA; 3) animales tratados con LPS; 4) animales tratados con BPA+LPS. LPS en dosis  $250$  ug/kg fue administrado por vía I.P, 5 horas antes del sacrificio. Se determinó liberación de Gn-RH, GABA y producción de nitritos por fragmentos de hipotálamo medio basal (RIA pg/HMB, HPLC nmol/HMB, método de Griess  $\mu\text{moles/l}$ ). Resultados: Gn-RH: 1)  $5.3 \pm 0.7$ , 2)  $3.5 \pm 0.9$ , 3)  $3.1 \pm 0.6$ , 4)  $2.5 \pm 0.2$ ; GABA 1)  $666 \pm 89$ , 2)  $913 \pm 131$ , 3)  $1050 \pm 109$ , 4)  $1524 \pm 208$ ; Nitritos: 1)  $30 \pm 0.2$ , 2)  $26 \pm 2.7$ , 3)  $75 \pm 1.4$ , 4)  $18 \pm 0.2$ . BPA+LPS produjo disminución significativa ( $p < 0.001$ ) de la liberación de Gn-RH al compararlo con el grupo control y con los

tratados solo con BPA o con LPS. La liberación de GABA se incrementó significativamente en los mismos grupos ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). El tratamiento con BPA no modificó la producción de nitritos, mientras LPS la incrementó ( $p < 0.001$ ) y el tratamiento conjunto la disminuyó significativamente, ( $p < 0.001$ ). La exposición a BPA podría afectar los mecanismos neuroinmunoendocrinos de regulación del eje reproductor modificando así su respuesta ante un evento inflamatorio.

**506. (619) LA METFORMINA REVIERTE LOS EFECTOS ANTI-OSTEOGÉNICOS DE LA ROSIGLITAZONA IN VIVO Y EX VIVO EN RATAS.**

Tolosa M.<sup>1</sup>; Molinuevo M.<sup>2</sup>; Sbaraglini M.<sup>3</sup>; Felice J.<sup>4</sup>; Sedlinsky C.<sup>5</sup>; Schurman L.<sup>6</sup>; Mc Carthy A.<sup>7</sup>; Cortizo A.<sup>8</sup>  
 GIOMM, Dpto. Cs Biológicas, Fac. de Ciencias Exactas, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup> maria\_jose\_tolosa@hotmail.com

La Diabetes mellitus se asocia con alteraciones esqueléticas y el tratamiento con insulinosensibilizantes orales como la rosiglitazona incrementa el riesgo de fracturas. Hemos demostrado que la metformina ejerce efectos osteogénicos en osteoblastos en cultivo. Evaluamos los efectos in vivo de insulinosensibilizantes sobre la microarquitectura ósea femoral y ex vivo sobre células progenitoras de médula ósea (CPMO). Se usaron cuatro grupos de ratas: Control, sin tratamiento (C); Metformina 100 mg/kg/día (M); Rosiglitazona 4mg/kg/día (R); o Rosiglitazona + Metformina (RM) durante 21 días. Las CPMO se aislaron del canal femoral y se diferenciaron en medio osteogénico ( $\beta$ -glicerofosfato y ácido ascórbico) /21 días. Los estudios histológicos mostraron un incremento significativo en el área trabecular (AT:125 $\pm$ 3 %C), número de osteoblastos (Ob:130 $\pm$ 8%C) y osteocitos (Oc:150 $\pm$ 10 %C) para el grupo M respecto a C. Se observó una disminución significativa en el grupo R respecto al C (AT: 60 $\pm$ 7; Ob:65 $\pm$ 5; Oc:60 $\pm$ 4, %C); el co-tratamiento mostró niveles similares al grupo M. Estudios con CPMO demostraron un incremento significativo en la diferenciación del grupo M respecto al C: producción de colágeno tipo I (Col1), mineralización (Min) y expresión de Runx2 (Col1, 359 $\pm$ 35 %C; Min, 237 $\pm$ 18 %C; Runx2, 140 $\pm$ 5 %C). Las células provenientes del grupo R mostraron una menor diferenciación en dichos parámetros (Col1:133 $\pm$ 23%C; Min: 76 $\pm$ 4%C; Runx2, 65 $\pm$ 8%C), mientras que el co-tratamiento revirtió parcialmente el efecto de la R (Col1: 200 $\pm$ 20 %C; Min: 150 $\pm$ 13 %C; Runx2, 100 $\pm$ 8 %C). Estos efectos se asociaron con incrementos en los niveles nucleares de  $\beta$ -catenina activada para M y RM; mientras que R disminuye su expresión. En conclusión, la metformina, un agente osteogénico, es capaz de revertir parcialmente las acciones deletéreas de la rosiglitazona en el hueso y la diferenciación de CPMO.

**507. (631) LA HISTAMINA ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG MA-10 A TRAVÉS DE LA UNIÓN A SU RECEPTOR H2 Y EL AUMENTO TRANSITORIO EN LA PRODUCCIÓN DE AMPc**

Mondillo C.<sup>1</sup>; Pagotto R.<sup>2</sup>; Monzón C.<sup>3</sup>; Rogic G.<sup>4</sup>; Besio Moreno M.<sup>5</sup>; Pignataro O.<sup>6</sup>  
 Laboratorio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales, IByME-CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA, Buenos Aires, Argentina.<sup>6</sup>  
 caromondillo@hotmail.com

La histamina (HA) modula la proliferación celular en varios modelos experimentales, incluyendo células normales y tumorales. En nuestro laboratorio demostramos que tanto células de Leydig (CL) normales de rata como la línea de CL de ratón MA-10 expresan los receptores histaminérgicos H1 y H2, y que la HA regula la esteroidogénesis en dichas células. En el presente trabajo evaluamos el posible papel de HA como modulador de la proliferación de las CL y su mecanismo de acción, utilizando la línea MA-10 como modelo experimental. Observamos un incremento significativo de la proliferación celular luego de 24 horas de tratamiento con HA en todas las concentraciones estudiadas (0,1 nM a 10  $\mu$ M), tanto al emplear la técnica de incorporación de timidina tritiada como

un método colorimétrico (MTS). Los resultados fueron similares ante el tratamiento con amthamina (A, agonista específico H2). Dado que en CL H2 está acoplado a la vía adenil ciclasa (AC)/AMPc/PKA, estudiamos el efecto de 24 horas de tratamiento con forskolina (FSK, estimulador directo de AC) o db-AMPc (análogo permeable del AMPc). Ambos compuestos inhibieron la proliferación de manera concentración-dependiente. Medimos luego los niveles de AMPc intracelular por RIA a distintos tiempos de incubación con FSK, HA o A. FSK indujo un aumento sostenido en los niveles de AMPc, mientras que para HA y A el aumento fue transitorio. Evaluamos entonces el efecto de un tratamiento de sólo 15 minutos con db-AMPc sobre la proliferación celular, y observamos inducción de la misma. Repetimos el tratamiento de 24 horas con HA o A agregando isobutil metil xantina (inhibidor de la enzima fosfodiesterasa) 15 minutos después de iniciado el mismo, y observamos inhibición de la proliferación. En conjunto, estos resultados sugieren que la HA estimula la proliferación de las CL MA-10 involucrando al menos la activación de H2 y un aumento transitorio en los niveles de AMPc. Subsidios: CONICET, UBA, ANPCYT, F Roemmers.

**508. (800) EFECTO DE LA SUCCIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE NEURONAS DOPAMINÉRGICAS HIPOTALÁMICAS DE RATAS CON LACTANCIA DEFICIENTE (OFA HR/HR)**

Pennacchio G.<sup>1</sup>; Ayala C.<sup>2</sup>; Jahn G.<sup>3</sup>; Valdez S.<sup>4</sup>; Soaje M.<sup>5</sup>  
 IMBECU CCT-CONICET-Mendoza<sup>1 2 3 5</sup>; Instituto de Ciencias Básicas UNCUYO<sup>4</sup>  
 gpennacchio@mendoza-conicet.gob.ar

En la lactancia normal, la succión inhibe la activación de STAT5b por PRL y estimula la expresión de SOCS. Las ratas de la cepa OFA hr/hr tienen lactancia deficiente y se caracterizan por un tono dopaminérgico elevado y gran susceptibilidad al estrés. **Objetivo:** estudiar el efecto de la succión en las vías de señalización involucradas en la activación de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas, principales reguladoras de la secreción de PRL. **Metodología:** se usaron ratas de la cepa OFA en el día 10-12 de lactancia, con lactancia continua (LC), separadas de sus crías durante 12 h (S/ss), separadas por 12 h y luego reunidas con las crías y succionadas durante 2 h y 4 h. Se estableció por real time PCR la expresión de tirosina hidroxilasa (TH), REa, RPRL<sub>L</sub>, STAT5b, SOCS1, SOCS3 respecto al gen S16 y se correlacionaron los resultados con PRL sérica por RIA. **Resultados:** en correlación inversa con la PRL sérica, la expresión de TH cayó significativamente en ratas con LC (0.54 $\pm$ 0.05), 2 h (0.62 $\pm$ 0.09) y 4 h (0.38 $\pm$ 0.06) de succión comparadas con madres separadas (S/ss:1.00 $\pm$ 0.14). El perfil de expresión del RPRL<sub>L</sub> fue similar al de TH en los grupos estudiados. La separación no modificó la expresión de STAT5b ni del REa pero la succión por 2 y 4 h disminuyó significativamente la expresión de ambos a menos de la mitad. La expresión de SOCS1 no cambió, pero la separación aumentó la expresión de SOCS3 (LC: 0,32 $\pm$ 0,06, S/ss: 1.00 $\pm$ 0.14  $p < 0,01$ ) y 2 (0,22 $\pm$ 0.02) y 4h (0.25 $\pm$ 0.04) de succión revirtieron el efecto de la separación. **Conclusiones:** En las ratas OFA la succión disminuye la expresión del RPRL y de STAT5b e inhibe la activación de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas. La menor expresión de SOCS3 indicaría que en esta cepa de ratas, la succión es incapaz de estimular su expresión para contribuir al estado de hiperprolactinemia característico de la lactancia explicando parcialmente el déficit en la misma.

## NEUROCIENCIAS 5

**509. (180) ELEMENTOS TRAZAS Y CONDUCTA: EFECTOS DEL NZTE EN RATAS PREPUBERALES EN RESPUESTAS COMPORTAMENTALES LATERALIZADAS.**

Alvarez E.<sup>1</sup>; Ratti S.<sup>2</sup>  
 Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, IMBECU-CONICET<sup>1 2</sup>  
 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 previamente ha mostrado que el tratamiento con ZnTe en bajas dosis modificó la exploración motivada y conductas sociales en ratas prepuberales. En este trabajo, se estudió si estos elementos trazas podrían afectar ciertas conductas lateralizadas en estos animales. Se trabajó con crías provenientes de parejas expuestas a ZnTe (0.3 µg/L) disueltas en el agua de beber. Ratas con agua corriente se consideraron control. Se dispuso de 2 grupos: [1] control (n=22) y [2] ZnTe (0.3 µg/L, n=12). Los animales fueron expuestos al tratamiento desde su nacimiento hasta el día 30, donde se testaron en un Laberinto en T (LT) para medir decisiones preferenciales izquierda/derecha de 2 refugios idénticos en 90° al pasillo de decisión y 24 h después en un Laberinto de Elección Múltiple (LEM) consistente en una serie de compartimientos con 2 puertas localizadas izquierda/derecha de la rata. Los resultados mostraron que los animales controles no mostraron elección preferencial en el LT (57.9% elección izquierda, 42.1% elección derecha, n.s.). En cambio, los animales tratados con ZnTe, mostraron preferencia izquierda (83.3% izquierda, 16.7%,  $p < 0.025$ ). En el LEM, los animales controles mostraron preferencia derecha en la selección de las puertas (80% derecha, 20% izquierda,  $p < 0.01$ ) y los animales tratados con los elementos traza, esta preferencia desapareció (54.4% izquierda, 45.5%, n.s.). Los resultados encontrados apoyan la idea que los elementos traza afectan algunas conductas exploratorias lateralizadas.

#### 510. (192) HUNTINGTINA PODRÍA SER UNA PROTEÍNA CLAVE EN LA ENDOCITOSIS MEDIADA POR CLATRINA DE NEURONAS

Borgonovo J.<sup>1</sup>; Capella P.<sup>2</sup>; Roth G.<sup>3</sup>; Lucas J.<sup>4</sup>; Sosa M.<sup>5</sup>  
IHEM-CONICET, Mendoza<sup>1 2 5</sup>; CIQUIBIC Fac Cs Qcas  
UNC<sup>3</sup>; Inst Severo Ochoa -Madrid<sup>4</sup>  
jborg@fcm.uncu.edu.ar

La enfermedad de Huntington es un desorden neurodegenerativo causado por la expansión anormal de repeticiones poli-glutamina (polyQ) en el extremo N-terminal de huntingtina (htt). Esta proteína posee normalmente un máximo de 30 repeticiones polyQ, por lo que una extensión mayor lleva al desarrollo de la patología. Htt es de distribución ubicua y se localiza en el citosol o asociada a microtúbulos, a membranas y a las vesículas cubiertas con clatrina (VCCs). Aunque la participación de htt en el tráfico vesicular ha sido postulada, no se conoce si esta proteína cumple algún rol en la endocitosis mediada por clatrina (EMC). El objetivo de este trabajo fue evaluar si htt forma parte de la maquinaria endocítica y si la excesiva extensión polyQ lleva a una alteración en la EMC. En este estudio utilizamos modelos de animales transgénicos que expresan htt con 94 polyQ (Hdh94) y una línea neuronal proveniente de animales “knock-in” que expresan htt con 111 polyQ (StHdhQ111), comparados con normales que no exceden de 7 repeticiones. Nos propusimos estudiar si la expresión de htt anómala afecta la EMC, a través de la expresión y distribución de proteínas asociadas a las VCCs, y si htt interactúa en forma directa con componentes de la maquinaria endocítica. Por Western blot demostramos que la mutación de htt afecta la distribución de AP-2 (proteína de cubierta de las VCCs) en cuerpo estriado de animales Hdh94 y en las células StHdhQ111, pero no la de otras proteínas (sindapina y AP180) de las VCCs. También observamos (mediante la captación de transferrina-Alexa 568) que la mutación de htt afecta la actividad endocítica (mediada por VCCs) de las células. Además, por ensayos de co-inmunoprecipitación demostramos que htt interactúa con alguna subunidad de AP-2 y que esa interacción se pierde por la mutación. Concluimos que htt es un componente crucial en la maquinaria endocítica y podría actuar como regulador de la formación de la cubierta de las VCCs.

#### 511. (198) LOBULO PREFRONTAL: VALORES DE SUPERFICIES EN IMÁGENES PARASAGITALES DE RESONANCIA MAGNÉTICA EN RELACIÓN AL SEXO Y A LA EDAD

Merlo A.<sup>1</sup>; Albanese A.<sup>2</sup>; Gómez E.<sup>3</sup>; Miño J.<sup>4</sup>; Albanese E.<sup>5</sup>

Facultad De Medicina USAL<sup>1 2 3 5</sup>; Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>4</sup>  
amerlo@salvador.edu.ar

En trabajos previos mostramos variaciones con la edad de superficies y longitudes en el lóbulo prefrontal (LPF) y otras zonas del cerebro, que complementan estudios de la bibliografía que utilizan volúmenes. **Objetivo:** determinar por sexo y rangos de edad valores de superficies del LPF en imágenes parasagitales de resonancia magnética (IPRM). Con el programa Scion Image for Windows se procesaron IPRM del LPF de 38 casos femeninos y 40 masculinos diestros de 41 a 84 años sin enfermedades neurológicas o psiquiátricas. En la imagen del LPF de cada hemisferio se trazaron 3 ángulos adyacentes de 60 grados con vértice en el extremo anterior del cuerpo calloso y cuyos lados cortaban el borde del LPF. Se midió la zona de cerebro comprendida en cada uno de los 3 sectores circulares, dorsal (D), medio (M) y ventral (V). Se calculó la media±ES por sexo y rango de edad. En el LPF derecho las superficies femeninas de 41-60 años de D, M y V son 5.87±0.17; 4.59±0.16; 4.88±0.19 cm<sup>2</sup> y las masculinas 6.97±0.49; 5.43±0.32; 5.60±0.22 cm<sup>2</sup> y las correspondientes izquierdas 5.53±0.28; 4.32±0.19; 4.46±0.21 y 6.53±0.38; 5.06±0.30; 5.40±0.25 cm<sup>2</sup>. Entre sexos las diferencias son significativas ( $p < 0.01$ , ANOVA). En el LPF derecho las superficies femeninas de 61-84 años resultaron en 4.55±0.23; 3.89±0.16; 4.25±0.20 cm<sup>2</sup> y las masculinas en 4.51±0.37; 3.74±0.31; 4.75±0.22 cm<sup>2</sup> y las correspondientes izquierdas 4.30±0.17; 3.42±0.16; 4.20±0.16 cm<sup>2</sup> y 4.03±0.31; 3.56±0.21; 4.30±0.19 cm<sup>2</sup>. Entre 61 y 84 años las superficies son menores ( $p < 0.01$ , ANOVA) a las del grupo más joven y no difieren significativamente entre sexos. Los coeficientes de correlación entre edad y superficies son negativos. **Conclusión.** Las superficies del LPF en el rango de 41-60 años, son mayores en el grupo masculino. En ambos sexos en el rango de 61-84 años los valores caen significativamente pero la caída es mayor en el grupo masculino cuyos valores, en ese rango de edad no difieren de los femeninos.

#### 512. (298) EFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA

Katunar M.<sup>1</sup>; Adrover E.<sup>2</sup>; Baier J.<sup>3</sup>; Pallarés M.<sup>4</sup>; Saez T.<sup>5</sup>; Brusco A.<sup>6</sup>; Antonelli M.<sup>7</sup>  
IQUIFIB Facultad De Farmacia Y Bioquímica. UBA.<sup>1 2 3 4 7</sup>;  
IBCyN Facultad De Medicina. UBA<sup>5 6</sup>  
mariakatunar@yahoo.com.ar

Numerosos estudios han demostrado que ratas preñadas expuestas a diferentes tipos de estrés durante la última semana de gestación dan origen a crías que presentan severas anomalías en el desarrollo y morfología neuronal, afectando, entre otros, al sistema de neurotransmisión dopaminérgico. En nuestro laboratorio observamos que el estrés prenatal incrementa el número de receptores dopaminérgicos de tipo D2, en áreas límbicas, así como también disminuye los niveles de dopamina (DA) en corteza prefrontal (PFC) luego de un estímulo con anfetamina. Se han identificado dos factores de transcripción Nurr1 y Pitx3, los cuales son expresados en momentos claves de la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas y se ha reportado que ambos factores tendrían a su cargo regular la expresión y/o actividad de TH (tirosina hidroxilasa), enzima clave en la síntesis de DA. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se analizó el nivel de expresión de dichos factores y de TH en cortes de mesencéfalo de ratas estresadas prenatalmente (EP) a 7, 28 y 60 días postnatales (DPN). Paralelamente se evaluó la actividad de TH empleando el inhibidor NSD1015 como medida indirecta de la actividad. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo de la actividad enzimática en NAc, estriado y PFC a los 28 DPN. Resulta interesante resaltar que las ratas EP mostraron una acumulación de L-DOPA en condiciones basales. Asimismo, se analizó el estado funcional del transportador de dopamina, DAT, pudiéndose observar una mayor eficiencia del transportador en NAc y estriado a los 28DPN y un incremento significativo solo en NAc a los 60DPN. Los resultados hallados ponen en evidencia que las experiencias pre y/o perinatales son capaces de generar

modificaciones duraderas en varios puntos críticos del metabolismo dopaminérgico, las cuales podrían estar relacionadas con la aparición de desórdenes de tipo comportamental o enfermedades psiquiátricas durante la adolescencia o la adultez.

**513. (518) PREGNANOLONA SULFATO MODULA POSITIVAMENTE DIFERENTES SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN HIPOTALÁMICOS INVOLUCRADOS EN EL CONTROL DE LA LIBERACIÓN DE LH EN LA RATA HEMBRA.**

Bazzocchini V.<sup>1</sup>; Escudero C.<sup>2</sup>; Cerioni S.<sup>3</sup>; Nanfaro F.<sup>4</sup>; Giuliani F.<sup>5</sup>; Yunes R.<sup>6</sup>; Cabrera R.<sup>7</sup>  
*IMBIOMED-FCS-UM; IMBECU-CONICET*<sup>1 2 3 4 5 7</sup>; *IMBIOMED-FCS-UM; FCM-UNCUYO; IMBECU-CONICET*<sup>6</sup>  
 vanesa.bazzocchini@um.edu.ar

Previamente comprobamos que Pregnanolona Sulfato (Preg-S) posee un efecto neuromodulador positivo sobre la secreción de LH, el cual no sería mediado a nivel del receptor NMDA. Por otra parte la administración previa de Bicuculina produjo una inhibición de LH proponiendo que Preg-S tendría una fuerte acción moduladora positiva sobre el sistema GABAérgico en un sitio diferente a GABA<sub>A</sub>. El objetivo de este trabajo fue estudiar los posibles mecanismos neuroquímicos involucrados en la actividad moduladora de Preg-S administrada intracerebroventricularmente (icv) sobre la secreción de LH. Se utilizaron ratas hembras adultas Sprague-Dawley ovariectomizadas impregnadas con estrógeno (25µg/rata) y progesterona (1mg/rata) (n=7), canuladas en 3° ventrículo (icv) para la administración de drogas: LCR, Preg-S 25uM, CNQX 10uM (antagonista no NMDA), Saclofen (Sac) 1mM (antagonista GABA<sub>B</sub>), Clonidina (Clo) 1uM (antagonista α<sub>2</sub>), Prazosín (Pra) 0,1mM (antagonista α<sub>1</sub>). Grupos: a)LCR, b)Preg-S, c)CNQX, d)CNQX+Preg-S, e) Sac, f)Sac+Preg-S, g)Clo+Preg-S, h)Pra+Preg-S. Los animales fueron sacrificados a las 20 hs, pico máx. de la liberación de LH. Los resultados se expresaron como la media ± SEM de LH (ng/ml), y analizados estadísticamente por t de Student. Se observó una inhibición significativa de la secreción de LH cuando se administraron previo a Preg-S, Clo (5,23±1.22 vs 26,02±3 p<0,001) y Pra (6,04±1,5 vs 26,02±3 p<0,0004), no así cuando se le administró Sac (37,4±5,35 vs 26,02±3 p=0,0742). Se observó aumento de LH cuando se administró previo a Preg-S, CNQX (44,1±6,3 vs 26,02±3 p=0,0172). Concluimos que Preg-S modifica la secreción de LH mediante la modulación de la funcionalidad de receptores α<sub>1</sub> y α<sub>2</sub> estimulando su liberación, así como también sobre el sistema de receptores glutamatérgicos no NMDA, sin modificar la funcionalidad de los GABA<sub>B</sub>, lo cual propone a este neuroesteroide como activo modulador multisistémico neuroendócrino sobre el sistema reproductivo en la rata hembra.

## ENDOCRINOLOGIA 6

**514. (324) EL TRANSPORTE DE INSULINA AL MITOPLASTO ES DEPENDIENTE DE LA DEGRADACIÓN MITOCONDRIAL**

Cresto J.<sup>1</sup>; Camberos M.<sup>2</sup>; Cao G.<sup>3</sup>; Martucci L.<sup>4</sup>  
*Centro de Investigaciones Endocrinológicas*<sup>1 2 4</sup>; *Anatomía Patológica, Htal. de Niños "P. Elizalde"*<sup>3</sup>  
 jcresto@cedie.org.ar

**Objetivos:** En estudios previos observamos que la degradación limitaba la disponibilidad de insulina para su incorporación en mitocondrios, por lo tanto estudiamos el transporte y la degradación de insulina para determinar el grado de interacción. **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%, <sup>125</sup>I-insulina (10<sup>5</sup> cpm) e insulina fría a tiempos y dosis variables. La reacción se detuvo con N-etilmaleimida 2 mM y los mitocondrios (M) se aislaron de la membrana externa y espacio intermembrana con digitonina. La degradación se determinó con TCA 5%, cromatografía en Sephadex G50 y anticuerpos específicos. **Resultados:** A 25°C la degradación fue mínima y la insulina se acumuló en M. A esta

temperatura la interacción EDI-insulina y mitocondrio puede ser analizada como una reacción bimolecular, donde ambos complejos reaccionan independientemente siguiendo una cinética de 2do. orden (constante k, control: 0.496; IDE: 0.336, control+Bacitracin: 0.681; IDE+Bacitracin 0.523; control+DNP: 0,505; IDE+DNP: 0,548). A 30°C la acumulación de insulina en M fue menor y la degradación en el buffer de incubación fue total. Esto es, toda la insulina fue degradada en forma casi instantánea. Diez mil ng de insulina saturaron parcialmente el transporte pero no la degradación en el buffer de incubación. N-etilmaleimida 0,1 mM e insulina hasta 10000 ng incrementaron el transporte a M sin modificar la degradación en el buffer de incubación. 1 mM de N-etilmaleimide asociado a 10000 ng de insulina logró disminuir la degradación en el buffer de incubación (control: de 87 a 56%, EDI: de 84 a 62%). **Conclusión:** la magnitud y velocidad de la degradación es el mecanismo regulador en la incorporación de insulina al mitocondrio.

**515. (757) PERFIL DE EXPRESIÓN DE ARNM DE RECEPTORES HORMONALES Y TIROSINA HIDROXILASA EN HIPOTÁLAMO DE RATAS CONTROLES E HIPERTIROIDEAS AL FINAL DE LA GESTACIÓN Y EN LACTANCIA TEMPRANA**

Pennacchio G.<sup>1</sup>; Ayala C.<sup>2</sup>; Carreño N.<sup>3</sup>; Jahn G.<sup>4</sup>; Valdez S.<sup>5</sup>  
*IMBECU CCT-CONICET-Mendoza*<sup>1 2 3 4</sup>; *Instituto De Ciencias Básicas UNCUYO*<sup>5</sup>  
 gpennacchio@mendoza-conicet.gov.ar

Las patologías tiroideas provocan trastornos en la fertilidad femenina, parto prematuro y falla en la lactancia. El hipertiroidismo (HiperT) adelanta la luteólisis, altera la secreción de PRL y bloquea la eyección láctea en ratas. Las hormonas tiroideas (HTs) mediante sus receptores (RT) podrían afectar la regulación neuroendócrina de PRL modificando los niveles de receptores (R) hipotalámicos. Se determinó la expresión de los RT, tirosina hidroxilasa (TH: enzima limitante de la síntesis de dopamina, principal inhibidor de PRL), RPRL y R de progesterona (RP<sub>4</sub>) en hipotálamo de ratas Wistar controles (Co) e HiperT (T<sub>4</sub> 0.25 mg/kg/día s.c) en los días 20, 21 de gestación (G20 y G21) y 2 de lactancia (L2) a las 12 hs (n=8). Los resultados se correlacionaron con el perfil de PRL y P<sub>4</sub>. La expresión de los R y TH se determinó por PCR en tiempo real respecto al gen S16 y las hormonas por RIA. La TH cayó al final de la gestación en las Co mientras que en las HiperT se mantuvo alta (TH CoG20 1,00±0,16 vs CoG21 0,53±0,09 p<0,05; HiperTG20 1,28±0,28, G21: 1,55±0,30, L2 1,10±0,04). No hubo cambios en RTα siendo más abundante que el RTβ. En las HiperT el RTβ1 disminuyó en G21 (G21Co 1,14±0,21 vs G21HiperT 0,043±0,019, p<0,05) y G20HiperT (1,86±0,23, p<0,001). En L2 el RTβ2 aumentó más en las HiperT que en las Co (G20Co 1±0,40 vs L2Co 3,30±0,65 p<0,05; G20HiperT 0,48±0,06 vs L2Co 4,8±0,81 p<0,001). El RPRL aumentó en L2 en ratas Co e HiperT (G21Co: 0,62±0,12 vs L2Co: 1,49±0,18, p<0,05; G21HiperT: 1,01±0,12 vs L2Co: 2,15±0,09 p<0,001). La isoforma B del RP<sub>4</sub> aumentó en G21 en las HiperT (G21Co 0,58±0,20 vs G21 HiperT 1,67±0,03, p<0,01) y cayó en L2. El patrón de expresión de los RT sugiere una función fisiológica diferencial durante la gestación y lactancia. En las ratas HiperT el aumento de RP<sub>4</sub> en G21 y de RPRL en G21 y L2 podría contribuir a la expresión elevada de TH, indicativo de un tono dopaminérgico elevado, comprometiendo la secreción de PRL durante la lactancia.

**516. (767) DEFECTOS DE ORGANIFICACION DEL YODO. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES DE TPO Y DUOX2.**

Belforte F.<sup>1</sup>; Olcese C.<sup>2</sup>; Citterio C.<sup>3</sup>; Miras M.<sup>4</sup>; Chiesa A.<sup>5</sup>; Gruñeiro-Papendieck L.<sup>6</sup>; Gonzalez Sarmiento R.<sup>7</sup>; Targovnik H.<sup>8</sup>; Rivolta C.<sup>9</sup>  
*Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*<sup>1 2 3</sup>; *Servicio de Endocrinología, Hospital de Niños Santísima Trinidad, Córdoba.*<sup>4</sup>; *Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez.*<sup>5 6</sup>; *Unidad de Medi-*

*cina Molecular, Dto. de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca*<sup>7</sup>; *Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; Unidad de Medicina Molecular, Dto. de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca*<sup>8, 9</sup>  
fiorellabelforte@hotmail.com

Los defectos de organificación de yodo representan el 10% de los casos de hipotiroidismo congénito, el cual posee una prevalencia de 1/2500 y un modo de herencia autosómico recesivo. En el presente trabajo se extendió la búsqueda inicial de nuevas mutaciones en los genes de tiroperoxidasa (TPO) y dual oxidasa 2 (DUOX2) en una población de 40 pacientes con diagnóstico de hipotiroidismo congénito, bocio y test de descarga de perclorato positivo. Se amplificaron por PCR el promotor y los 17 exones de TPO, los 33 exones de DUOX2 y sus regiones intrónicas flanqueantes. Los productos fueron analizados por SSCP y aquellos con migración diferencial fueron secuenciados. Dos mutaciones: p.R396fsX472 en TPO y p.A1088fs1100 en DUOX2 fueron evidenciadas por clonado en el vector pGEM-T y por RFLP empleando las enzimas Nae I y BsaH1 respectivamente. Se procedió al análisis bioinformático predictivo de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas mutadas y a la exploración del grado de conservación evolutiva de las mismas en distintas especies. En el gen de TPO se identificó un paciente doble heterocigota para la mutación conocida 1187insGGCC; p.R396fsX472 (exón 8) y para una nueva mutación: c.1874G>A;p.R595K(exón 11). Se identificó en otro paciente una nueva mutación heterocigota c.2332G>A;p.V748M (exón13) junto con una variante rara de secuencia g.IVS13-17C>T. Adicionalmente se hallaron 4 polimorfismos, 3 nuevos: g.-605C>T (promotor), g.IVS2-30G>A, g.IVS4+31C>A y uno descripto: c.2545T>C; p.V847A. En DUOX2 se identificó una nueva mutación heterocigota c.3264\_327delCA-GC; p.A1088fs1100 (exón 24) y dos variantes raras de secuencia: g.IVS27+9C>T (Intrón 27) y c.3042G>A;p.A1014A (exón 24) en pacientes no relacionados. Las técnicas de biología molecular empleadas constituyen una herramienta útil para la comprensión de la fisiopatología del hipotiroidismo neonatal. Por otra parte contribuirán al diagnóstico temprano y al adecuado asesoramiento genético a las familias afectadas.

#### 517. (780) GENOTIPIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MARCADOR MICROSATÉLITE EN EL GEN DEL RECEPTOR BETA DE HORMONAS TIROIDEAS

*Olcese M.*<sup>1</sup>; Belforte F.<sup>2</sup>; Citterio C.<sup>3</sup>; Targovnik H.<sup>4</sup>; Rivolta C.<sup>5</sup>

*Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>  
escorpiocecily@yahoo.com.ar

Los microsatélites (short tandem repeats o STR) son secuencias repetitivas de ADN en las que la unidad de repetición tiene entre 2 y 5 pb. Dichos loci se heredan en forma mendeliana y son altamente polimórficos. Las características citadas hacen que estas secuencias actúen como marcadores ideales para realizar "pruebas de ligamiento", en las cuales se analiza la herencia conjunta de la enfermedad y un alelo particular de un determinado microsatélite en un grupo familiar cerrado. Así, los marcadores microsatélites se emplean con fines de diagnóstico indirecto de enfermedad hereditaria. En el presente trabajo se caracterizó un STR cuya unidad de repetición es (TC) al que denominamos THRbRi7 hallado en el intrón 7 del gen del Receptor Beta de Hormonas Tiroideas (THRb). El mismo fue amplificado por PCR usando primers flanqueantes a partir del ADN genómico de individuos controles no relacionados. Los productos fueron visualizados mediante electroforesis en gel desnaturalizante de poli(acrilamida). Se identificó el número de alelos presentes en la población analizada (N:155), la frecuencia de cada alelo, el porcentaje de heterocigosis (HET) y el índice de contenido polimórfico (PIC). Con el objeto de establecer el origen de la variabilidad entre los diferentes alelos, se procedió al clonado en pGEM-T y a la secuenciación de los productos de amplificación obtenidos a partir

de individuos de nuestra población. THRbRi7 resultó polimórfico presentando 7 variantes alélicas. El HET presentó un valor de 0.868 y el PIC fue de 0.645. Se pudo establecer la co-segregación del loci polimórfico con mutaciones previamente estudiadas en el gen del THRb en familias con Resistencia Generalizada a Hormonas Tiroideas. El marcador caracterizado contribuirá al asesoramiento genético de familias con defectos en el gen de THRb no caracterizados. Será de interés el futuro empleo del mismo para la elaboración de haplotipos y estudios de asociación con patología tiroidea autoinmune.

#### 518. (809) ANORMALIDAD EN EL TRANSPORTE DE HORMONAS TIROIDEAS. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES DE LA GLOBULINA TRANSPORTADORA DE TIROXINA Y DE LA TRANSTIRETINA.

*Olcese M.*<sup>1</sup>; Belforte F.<sup>2</sup>; Citterio C.<sup>3</sup>; Papendieck P.<sup>4</sup>; Guñeiro-papendieck L.<sup>5</sup>; Chiesa A.<sup>6</sup>; Sklate R.<sup>7</sup>; Maccallini G.<sup>8</sup>; Niepomnische H.<sup>9</sup>; Targovnik H.<sup>10</sup>; Rivolta C.<sup>11</sup>

*Cátedra de Genética y Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA*<sup>1, 2, 3, 10, 11</sup>; *Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET, División Endocrinología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez*<sup>4, 5, 6</sup>; *Endocrinología, Departamento de Medicina, Hospital Tornú*<sup>7</sup>; *Laboratorio, Hospital Durand*<sup>8</sup>; *División de Endocrinología, Hospital de Clínicas-UBA, Buenos Aires*<sup>9</sup>.  
escorpiocecily@yahoo.com.ar

La globulina transportadora de tiroxina (TBG) y la transtiretina (TTR) transportan el 75% y 20% de tiroxina (T<sub>4</sub>) respectivamente. El gen de TBG mapea en el cromosoma X. Mutaciones en el mismo son responsables de distintos fenotipos dentro de los cuales encontramos la Deficiencia Completa de TBG (TBG-CD), una rara enfermedad con un patrón de herencia ligado al cromosoma X. El gen de TTR mapea en el cromosoma 18. Mutaciones en dicho gen originan variantes con afinidad alterada por T<sub>4</sub> con un patrón de herencia autosómico dominante. Dos familias argentinas con diagnóstico bioquímico de TBG-CD fueron analizadas (Familia 1 y 2). En una de ellas (Familia 2) como consecuencia de la discordancia entre los valores de hormonas tiroideas totales, libres y el valor de TSH se sospechó de una segunda alteración en otra proteína transportadora. La radioelectroforesis de proteínas de unión a T<sub>4</sub> mostró que la TTR unida a T<sub>4</sub> estaba aumentada significativamente. Con el objeto de identificar las mutaciones responsables de patología, se amplificaron por PCR los 5 exones del gen de TBG en ambas familias y los 4 exones del gen de TTR en la Familia 2. Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados. En aquellos casos en los que las alteraciones identificadas no se encontraban descritas se realizaron los estudios poblacionales correspondientes por la técnica de SSCP. Una nueva mutación heterocigota g.IVS1+2delT en el gen de TBG fue identificada en la paciente de la Familia 1 siendo heredada de su madre. El paciente de la Familia 2 portó una nueva mutación en el gen de TBG, una transversión hemocigota c.251C>A; p.A64D y una mutación descripta en el gen de TTR, una transición heterocigota c.385G>A; p.A109T la cual aumenta la afinidad por T<sub>4</sub>. Se describen aquí dos nuevas mutaciones en el gen de TBG y por primera vez dos mutaciones simultáneas en dos proteínas de unión a T<sub>4</sub>. El análisis molecular contribuye al diagnóstico preciso y a la comprensión de las bases de la fisiopatología tiroidea.

### METABOLISMO Y NUTRICION 4

#### 519. (217) ALTERACIONES DE CARGA SUPERFICIAL ERITROCITARIA POR ACCIÓN IN VITRO DE LA GLUCOSA

*Lerda N.*<sup>1</sup>; D'arrigo M.<sup>2</sup>; Riquelme B.<sup>3</sup>  
*Grupo de Óptica Aplicada a la Biología; IFIR ;CONICET; UNR*<sup>1, 2, 3</sup>  
darrigomabel@yahoo.com.ar

La glicosilación no enzimática (GnoE) de proteínas se considera uno de los mecanismos fundamentales en la génesis de las complicaciones micro y macrovasculares de la Diabetes. La GnoE

podría modificar parámetros hemorreológicos eritrocitarios tales como agregación, deformabilidad y propiedades viscoelásticas de membrana del glóbulo rojo. El objetivo de este trabajo fue estudiar la acción de soluciones de glucosa sobre la carga aniónica eritrocitaria (CAE), utilizando como herramienta el reparto en sistema bifásico acuoso (Dextran T500 6.20%, Polietilenglicol 6000 4.40%), el análisis digital de imágenes, el Eritroagregómetro y el Eritrodefómetro en muestras de eritrocitos de dadores normales e incubadas *in vitro* con soluciones de glucosa al 0.2 g/dl, 0.5 g/dl y 1 g/dl en PBS pH 7.4. En el reparto los eritrocitos son retenidos en la fase superior acorde a la CAE, calculándose el coeficiente de reparto P. se estudio la morfología de los agregados eritrocitarios (ASP). Con un Eritroagregómetro se determinó el tiempo que las células requieren para alcanzar el 50 % de su capacidad máxima de agregación ( $t_{50\%}$ ) y con el Eritrodefómetro se analizaron las posibles alteraciones en el Índice de Deformabilidad eritrocitario (ID). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Medias y desvíos estándar de determinaciones de reparto (P),  $t_{50\%}$ , ID

Cc. glucosa (g/dL)	P %	ASP	$t_{50\%}$ (s)	ID
0	85 ± 2	0.58	3.3 ± 0.2	0.57 ± 0.01
0.2	80 ± 2	0.74	3.2 ± 0.2	0.58 ± 0.01
0.5	75 ± 2	0.80	3.8 ± 0.2	0.58 ± 0.01
1.0	66 ± 3	0.86	3.1 ± 0.2	0.57 ± 0.01

Los valores de P y de ASP significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ) en las muestras incubadas con glucosa, respecto de las muestras sin tratar, evidenciarían alteraciones de CAE que podrían ser asociadas a un proceso de glicosilación no enzimática. No se observaron variaciones significativas en el  $t_{50\%}$  ni en ID. A partir de los resultados obtenidos, esta metodología podría contribuir a estudiar y comprender en parte, los mecanismos involucrados en las alteraciones hemorreológicas observadas en los pacientes diabéticos bajo mal control metabólico.

#### 520. (230) GLP-1 COMO MEDIADOR DEL EFECTO EJERCIDO POR LEPTINA SOBRE LA TRH DIENCEFÁLICA.

Burqueño A.<sup>1</sup>; Rosselli M.<sup>2</sup>; Gonzales Mansilla N.<sup>3</sup>; Sookoian S.<sup>4</sup>; Pirola C.<sup>5</sup>

Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas, Instituto de Investigaciones Medicas IDIM-CONICET<sup>1, 3, 5</sup>; Laboratorio de Hepatología Clínica y Molecular, Instituto de Investigaciones Medicas IDIM-CONICET<sup>2, 4</sup>

adriburque@gmail.com

El péptido similar a glucagon tipo 1 (GLP1), un potente secretagogo de insulina, es producido a nivel central, donde regula la ingesta de alimento y posiblemente la función cardiovascular. Por otra parte, hemos demostrado que el incremento de la expresión del gen de la TRH produce un aumento de la presión arterial sistólica (PA), fenómeno observado en diversos modelos animales, entre ellos las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y sometidos a ganancia de peso. Así, la leptina regula el balance energético, la ingesta de alimentos y la PA a través de un aumento de TRH, este efecto es mediado por la á-MSH. Proponemos que GLP1 sería un mediador del efecto estimulador de la leptina sobre TRH a nivel hipotalámico. Sometimos ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (n=37) y sus controles normotensos (WKY) (n=36) a 12 semanas de una dieta control y otra rica en grasas y evaluamos el peso corporal, la presión arterial, parámetros bioquímicos y la expresión hipotalámica de genes involucrados en esta vía mediante Real Time PCR. Como es de esperar el índice de insulino resistencia (HOMA) correlacionó con la PA (Spearman R=0.38  $p < 0.001$ ), debido a la elevación del HOMA en las SHR vs las WKY (media ± ES: 62.7 ± 3.3 vs 41.8 ± 3.4,  $p < 0.00005$ ). Obtuvimos una correlación significativa entre el nivel de expresión de TRH y el de GCG (glucagon, precursor de GLP1), R=0.7  $p < 0.000001$  y, como es de esperar, entre la

expresión de POMC (gen que codifica para á-MSH) y TRH, R=0.42  $p < 0.03$ . Además la expresión de GCG correlacionó positivamente con la ganancia de peso de los animales (R=0.48  $p < 0.00005$ ). Y la expresión de la isoforma larga del receptor de leptina (ObRb) correlacionó positivamente con TRH R=0.61  $p < 0.001$  y con GCG R=0.59  $p < 0.005$ . Estos resultados indican que la ganancia de peso induciría el sistema compensador de GLP1, el cual participaría en la interacción entre la TRH y la leptina a nivel central.

#### 521. (231) MASA PROTEICA DE UCP2 Y MARCADORES DE ESTRES OXIDATIVO EN TEJIDO ADIPOSO DE RATAS DISLIPÉMICAS. EFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS N-3 POLINOSATURADOS (PUFAS).

Selenscig D.<sup>1</sup>; Chicco A.<sup>2</sup>; Lombardo Y.<sup>3</sup>

Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición. Dpto. de Ciencias Biológicas. Fac. de Bioquímica y Cs. Biológicas. Unlitoral. Santa Fe<sup>1, 2, 3</sup>  
danselens@yahoo.com.ar

Se ha sugerido que la administración crónica de dietas ricas en carbohidratos simples favorece la generación de sustancias reactivas del oxígeno e induce estrés oxidativo. El objetivo del presente trabajo fue evaluar en tejido adiposo (TA) epididimal de ratas dislipémicas insulino resistentes por alimentación crónica (6-8 meses) con una dieta rica en sacarosa (DRS): 1) La masa proteica de la proteína desacoplante UCP2; 2) Las enzimas oxidantes y antioxidantes, contenido de glutatión y especies reactivas del ácido tiobarbitrico (TBARS). 3) El efecto del cambio de grasa dietaria: aceite de maíz (AM) por aceite de hígado de bacalao (AHB) rico en n-3 PUFAs sobre los parámetros antes mencionados. Ratas machos Wistar recibieron durante 6 meses DRS (62.5% sacarosa, 8% AM). Luego la mitad de los animales continuó con la DRS y en la otra mitad se sustituyó el AM por AHB 7% + AM 1% (DRS+AHB) hasta los 8 meses de ingesta. Ratas controles recibieron dieta control (DC) durante los 8 meses. Determinaciones: en plasma: glucosa, Tg, AGNE, e insulina inmunoreactiva. En TA: las actividades enzimáticas xantina oxido-reductasa (XOR), xantina oxidasa (XO), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión reductasa (GR); contenido de glutatión total (Gt) y oxidado (GSSG) y TBARS. Masa proteica de UCP2. Resultados: Las actividades CAT, GPx y GR disminuyeron significativamente en el TA del lote DRS incrementando las actividades XOR y XO, los metabolitos Gt, GSSG y TBARS respecto al lote DC. La administración de AHB normalizó la actividad CAT y mejoró las actividades GR, XOR y XO y el contenido de Gt. Asimismo, incrementó los TBARS y disminuyó la masa proteica de la UCP2. El AHB normalizó la dislipidemia presente en el grupo DRS y los niveles de glucemia sin cambios en la insulinemia. Estos resultados sugieren que en el TA las enzimas y metabolitos involucrados en el estrés oxidativo inducido por la DRS normalizan/mejoran cuando el AHB reemplazó al AM como fuente de grasa dietaria.

#### 522. (402) LA FOSFATASA ALCALINA INTESTINAL REGULA LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO IN VIVO.

Brun L.<sup>1</sup>; Alonso E.<sup>2</sup>; Vicente D.<sup>3</sup>; Rigalli A.<sup>4</sup>;

Laboratorio de Biología Ósea Facultad de Ciencias Médicas UNR<sup>1, 2, 3, 4</sup>  
brunlucas@arnet.com.ar

La vitamina D aumenta la expresión de proteínas de transporte de calcio (Ca) a nivel intestinal pero no es un mecanismo que puede actuar ante cambios transitorios del contenido de Ca de la dieta. La fosfatasa alcalina intestinal (FAi) podría cumplir este rol *in vivo*. Experimentos previos indicaron que el Ca se fija a la FAi produciendo modificaciones en su actividad y estructura. *In vitro* se demostró que la absorción intestinal de Ca disminuye y la actividad de FAi se incrementa al aumentar la concentración de Ca. La L-fenilalanina (Phe: inhibidor de FAi) aumentó el porcentaje de Ca absorbido. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la Phe sobre la absorción de Ca en ratas Sprague Dawley machos de 7 semanas. Los animales fueron alimentados con dietas con diferentes contenido de Ca (0.2%, 0.9% y 2%;



n=12/grupo) durante 30 días. Al final este período se determinó el porcentaje de Ca absorbido [ $\%Ca = (Ca \text{ ingerido} - Ca \text{ excretado en heces}) \times 100 / Ca \text{ ingerido}$ ] con y sin la coadministración de Phe en agua de bebida (16mM). La presencia de Phe produjo un aumento significativo en el % de absorción de Ca,  $\%Ca = 31,1 \pm 8,3$  vs  $\%Ca + Phe = 40,0 \pm 6,9$  independientemente de la dieta (T Student datos apareado  $p < 0,05$ ). El resultado corresponde a un incremento del 28%. Cuando se analizaron las ratas según el tipo de dieta recibida sólo se halló diferencia significativa en el grupo que recibió dieta hipercálcica (2%Ca),  $\%Ca = 3,2 \pm 0,5$  vs  $\%Ca + Phe = 21,76 \pm 2,8$ , que equivale a un aumento del 580%. Se concluye que la presencia de Phe aumenta la absorción de Ca y que el efecto es más evidente cuando las ratas reciben dieta hipercálcica. Este resultado indicaría que la coadministración de Phe podría mejorar la absorción de Ca en casos de administración terapéutica del catión. La falta de efecto en dietas hipo y normocálcicas se explicaría por el aumento fisiológico del mecanismo de absorción a cargo de la vitamina D.

**523. (427) COMPOSICION CORPORAL Y ABSORCION DE CALCIO EN RATAS GENETICAMENTE OBESAS, DURANTE EL CRECIMIENTO: INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE CALCIO DE LA DIETA**

Marotte C.<sup>1</sup>; Weisstaub A.<sup>2</sup>; Hernandez E.<sup>3</sup>; Gonzales Chaves M.<sup>4</sup>; Pellegrini G.<sup>5</sup>; Olguin M.<sup>6</sup>; Posadas M.<sup>7</sup>; Zeni S.<sup>8</sup>; Portela M.<sup>9</sup>

Sección Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas.<sup>1</sup>; Cát Nutrición y Bromatología, Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>2</sup>; Cát Bioquímica General y Bucal, Fac de Odontología, UBA; CONICET<sup>3</sup>; Universidad Nacional de Rosario<sup>4</sup>; Sección Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, UBA; Cát Bioquímica General y Bucal, Fac de Odontología, UBA; CONICET<sup>5</sup>; clarisa128@hotmail.com

**Objetivo:** Comparar, durante el crecimiento, el impacto de una dieta variable en calcio: baja (0.2%), normal (0.5%) o alta (0.9%) sobre la absorción aparente de calcio (Ca) y la composición corporal en un modelo experimental en ratas macho genéticamente obesas (IIMbb) y normales. **Metodología:** ratas adultas (IIMbb), alimentadas desde la preñez con dietas según AIN 93, variando Ca: 0.9 g% (GA), 0.5% (GN) o 0.2% (GB). Ratas Wistar alimentadas con dieta AIN 1993 fueron grupo control (Ca: 0.5%) (WN). Las crías macho recibieron "ad libitum" las dietas maternas hasta 50 días de edad (Tf). Se registró consumo de dieta y peso corporal (PC). Los 3 últimos días del período experimental, se recogieron las heces, calculando el porcentaje de absorción de Ca ( $\% \text{ de Abs} = [(Ingerido - Fecal) / Ingerido] \times 100$ ). Heces y dietas fueron mineralizadas con ácido nítrico en sistema de microondas, determinando Ca se midió por espectrofotometría de absorción atómica. A Tf se determinó, métodos AOAC, contenido corporal de: agua, grasa, proteínas, cenizas, Ca (absorción atómica) y fósforo (P) (método de Gomori). Resultados (promedio $\pm$ DE): peso corporal (g): GAVsGN (ns); GB >GA y WN < GB,GA y GN ( $p = 0,0005$ ). Absorción de Ca (%): GA:  $63,6 \pm 5,8$ ; GN:  $87,0 \pm 0,4$ ; GB:  $91,0 \pm 9,3$ ; WN:  $68,7 \pm 13,0$  ( $p < 0,0001$ ). Composición corporal (g/100g): agua: ns entre grupos; proteínas y lípidos: WN > GA, GN y GB ( $p < 0,0001$ ); cenizas: WN >GA > GN > GB ( $p < 0,0001$ ). Ca (mg/100g): GA:  $719,7 \pm 102,9$ ; GN:  $640,1 \pm 66,6$ ; GB:  $394,1 \pm 96,8$ ; WN:  $849,8 \pm 86,2$  ( $p < 0,0001$ ). P (mg/100g): GA:  $531,7 \pm 65,4$ ; GN:  $520,2 \pm 93,8$ ; GB:  $309,6 \pm 32,6$ ; WN:  $728,4 \pm 105,4$  ( $p < 0,0001$ ). Ca/P: GA:  $1,35 \pm 0,07$ ; GN:  $1,25 \pm 0,13$ ; GB:  $1,36 \pm 0,08$ ; WN:  $1,18 \pm 0,12$  ( $p = 0,0017$ ). **Conclusiones:** El bajo contenido de Ca de la dieta de las ratas IIMbb incrementó las diferencias en la absorción de Ca y en la composición corporal con las WN, especialmente en el contenido de grasa, cenizas, Ca, P y la relación Ca/P, que no fue compensada aumentando el contenido de Ca de la dieta.

UBACYT (2008-10) B 091.

**524. (211) ACCIÓN DEL EJERCICIO MODERADO CRÓNICO SOBRE LA MASA ÓSEA. ESTUDIO EXPERIMENTAL.**

Bryk G.<sup>1</sup>; Pietrelli A.<sup>2</sup>; Paglia N.<sup>3</sup>; Orzuza R.<sup>4</sup>; Zeni S.<sup>5</sup>; Basso N.<sup>6</sup>

Sección Osteopatías Médicas. Hospital de Clínicas. UBA, CONICET<sup>1</sup>; Departamento de Investigación, Fac. de Medicina, Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales (UCES); Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis", UBA, CONICET<sup>2</sup>; Departamento de Investigación, Fac. de Medicina, Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales (UCES); Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Prof. Alberto C. Taquini", UBA, CONICET<sup>3</sup>; Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, UBA-CONICET<sup>5</sup>; brykgabriel@hotmail.com

**Antecedentes:** El tejido óseo responde a procesos dinámicos de carga (actividad física) mayores a los realizados en la vida cotidiana iniciando y favoreciendo la osteogénesis, disminuyendo la glucosa (Glu), colesterol total (Col. T), LDL-colesterol, triglicéridos (TG) y aumentando la fracción HDL-colesterol. **Objetivo:** Investigar cambios en DMO y contenido mineral (CMO) en esqueleto total (ET) y subáreas por efecto del ejercicio aeróbico crónico en ratas. **Materiales y Métodos:** Ratas Wistar machos (200-300g) se asignaron aleatoriamente a entrenamiento aeróbico (EA) (N=8) ó control sedentario (CS) (N=8) desde los 2 hasta los 12 meses de edad en un "treadmill" motorizado para desarrollar rutina aeróbica: moderada intensidad y ajustes en carga en función del rendimiento, y la edad tratando de reproducir las adaptaciones cardiovasculares, respiratorias, metabólicas y a nivel de SNC para dicho entrenamiento. Al sacrificio (12 meses) se midió la composición corporal, CMO (g) y DMO (mg/cm<sup>2</sup>) (Small Animal Software, Lunar DPX) y en suero calcio (Ca), fósforo (P), fosfatasa alcalina ósea (FAO), Col-T, Glu y TG. **Resultados** (X $\pm$ SD): Ratas Cs vs. EA: CMO (g):  $13,4 \pm 1,4$  vs.  $16,6 \pm 0,8^*$ , DMOs (mg/cm<sup>2</sup>):  $342 \pm 80$  vs  $356 \pm 50$  ET,  $357 \pm 19$  vs  $400 \pm 23^*$  en Columna,  $290 \pm 25$  vs  $344 \pm 16^*$  en tibia distal; Grasa (%):  $28,3 \pm 3,9$  vs.  $11,8 \pm 3,5^*$ ; Peso Corporal (g):  $581 \pm 46$  vs.  $562 \pm 41$ ; Grasa (g):  $165,5 \pm 32,2$  vs.  $66,7 \pm 23,2^*$ ; Tej. Magro (g):  $415 \pm 26$  vs.  $495 \pm 31^*$ ; Col.T (mg/dL):  $121 \pm 6,8$  vs.  $115 \pm 7,8^*$ ; Glu (mg/dL):  $182 \pm 28$  vs.  $191 \pm 12$ ; (\*)  $p < 0,01$  EA vs. CS. **Conclusiones:** El ejercicio aeróbico modulado y regular mejoró significativamente la masa ósea y masa magra que, junto a disminución de masa grasa para un mismo peso corporal, sugiere la existencia de una correlación negativa entre tejido graso y osteogénesis.

Subsidio: Asociación de Fomento a la Investigación Científica (AFIC)

**525. (220) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AGUDA A PARTÍCULAS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN EL METABOLISMO DEL OXÍGENO EN PULMÓN**

Magnani N.<sup>1</sup>; Garcés M.<sup>2</sup>; Tasat D.<sup>3</sup>; Alvarez S.<sup>4</sup>; Evelson P.<sup>5</sup>

PRALIB - CONICET<sup>1</sup>; PRALIB-CONICET, Química General e Inorgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>2</sup>; Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad de San Martín<sup>3</sup>; nmagnani@ffy.uba.ar

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno están involucradas en la iniciación y la progresión de los efectos patológicos desencadenados por la exposición a partículas ambientales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el metabolismo oxígeno en pulmón de ratones en un modelo de exposición aguda a partículas ambientales (ROFA) mediante instilación intranasal (1,00 mg/kg peso). Se determinaron, luego de 1 h de exposición, el consumo de oxígeno tisular por una técnica polarográfica, la actividad de la NADPH oxidasa en homogeneizados de pulmón mediante la medida de la producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y del consumo de NADPH. En mitocondrias aisladas se determinó el consumo de oxígeno, la producción de NO espectrofotométricamente y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por fluorescence. La exposición a ROFA produjo un aumento del 66% del consumo de oxígeno del tejido (control:  $225 \pm 7$  ng-at O/min. g tej  $p < 0,01$ ); la inhibición por KCN fue de 59% para los controles, en tanto que para los tratados fue de 45%. En mitocondrias aisladas el consumo de oxígeno aumentó un 33% en el estado 3 o de respiración activa (control:  $107 \pm 4$  ng-at O/min. g tej  $p < 0,01$ ), sin observarse diferencias en el estado 4 o de reposo.

La actividad de la NADPH oxidasa mostró aumentos similares tanto al evaluarse la producción de  $O_2^-$  (25%) (control:  $0.72 \pm 0.02$  UA/mg. prot.  $p < 0.01$ ), como la velocidad de consumo de NADPH (32%) (control:  $0.82 \pm 0.09$  nmoles NADPH/min. mg. prot.  $p < 0.01$ ). La producción de  $H_2O_2$  no presentó diferencias significativas. La producción de NO se encontró aumentada en un 34% (control:  $1.03 \pm 0.07$  nmol NO/min. mg prot.,  $p < 0.005$ ) La inhalación de contaminantes particulados alteraría el metabolismo del oxígeno generando un aumento en la producción de especies oxidantes involucradas en los mecanismos moleculares de daño en el pulmón.

## TRANSDUCCION DE SEÑALES 5

### 526. (71) ROL DE EPAC (EXCHANGE PROTEIN ACTIVATED BY CAMP) EN LA PROTECCIÓN POR SALBUTAMOL (S, AGONISTA ADRENÉRGICO $\beta_2$ ) DE LA COLESTASIS POR ESTRADIOL 17- $\beta$ GLUCURONIDO (E) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR).

Zucchetti A.<sup>1</sup>; Barosso I.<sup>2</sup>; Ochoa E.<sup>3</sup>; Crocenzi F.<sup>4</sup>; Sanchez Pozzi E.<sup>5</sup>

Instituto de Fisiología Experimental IFISE CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario UNR<sup>1 2 3 4 5</sup>  
zucchetti@ifise-conicet.gov.ar

Vimos previamente que S modula el AMPc hepático y así previene de la colestasis por E de forma independiente de PKA y dependiente de microtúbulos (mt). Una vía de acción de AMPc independiente de PKA es vía Epac. En DAHR, se evaluó la prevención por Epac de la alteración funcional por E en los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2. También se comparó su acción preventiva con S y con glucagon (G, dependiente de PKA, independiente de mt). Se obtuvieron DAHR de ratas Wistar hembra adultas por perfusión con colagenasa y elutriación. Luego de 5h de cultivo se trataron con un agonista Epac (8-CPT-AMPc, 50  $\mu$ M, 15 min) y se co-trataron con S 10 $\mu$ M o G 1 $\mu$ M. Un grupo de preparaciones se pretrató 30 min con el inhibidor de mt colchicina (Col 1 $\mu$ M). Luego se incubó cada grupo experimental 20 min con E (50 $\mu$ M) o solvente. Finalmente, se expusieron 15 min a colil lisil fluoresceína (CLF 2 $\mu$ M, sustrato de Bsep) o clorometil fluoresceína diacetato (CMFDA 2,5  $\mu$ 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). Resultados (media $\pm$ SD): E redujo la cvaCLF y cvaGMF. Epac previno la reducción causada por E. Col inhibió la acción de Epac. Al contrario de G, S en conjunto con Epac no tuvo efectos aditivos ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ )

%CVA	Control	E	E-Epac	E-S	E-Epac-S	E-G	E-G-Epac	E-Col	E-Col-Epac
CLF	100 $\pm$ 0	49 $\pm$ 6a	78 $\pm$ 9b	77 $\pm$ 6b	74 $\pm$ 9b	74 $\pm$ 3b	92 $\pm$ 7c	63 $\pm$ 1a	64 $\pm$ 3a
GMF	100 $\pm$ 0	61 $\pm$ 2a	94 $\pm$ 3b	80 $\pm$ 4b	88 $\pm$ 5b	81 $\pm$ 4b	106 $\pm$ 2c	65 $\pm$ 5a	72 $\pm$ 3a

a difiere significativamente de control.

b difiere significativamente de control y de E.

c difiere significativamente de E, E-G, E-Epac.

**Conclusión:** al igual que S, Epac protege parcialmente de la alteración funcional por E por un mecanismo dependiente de mt. A su vez, sus acciones conjuntas no muestran un efecto aditivo. Esto sugeriría que S protege activando la vía Epac.

### 527. (193) ROL DE RSUME EN EL PROCESO TUMORIGÉNICO DE HIPÓFISIS

Fuertes M.<sup>1</sup>; Gerez J.<sup>2</sup>; Haedo M.<sup>3</sup>; Arzt E.<sup>4</sup>

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM), Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular, FCEN, UBA, IFIBYNE-CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
marianafuertes64@gmail.com

La patogénesis de los tumores de hipófisis es estudiada con frecuencia para identificar cambios que activen oncogenes o inactiven genes supresores de tumores. Pituitary tumor transforming

gene (PTTG) es un proto-oncogen que fue aislado de una línea tumoral de hipófisis de rata, participa del proceso tumorigénico hipofisario y se sobreexpresa en este tejido. La proteína RSUME, cuyo gen fue clonado en nuestro laboratorio, se encuentra sobreexpresada en tumores de hipófisis, es regulada por hipoxia (un proceso clave en tumorigénesis/vascularización) y actúa como enhancer de sumoilación. En este trabajo estudiamos si RSUME ejerce alguna regulación sobre PTTG durante el proceso tumorigénico hipofisario. Empleando células corticotrofas AtT20 y modelo COS7, por ensayos de transfección transiente con vectores de expresión de RSUME y PTTG, y detección de proteínas por Western blot, demostramos que RSUME aumenta la estabilidad proteica de PTTG en sus formas fosforilada (activa) y desfosforilada (inactiva). La depleción de RSUME por siRNAs específicos tiene el efecto opuesto. Por análisis *in silico* con el programa SUMOsp 2.0 determinamos que PTTG tiene un sitio hipotético de sumoilación en Lys168. Mediante ensayos de inmunoprecipitación de células tranfectadas con vectores de expresión de PTTG y SUMO-1, 2 o 3 se observó que PTTG es sumoilado y que RSUME modula positivamente la sumoilación. La sobreexpresión de factores positivos de sumoilación (SUMO-1, Ubc9) aumenta la estabilidad proteica de PTTG; mientras que los factores negativos de sumoilación (Senp-1 o GAM-1) la disminuyen; este efecto se revierte al sobreexpresar un dominante negativo de GAM-1 y se potencia por RSUME. Concluimos que la sumoilación de PTTG participa en los mecanismos que le confieren estabilidad a esta proteína, y RSUME potencia dicha modificación. La estabilidad de este proto-oncogen representa un importante punto de regulación del potencial patogénico de células hipofisarias por RSUME.

### 528. (511) ROL MODULADOR DE LOS LÍPIDOS DE MEMBRANA SOBRE LA VÍA DEGRADATIVA LISOSOMAL EN UROEPITELIO DE RATAS

Grasso E.<sup>1</sup>; Calderón R.<sup>2</sup>

Instituto de Biología Celular Facultad de Ciencias Médicas UNC<sup>1 2</sup>  
ejgrasso@hotmail.com

**Introducción.** El uroepitelio de la vejiga urinaria modifica su morfología durante los cambios de presión hidrostática ocurridos en el ciclo miccional. Dicho cambio se debe a la exocitosis de vesículas endocíticas citoplasmáticas (VE) que, durante la fase de llenado del ciclo, incrementan la superficie de las células uroteliales superficiales y, durante la fase de vaciado, se endocitan atrapando la fase fluida luminal. **Objetivo.** Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la composición lipídica de la membrana de VE en la vía degradativa lisosomal. **Metodología.** Tres grupos de ratas fueron sometidas a tratamientos dietarios diferenciados en su composición lipídica; uno enriquecido en el ácido graso 18:2n6, otro en 18:1n9 y un tercero tomado como control (alimento balanceado). El estudio de la vía lisosomal se realizó por microscopía de epifluorescencia y confocal siguiendo la endocitosis del fluoróforo acidotrópico, HPTS, y el marcador lisosomal LAMP1 en VE diferenciadas por el tratamiento dietario. La composición lipídica de las VE fue determinada por cromatografía gaseosa. **Resultados.** Se encontró una menor localización de HPTS y LAMP1 y un menor grado de acidificación en VE derivadas de 18:1n-9 en comparación con vesículas derivadas de control y 18.2n-6. Los estudios de la composición lipídica revelaron un incremento de ácidos grasos de cadena corta (16-18C) en VE derivadas de 18:1n-9. **Conclusión.** Los resultados encontrados indican el efecto modulador de la composición lipídica de la membrana sobre la acidificación del fluido endocitado y la ruta seguida por el mismo. Los resultados se relacionan con estudios previos de nuestro grupo que indicaron la alteración de la V-ATPasa de VE derivadas de 18:1n-9

### 529. (156) RSUME ES INDUCIDO EN HIPOXIA Y MODULA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE HIF-1

Gerez J.<sup>1</sup>; Fuertes M.<sup>2</sup>; Druker J.<sup>3</sup>; Haedo M.<sup>4</sup>; Paez-pereda M.<sup>5</sup>; Holsboer F.<sup>6</sup>; Silberstein S.<sup>7</sup>; Arzt E.<sup>8</sup>

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, Depto. de Fisiología Y Biología Molecular y Celular, FCEYN, UBA, IFIBYNE-CONICET, Argentina.<sup>1 2 3 4 7 8</sup>; Instituto Max Planck

de Psiquiatría, Munich<sup>5</sup>   
 juangerez@fbmc.fcen.uba.ar

HIF-1, el factor de transcripción principal en la respuesta adaptativa a hipoxia, esta compuesto por 2 subunidades; HIF-1 $\beta$ , de expresión constitutiva, y HIF-1 $\alpha$ , subunidad que en normoxia es reconocida por la E3 ligasa de Ubiquitina VHL para ser degradada por el proteosoma. En hipoxia este reconocimiento no ocurre, HIF-1 $\alpha$  se estabiliza y HIF-1 aumenta su actividad transcripcional. En trabajos previos demostramos que RSUME, una proteína que es inducida en hipoxia por acción directa de HIF-1, aumenta la estabilidad proteica de HIF-1 $\alpha$  aumentando consecuentemente la actividad transcripcional de HIF-1. En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares empleados por RSUME para aumentar la actividad transcripcional de HIF-1. En experimentos de transfección transiente, empleando células COS7 y vectores de expresión de RSUME y/o VHL demostramos que RSUME aumenta la estabilidad proteica de HIF-1 $\alpha$  a pesar de la sobreexpresión de VHL. Consistentemente con estos hallazgos, RSUME aumenta 300% la estabilidad del gen reportero ODD-LUC, en el cual el dominio ODD de HIF-1 $\alpha$  esta fusionado a la Luciferasa (p<0.05). Utilizando el gen reportero HRE-LUC demostramos que RSUME aumenta 10 veces la actividad transcripcional de HIF-1, y este efecto prevalece sobre el efecto negativo de VHL (p<0.01). Mediante ensayos de Ubiquitinación *in vivo* e *in vitro* y detección de proteínas por Western Blot demostramos que RSUME disminuye la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  mediada por VHL. Para estudiar los mecanismos por los cuales RSUME es inducido en hipoxia transfectamos una línea celular que carece de VHL con el gen reportero RSUME-LUC y VHL observando que VHL inhibe la expresión de RSUME reconfirmando la participación de HIF-1 en la inducción de RSUME por hipoxia. Concluimos que RSUME inhibe la función de VHL regulando negativamente la ubiquitinación de HIF-1 $\alpha$  y consecuentemente aumentando su estabilidad proteica, cumpliendo de esta manera un rol muy importante en la respuesta adaptativa a hipoxia.

### 530. (431) TRANSLOCACION Y ACTIVACION DE NNOS EN MITOCONDRIAS.

Elguero E.<sup>1</sup>; Finochietto P.<sup>2</sup>; Poderoso J.<sup>3</sup>; Carreras M.<sup>4</sup>   
 Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires,<sup>1</sup> <sup>2</sup>; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires; CONICET.<sup>3</sup>; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno y Depto. de Bioquímica Clínica-FFYB; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires; CONICET.<sup>4</sup>   
 eugeelguero@gmail.com

En 1998 descubrimos la presencia de nNOS en mitocondrias; mtNOS exhibe cambios postraduccionales como fosforilación en Ser1412 y acilación en NH2 terminal. Observamos que mtNOS depende de la actividad transcripcional nuclear y es regulada por hormonas (T3, insulina) contribuyendo al desarrollo de enfermedad metabólica. La presencia de nNOS en mitocondrias depende de los mecanismos de importe desde el citosol. El objetivo de este trabajo es evaluar la contribución de la quinasa Akt2 y de la proteasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>, calpaína 1, en el proceso de entrada de nNOS a mitocondria. Por microscopía confocal, se observó co-localización de nNOS en mitocondrias en el importe por transfección transiente de cDNA de nNOS a células HEK293 carentes de esta isoforma y en células HEK-nNOS (transfectadas estables con la enzima) co-transfectadas con un vector de YFP unido a una secuencia de localización mitocondrial. Experimentos *in vivo* y con transcripción-traducción *in vitro* (TTI) y anticuerpos específicos mostraron disminución del PM aparente de 157 a 130 kDa consecuente a la pérdida del dominio PDZ. En células HEK pre-tratadas con insulina, Akt estimulado *vía* PI3K aumentó la traslocación y el nivel mitocondrial de P-nNOS-Ser<sup>1412</sup> (0,52  $\pm$  0,04 control vs. 1,17  $\pm$  0,31 insulina) sin observar efecto significativo de Akt recombinante en TTI. En cambio, la activación de calpaína mitocondrial (por incubación con ionóforo de Ca<sup>2+</sup>) condujo al aumento de nNOS en la fracción mitocondrial *in vivo* (0,75  $\pm$

0,08 control vs. 1,67  $\pm$  0,11 ionóforo) y al clivaje de nNOS *in vitro* (calpaína) por corte en aa. 129-131, liberando el dominio PDZ (aa. 17-99). Se sabe que calpaína interacciona con Akt, nNOS y Hsp90 en citosol y por lo tanto proponemos una secuencia de estimulación de la traslocación de nNOS por activación de calpaína *vía* Ca<sup>2+</sup>, interacción calpaína-nNOS, clivaje de dominio PDZ N-terminal, importe de nNOS, fosforilación intramitocondrial por P-Akt y activación de mtNOS.

## GENETICA 4 Y MEDICINA REGENERATIVA 2

### 531. (182) ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DEL COMPLEJO TELOMÉRICO PROTECTOR EN MIELOMA MÚLTIPLE Y GAMOPATÍA MONOCLONAL DE SIGNIFICADO INCERTO

Panero J.<sup>1</sup>; Fantl D.<sup>2</sup>; Arbelbide J.<sup>3</sup>; Slavutsky I.<sup>4</sup>   
 Departamento de Genética, Academia Nacional de Medicina<sup>1</sup>; Servicio de Hematología, Hospital Italiano<sup>2</sup>;   
 jpanero@unq.edu.ar

El complejo telomérico protector o telosoma se encuentra conformado por seis proteínas (*TRF1*, *TRF2*, *POT1*, *TIN2*, *TPP1* y *RAP1*) esenciales en la preservación de la estabilidad cromosómica. Nuestro grupo demostró recientemente (Panero et al, *In press*) cambios en la expresión de *TRF1* y *TRF2*, asociados a sobreexpresión de *TANK1* (regulador positivo) y *hTERT* (subunidad catalítica de la telomerasa) en pacientes con mieloma múltiple (MM) y gamopatía monoclonal de significado incierto (MGUS). El objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de los genes *TIN2*, *TPP1*, *POT1* y *RAP1*, asociados a ensamblaje proteico y estabilidad telomérica, a fin de definir su participación en la disfunción telomérica presente en MM y MGUS. Se estudió mRNA de 20 pacientes con MM (8 mujeres; edad media: 69 años) y 16 con MGUS (14 mujeres; edad media: 65 años), mediante PCR en tiempo real con metodología TaqMan. El análisis de los perfiles de expresión no mostró diferencias respecto de los controles ni entre patologías (Tabla1), observándose en MM asociación entre *TPP1-RAP1* (p=0,004).

Tabla 1. Perfiles de expresión (X $\pm$ DS) en pacientes y controles

Grupo (n)	<i>TIN2</i>	<i>POT1</i>	<i>TPP1</i>	<i>RAP1</i>
Normal (14)	2,20 $\pm$ 1,17	0,04 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,30	0,26 $\pm$ 0,20
K562	0,48 $\pm$ 0,12	0,27 $\pm$ 0,16	0,52 $\pm$ 0,27	0,29 $\pm$ 0,05
MGUS (16)	2,41 $\pm$ 2,20	0,009 $\pm$ 0,008	0,67 $\pm$ 0,70	0,17 $\pm$ 0,12
MM (20)	2,63 $\pm$ 1,79	0,04 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,33	0,29 $\pm$ 0,23

La correlación con los genes previamente estudiados, mostró asociación positiva de la expresión de *TPP1* y *RAP1* con *TRF2* y *TANK1* (p<0,008) en MM, y de *POT1-TRF2*, *TIN2-TANK1* y *TPP1-TANK1* (p<0,04) en MGUS. No se observó correlación con *hTERT*. La homogeneidad detectada en los niveles de expresión de *RAP1*, *TIN2*, *TPP1* y *POT1*, sustentan una participación indirecta de estos genes en la disfunción telomérica presente en MM y MGUS. La correlación de *POT1* y *RAP1* con *TRF2* y la asociación de *TIN2* y *TPP1* con *TANK1* indicarían una interacción entre reguladores positivos y negativos en el mantenimiento de la estructura y longitud telomérica en desórdenes a células plasmáticas.

### 532. (263) GEN HÍBRIDO "PATCHWORK ALFA 212" EN PACIENTES CON ALFA-TALASEMIA. ASOCIACIÓN CON UNA NUEVA DELECCIÓN HBA1:C.187DELG (P.W63FSX67)

Scheps K.<sup>1</sup>; Francipane L.<sup>2</sup>; Bismans A.<sup>3</sup>; De Paula S.<sup>4</sup>; Freigeiro D.<sup>5</sup>; Varela V.<sup>6</sup>   
 Cátedra de Genética y Biología Molecular, FFYB, UBA<sup>1</sup>;   
 División Genética, Hospital de Clínicas "José de San Martín"<sup>2</sup>; Servicio de Hematología, Hospital "J.M. Ramos Mejía"<sup>3</sup>;   
 Unidad de Hematología, Hospital "Ricardo Gutiérrez"<sup>4</sup>;   
 kscheps@ffyb.uba.ar

La  $\alpha$ -talasemia(tal) se produce por mutaciones en el *cluster* de  $\alpha$ -globina. Los genes HBA2 y HBA1 presentan un 97% de homología y son frecuentes procesos de recombinación genética que originan deleciones e inserciones. El Patchwork alfa 212 (P-212), es un gen híbrido que contiene secuencias de HBA1 dentro de HBA2. El objetivo fue determinar la frecuencia de P-212 en pacientes con fenotipo hematológico compatible con  $\alpha$ -tal y población normal. Se analizaron 180 muestras de ADN genómico provenientes de 100 individuos con  $\alpha$ -tal (genotipos: 28 con  $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$  y 72 con  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) y 80 controles: 62 con parámetros hematológicos normales (VCM > a 85 fl) y 18 portadores  $\beta$ -tal. A partir de la amplificación por PCR de HBA2 (1804 pb) digerido con TaqI, se realizó el *screening* por SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*); las muestras con movilidad electroforética anómala se secuenciaron y/o digirieron con ApaI. Se observó P-212 en 6 individuos (2 familias) del grupo con  $\alpha$ -tal: en una niña y su padre (ascendencia italiana) con genotipo  $\alpha^{P-212}/\alpha\alpha$  la secuenciación de los genes HBA2, HBA1 y HBB no mostró otra alteración que justificara el cuadro hematológico de tal; 4 afro-cubanos con drepanocitosis presentaron P-212: en una mujer (HbS/HbS), asociado a mutación previamente no descrita HBA1:c.187delG (p.W63fsX67), su hijo (HbS/HbA) con iguales alteraciones en el *cluster* a, una sobrina (HbS/HbA) asociado a  $-\alpha^{3.7}$  (genotipo  $\alpha^{P-212}/\alpha^{3.7}$ ) y un sobrino (HbS/HbA). No se detectó la presencia de P-212 en la población control. Este es el primer reporte de P-212 en nuestro medio; presenta baja frecuencia, similar a lo observado en otras poblaciones. En la primer familia, sería el determinante genético del fenotipo  $\alpha$ -tal. Estudios de expresión permitirán comprobar si su presencia modifica la cantidad de  $\alpha$ -globina. En la segunda, la asociación genotípica es compleja, P-212 y HBA1:c.187delG en 2 miembros, indicaría que las mutaciones están en *cis* y que esta nueva mutación se generó por un evento reciente, ya que no se observa en los otros miembros.

### 533. (507) ANÁLISIS DEL PERFIL DE EXPRESIÓN DE NUEVOS FACTORES PRONÓSTICO EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA

Travella A.<sup>1</sup>; Bezares R.<sup>2</sup>; Sánchez ávalos J.<sup>3</sup>; Slavutsky I.

Departamento de Genética Academia Nacional de Medicina<sup>1</sup>; Servicio de Hematología, Hospital Alvarez<sup>2</sup>; Servicio de Hematología, Instituto Fleming<sup>3</sup>  
anatr@rcc.coop

El análisis de los perfiles de expresión en leucemia linfocítica crónica (LLC) permitió identificar genes con expresión diferencial como *MCL1*, *LPL*, *CLLU1*, *SEPT10* y *ADAM29*. En este trabajo se evaluó su expresión en células mononucleares de sangre periférica de 43 pacientes con LLC (24 varones; edad media: 67 años; rango: 39-83 años; estadios Rai: 0:22%, I-II:59%, III-IV:19%), y 8 controles normales (CN). Se empleó PCR en tiempo real utilizando SybrGreen con *GAPDH* como gen de referencia, y el *CLLU1* ProfileQuant Kit (Ipsogen). Se efectuó análisis citogenético y citomolecular. El 74% de los casos presentaron alteraciones genómicas: cariotipo anormal (29%), +12 (10%), del13q14 (45%), del11q22 (10%), del17p13 (7,5%). Se observó sobreexpresión de *SEPT10* en el 21% de los casos, *ADAM29* (61%), *MCL1* (75%), *LPL* (79%) y *CLLU1* (92%). El análisis de los datos permitió dividir los pacientes en grupos con diferentes niveles de expresión (Tabla 1).

Tabla 1. Expresión génica (X $\pm$ DS) en LLC y CN

Grupo (n)	Expresión	SEPT10	ADAM29	MCL1	LPL	CLLU1
CN (8)		221,6 $\pm$ 120,1**	17,2 $\pm$ 12,9	2,7 $\pm$ 0,3	0,06 $\pm$ 0,02**	0,009 $\pm$ 0,0001*
	Baja	65,6 $\pm$ 10,6f&	4,3 $\pm$ 1,1f&	0,6 $\pm$ 0,3f&	0,8 $\pm$ 0,3f&	0,3 $\pm$ 0,1f&
LLC (43)	Intermedia			8,2 $\pm$ 0,8	6,7 $\pm$ 1,3	18,8 $\pm$ 7,6
	Alta	844,6 $\pm$ 276,5	176,2 $\pm$ 5,4 <sup>f</sup>	185,3 $\pm$ 88,7 <sup>f</sup>	536,6 $\pm$ 326,6	212,5 $\pm$ 58,2

Diferencias significativas respecto de pacientes: \*p<0,01 y \*\*p<0,05; de CN: # p<0,05; f& entre grupos: pd<sup>0</sup>,05-0,01.

Se observó correlación positiva entre los niveles de expresión de *SEPT10* y *ADAM29* (p=0,03) y entre *LPL* y *CLLU1* (p=0,003). La correlación con los parámetros clínicos mostró asociación entre los niveles de *LPL* y el recuento de linfocitos (p<0,0001), y de *SEPT10* con hemoglobina (p=0,04) y plaquetas (p<0,001). No se encontró asociación con los rearrreglos genómicos. Nuestros datos reflejan la heterogeneidad característica de la LLC. Las modificaciones en los patrones de expresión génica y su asociación con los factores pronóstico, sugieren la participación de estos genes en el desarrollo y/o progresión de la patología.

### 534. (610) DESARROLLO DE ANTICUERPO INHIBIDOR DEL FACTOR VIII (FVIII) PACIENTES CON HEMOFILIA A (HA) SEVERA: FACTORES GENÉTICOS

Zuccoli J.<sup>1</sup>; Rossetti L.<sup>2</sup>; Szurkalo I.<sup>3</sup>; Radic P.<sup>4</sup>; Candela M.<sup>5</sup>; Larrira I.<sup>6</sup>; De Brasi C.<sup>7</sup>

Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
johannazuccoli@hotmail.com

La HA es una coagulopatía hereditaria causada por defectos en el gen del FVIII (*F8*). Actualmente, la HA es tratada por sustitución del FVIII deficiente. El desarrollo de anticuerpos neutralizantes (inhibidor) torna ineficiente la terapia sustitutiva e impacta los costos del tratamiento y la calidad de vida de los pacientes. El desarrollo de inhibidor se ve influido por factores ambientales, los relacionados a la terapia, y factores genéticos, siendo el tipo de mutación causal el de mayor importancia. Objetivo: caracterizar los factores genéticos que predisponen a desarrollar inhibidor. Se caracterizó la mutación causal en un total de 164 pacientes con HA severa mediante un programa de análisis del *F8* desarrollado por nosotros. Fueron estudiados tres polimorfismos potencialmente modificadores del riesgo a desarrollar inhibidor: TNFA -308 G/A (A: alto riesgo, HR), CTLA4 -318 C/T (T: HR) y CTLA4 -49 A/G (G: HR). En una población no sesgada de 120 HA severas se detectó inhibidor en 34 pacientes (28%). De acuerdo al tipo y ubicación del defecto causal se clasificaron tres grupos de riesgo: (a) riesgo alto (con 10/16, 62%) con deleciones de más de 1 exón (5/8) y defectos *nonsense* en la cadena liviana del FVIII (5/8); (b) riesgo intermedio (27%, 24/87) con defectos *nonsense* en la cadena pesada del FVIII (3/7), *frameshift-ins/del* (5/18), la inversión del intrón 22 (*Inv22*) (14/57, 24%), defectos de *splicing* (1/2) y deleciones de 1 exón (1/3); y (c) bajo riesgo (0/17), con mutaciones *in-frame-ins/del* (0/1), la inversión del intrón 1 (0/2) y defectos *missense* (0/14). En la población de 164 pacientes con HA severa, el análisis de asociación de los alelos de CTLA4 SNP -318, CTLA4 SNP -49 y TNFA SNP -308 no indicó diferencias significativas en contraste con datos de series europeas. En conclusión, nuestros resultados indican que el tipo y ubicación de la mutación causal de HA severa en el *F8* es un factor genético determinante para el desarrollo de inhibidor en nuestra población.

### 535. (596) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE REMODELADORES DE LA CROMATINA EN CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Luzzani C.<sup>1</sup>; Solari C.<sup>2</sup>; Losino N.<sup>3</sup>; Barañao L.<sup>4</sup>; Miriuka S.<sup>5</sup>; Guberman A.<sup>6</sup>

Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en el Crecimiento, Supervivencia y Diferenciación Celular, Química Biológica, FCEyN, UBA<sup>1 2 3 4 6</sup>; Laboratorio de Biología Celular del Desarrollo, FLEN<sup>5</sup>  
carlosluzzani@hotmail.com

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 múltiples tipos celulares de interés. Durante la diferenciación ocurren cambios en la organización de la cromatina a nivel global y de *loci* específicos. Por otra parte, en los últimos años se ha logrado reprogramar células terminalmente diferenciadas, obteniéndose células con propiedades similares a las CME. La obtención de estas células, llamadas Células Madre Pluripotentes Inducidas (CMPI), se ve favorecida al utilizar ácido valproico, un inhibidor de deacetilasas

de histonas (HDACs) o cuando se sobreexpresan componentes de complejos remodeladores de la cromatina. 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 éstas, a su vez, podrían modular la expresión de los primeros. El objetivo de este trabajo es estudiar la participación de factores remodeladores de la cromatina en el mantenimiento del estado indiferenciado, durante la diferenciación y en la generación de CMPI. Mediante RT-qPCR estudiamos la expresión génica de algunas acetilasas de histonas, HDACs, metiltransferasas y demetilinas de histonas en CME en estado indiferenciado y durante su diferenciación y en CMPI. Encontramos que el perfil de expresión de los factores analizados en CMPI es similar al de CME y que éstos varían con la diferenciación, sugiriendo que la regulación de la expresión de estos factores es crítica. Por último, diseñamos un sistema lentiviral de silenciamiento génico de algunos de dichos remodeladores y probamos su efectividad en un sistema heterólogo. Este sistema servirá para estudiar la relevancia de dichos remodeladores en el mantenimiento del estado indiferenciado y en los procesos de diferenciación y desdiferenciación celular.

## REPRODUCCION 5

### 536. (24) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA Y BETA Y SU PARTICIPACIÓN EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES EN EL TESTÍCULO FETAL DE LA VIZCACHA (*LAGOSTOMUS MAXIMUS*)

Gonzalez C.<sup>1</sup>; Muscársel Isla M.<sup>2</sup>; Leopardo N.<sup>3</sup>; Vitullo A.<sup>4</sup>

Centro de Estudios Biomédicos Biotecnológicos Ambientales y Diagnóstico CEBBAD Universidad Maimónides<sup>1 2 3 4</sup>  
gonzalez.candela@maimonides.edu

La ontogenia de la proliferación de células germinales (CG) en el testículo en desarrollo de mamíferos no ha sido completamente dilucidada. Recientemente ha sido descrito que el número de CG podría estar controlado en parte por los estrógenos testiculares. Estos actúan a través de dos tipos de receptores: receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ) y beta (RE $\beta$ ). El objetivo de este trabajo fue analizar la morfometría testicular (MT) y establecer un patrón de expresión del antígeno nuclear de proliferación (PCNA), RE $\alpha$  y RE $\beta$  junto con marcadores de CG (OCT-4, VASA) mediante inmunohistoquímica/inmunofluorescencia en testículos fetales de vizcacha, *Lagostomus maximus*, clasificados en tres estadios (temprano (Te), medio (Me) y tardío (Ta)) según el grado de desarrollo. La MT mostró un aumento significativo en el volumen de los cordones seminíferos en testículos Ta respecto de Te y Me (Te: 51.0 $\pm$ 1.4%, Me: 44.1 $\pm$ 9.1%, Ta: 63.2 $\pm$ 0.6%, p<0.05). El porcentaje de CG positivas para PCNA aumentó significativamente en testículos Me y Ta respecto de Te (Te: 79.1 $\pm$ 2.8, Me: 88.2 $\pm$ 1.7, Ta: 87.1 $\pm$ 5.3, p<0.05). Se detectó OCT-4 en CG en las tres etapas estudiadas siendo su porcentaje mayor en testículos Ta respecto de Te y Me (Te: 35 $\pm$ 8.1, Me: 45 $\pm$ 11.2, Ta: 95 $\pm$ 5.3, p<0.05). Más aún, PCNA co-localizó con VASA en CG de los tres estadios. La expresión de RE $\alpha$  fue detectada en las CG y células de Leydig (CL) durante todo el desarrollo testicular mientras que no se detectó la presencia de RE $\beta$  en CG pero sí en CL. Además, se co-localizó RE $\alpha$  y VASA en CG de los tres estadios. En conclusión, las CG de vizcacha exhibirían un patrón característico de expresión de OCT-4 y el incremento en el número de CG observado en testículos Ta reflejaría el aumento observado en los cordones seminíferos en esta etapa. La expresión de PCNA junto con el aumento en el número de CG podría estar influenciado por los estrógenos testiculares que actuarían vía el RE $\alpha$  en testículos fetales de embriones Ta de *Lagostomus maximus*.

### 537. (48) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA 2 Y LA SÍNTESIS DE 15D-PGJ2 POR FSH Y TESTOSTERONA EN CÉLULAS DE SERTOLI DE HÁMSTERES DORADOS ADULTOS REPRODUCTIVAMENTE

### INACTIVOS POR EXPOSICIÓN A FOTOPERÍODO CORTO

Matzkin M.<sup>1</sup>; Pellizzari E.<sup>2</sup>; Calandra R.<sup>3</sup>; Cigorruga S.<sup>4</sup>; Frungieri M.<sup>5</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET; Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 5</sup>; Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CONICET<sup>2 4</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET<sup>3</sup>  
maeugmatzkin@hotmail.com

Previamente, hemos descrito el efecto estimulador ejercido por testosterona (T) sobre la expresión de ciclo-oxigenasa 2 (COX2) y la síntesis de prostaglandinas (PGs) en células de Leydig de hámster Dorado; así como también, la participación de las PGs en la regulación de la producción de T. En el presente trabajo se investigó la presencia de COX2/PGs en las células de Sertoli (CS) y posibles mecanismos de regulación de este sistema. Se utilizó como modelo experimental hámsteres Dorados adultos expuestos a un fotoperíodo corto de 6h de luz por día durante 16 semanas. Dicha fotorrestricción desencadena una drástica caída en los niveles circulantes de LH, FSH y T y una marcada regresión testicular. Se cultivaron CS aisladas a partir de estos animales durante 48hs en condiciones basales. La incubación de estos cultivos con FSH (100ng/ml) y T (1mM) durante 1h aumentó significativamente la expresión de COX2, analizada por Western blot, y la producción de 15d-PGJ2, analizada por inmunoensayo (Control: 107.16 $\pm$ 10.05, T: 913.98 $\pm$ 51.12\*, FSH 550.41 $\pm$ 34.15\*, fmol/mg prot, X $\pm$ ESM, n=3, \* P<0.05). Asimismo, dichos estímulos produjeron un incremento en la fosforilación de erk1/2 analizado por Western blot. Se demostró la expresión del receptor de andrógenos y de PPAR $\gamma$  (receptor nuclear de 15d-PGJ2) por RT-PCR e inmunohistoquímica en estas CS. Por otra parte, se observó que 15d-PGJ2 inhibe y que FSH estimula significativamente la incorporación de glucosa en CS (Control: 172.60 $\pm$ 10.76, 15d-PGJ2: 143.24 $\pm$ 4.44\*, FSH: 266.24 $\pm$ 13.49\*, dpm/mg ADN; X $\pm$ ESM, n=3, \* P<0.05). En su conjunto los resultados sugieren la presencia del sistema COX2/PGs en CS, su regulación por FSH y T, y la activación de erk1/2 por ambas hormonas. Adicionalmente, las acciones observadas en la incorporación de glucosa sugieren que el sistema COX2/PGs estaría involucrado en la regulación fisiológica de las CS en este modelo experimental.

### 538. (88) LA ACTIVACIÓN DE PPAR $\alpha$ REGULA EL METABOLISMO DE LA CÉLULA DE SERTOLI.

Regueira M.<sup>1</sup>; Riera M.<sup>2</sup>; Galardo M.<sup>3</sup>; Pellizzari E.<sup>4</sup>; Cigorruga S.<sup>5</sup>; Meroni S.<sup>6</sup>

CEDIE CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
mregueira@gmail.com

Se ha postulado que la célula de Sertoli (CS) utiliza la oxidación de ácidos grasos (AG) para obtener energía. Adicionalmente se sabe que CS metaboliza activamente la glucosa convirtiéndola en lactato, principal fuente energética de las células germinales (CG). El factor de transcripción PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$ ), de expresión variable en distintos tipos celulares, ha sido relacionado con la inducción de genes involucrados con la oxidación de AG, en particular con la expresión de carnitina palmitoil- transferasa 1 (CPT1). El objetivo de este trabajo fue estudiar la regulación del metabolismo de la CS por PPAR $\alpha$ . Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados en condiciones basales (B) o bajo estímulo con FSH (100ng/ml) en presencia o ausencia del activador farmacológico de PPAR $\alpha$  WY 14643 (WY, 100 $\mu$ M) por 48 hs. Se analizaron la producción de lactato, la incorporación de 2-desoxiglucosa-<sup>3</sup>H (2-DOG) y los niveles de ARNm de CPT1, GLUT1 y LDH A por Northern Blot. Se observó que WY incrementa tanto en condiciones basales como bajo estímulo con FSH la producción de lactato (B: 9.30 $\pm$ 0.37<sup>a</sup>; WY: 12.7 $\pm$ 0.1<sup>b</sup>; FSH: 15.27 $\pm$ 0.46<sup>c</sup>; FSH+WY: 20.57 $\pm$ 1.56<sup>d</sup>  $\mu$ g/ $\mu$ gADN; X $\pm$ DS; n=3) y la incorporación de 2-DOG (B: 444,19 $\pm$ 40.02<sup>a</sup>; WY: 840.48 $\pm$ 166.62<sup>b</sup>; FSH: 696.14 $\pm$ 95.32<sup>b</sup>; FSH+WY: 1186.14 $\pm$ 86.44<sup>c</sup> dpm/ $\mu$ gADN; X $\pm$ DS; n=3). Letras distintas significan diferencias significativas; p<0.05. Los incrementos en la producción de lactato

y en la incorporación de glucosa se acompañan con un aumento en la expresión de GLUT1 y LDH A. Adicionalmente se observó que WY aumenta la expresión de CPT1. Los resultados obtenidos sugieren que la activación de PPAR $\alpha$  en CS estimula la oxidación de AG y simultáneamente la producción de lactato con el fin de asegurar la fuente energética de las CG. (PIP 2008 N°806; PICT 2007 N°1004)

**539. (132) INFLUENCIA DE ACIDOS GRASOS EN LA DIETA SOBRE EL TESTICULO DE UNA LINEA DE RATAS OBESAS Y DIABETICAS TARDIAS**

Vázquez S.<sup>1</sup>; Gutiérrez S.<sup>2</sup>; Gayol M.<sup>3</sup>; Hisano N.<sup>4</sup>  
*Cátedra de Histología y Embriología, FCM, UNR<sup>1</sup><sup>4</sup>; Cátedra de Biología, FCM, UNR<sup>2</sup><sup>3</sup>*  
 noriyuki40@gmail.com

Suplementos dietarios naturales disminuyen la glicemia y sus efectos oxidativos. Estudiamos el efecto de una dieta con el agregado de semillas de Chía (*Salvia hispánica-L*, ricas en omega 3) ó girasol (*Helianthus annuus-L*) (ricos en omega 6) sobre la histología testicular de ratas de la línea  $\beta$  (obesas y diabéticas tardías). Ratas macho de la línea  $\beta$  desarrolladas y criadas en el Bioterio de la Cátedra de Biología de la FCM de la UNR (n=15) fueron alimentadas desde los 21 días de edad con alimento balanceado comercial, incorporando a los 220 días: 1.-semillas de Chía (C + CH) (n=5) 2.- semillas de girasol(C + G) (n=5), como suplementos dietarios. 3.- Otro grupo  $\beta$  control (n=5) continuó con alimento balanceado comercial (C). A los 300 días de edad se realizó la eutanasia. Los testículos fueron disecados y fijados en líquido de Carnoy y refijados en formaldehído al 4% en PBS, luego se procesaron con técnicas histológicas de rutina y coloreados con H-E. Los preparados se visualizaron en un microscopio Leitz. Glicemia basal (C): 1.61  $\pm$  0.03 g/l; (C+CH): 1.35  $\pm$  0.08 g/l; (C+G): 1.48  $\pm$  0.05 g/l. El grupo control (C) presentó túbulos con bordes irregulares con masa celular intraluminal con signos de apoptosis. En el grupo (C+CH) se observó espacios intercelulares en el epitelio seminífero, túbulos regulares con acúmulo intraluminal de células con apoptosis, células germinales en distintos estadios de la espermatogénesis y luz tubular con presencia de espermatozoides. Los animales  $\beta$  (C+G) presentaron vacuolización del epitelio seminífero, túbulos muy irregulares con espacios intercelulares manifiestos, escasos espermatozoides, imágenes compatibles con apoptosis. En ratas obesas y diabéticas tardías que consumieron una dieta rica en omega 6 (girasol) mostraron mayores alteraciones histológicas testiculares que las ratas diabéticas a controles y las alimentadas con Chía.

**540. (134) HISTOLOGIA EPIDIDIMARIA EN UNA LINEA DE RATAS OBESAS Y DIABETICAS TARDIAS CON INGESTA DE ACIDOS GRASOS**

Tardivo A.<sup>1</sup>; Vázquez S.<sup>2</sup>; Gutiérrez S.<sup>3</sup>; Gayol M.<sup>4</sup>; Hisano N.<sup>5</sup>  
*Cátedra de Histología y Embriología, FCM, UNR<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>5</sup>; Cátedra de Biología, FCM, UNR<sup>3</sup><sup>4</sup>*  
 noriyuki@cimero.org.ar

Se ha estudiado que los suplementos dietarios naturales disminuyen la glicemia y sus efectos oxidativos. Estudiamos el efecto de una dieta con el agregado de semillas de chía (*Salvia hispánica-L*, ricas en omega 3) y girasol (*Helianthus annuus-L*) (rico en omega 6) sobre la histología epididimaria de ratas de la línea  $\beta$  (obesas y diabéticas tardías). Ratas macho de la línea  $\beta$  (n=15) fueron alimentadas desde los 21 días de edad con alimento balanceado comercial, incorporando a los 220 días: 1.-semillas de Chía (C + CH) (n=5) 2.- semillas de girasol(C + G) (n=5), como suplementos dietario. 3.- Otro grupo  $\beta$  considerado control (n=5) se continuó con alimento balanceado comercial (C). A los 300 días de edad los animales se sacrificaron con halotano y CO<sub>2</sub>. Los epidídimos fueron disecados y fijados en formaldehído al 4% en PBS, luego fueron procesados con técnicas histológicas de rutina y coloreados con H-E. Los preparados se visualizaron en un microscopio Leitz. Glicemia basal (C): 1.61  $\pm$  0.03 g/l; (C+CH): 1.35  $\pm$  0.08 g/l; (C+G): 1.48  $\pm$  0.05 g/l. Trigliceridemia:

(C): 3.96  $\pm$  0.23 g/l, (C+CH): 1.26  $\pm$  0.02. (C+G):1.01  $\pm$  0.10 g/l. La descripción histológica se refiere principalmente la región caudal del epidídimo: El grupo control (C) presentó en general túbulos con escasa cantidad de espermatozoides, plasmocitos y cuerpos amiláceos. En el grupo (C+CH) se observó túbulos con mediana cantidad de espermatozoides, algunos cuerpos amiláceos. Los animales  $\beta$  (C+G) con contenido escasos de espermatozoides, y muchos túbulos sin espermatozoides y abundantes plasmocitos y cuerpos amiláceos. En ratas de la línea  $\beta$  diabéticas y obesas tardías con una dieta rica en omega 6 (girasol) se manifiestan mayores alteraciones histológicas epididimarias que en las ratas a alimentadas con semillas de chía y controles.

**541. (235) CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LA HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROFINA (CRH) EN CÉLULAS DE LEYDIG DEL HÁMSTER DORADO**

Rossi S.<sup>1</sup>; Calandra R.<sup>2</sup>; Frungieri M.<sup>3</sup>  
*Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME- CONICET<sup>1</sup><sup>2</sup>; Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME- CONICET; Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA.<sup>3</sup>*  
 soledadrossi3@hotmail.com

Previamente, hemos descripto que la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), a través de receptores CRHR1, inhibe la producción de testosterona en el testículo del hámster Dorado. El objetivo del presente trabajo ha sido investigar la/s vía/s de señalización intracelular/es asociadas a la acción de CRH 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 CRH determinándose, luego de 3hs de incubación, la expresión de c-jun y c-fos (PCR cuantitativa), y los niveles de fosforilación de P42/44, P38, JNK46/54 y c-jun (Western blot, Wb). CRH (1 $\mu$ M) no alteró la fosforilación de P38, pero inhibió (P<0.05) la expresión de c-fos y c-jun (PCR cuantitativa, densitometría, valor arbitrario asignado al control=1, c-fos=0.64 $\pm$ 0.04, c-jun= 0.26 $\pm$ 0.02) y la fosforilación de MAPKs (Wb, densitometría, control=1, fosfo-c-jun=0.62 $\pm$ 0.05, fosfo-P44=0.60 $\pm$ 0.05, fosfo-P42=0.42 $\pm$ 0.04, fosfo-JNK54=0.63 $\pm$ 0.04 y fosfo-JNK46=0.30 $\pm$ 0.02). Por otra parte, el agregado de CRH a células de Leydig incubadas en presencia de un inhibidor de fosfatasa de tirosinas, el ortovanadato sódico (van), redujo (P<0.05) la fosforilación de MAPKs (ver Tabla) y la producción de testosterona (pmol/millón de células de Leydig, van=14.64 $\pm$ 0.44 vs van+CRH=11.52 $\pm$ 0.36).

Tabla: Wb, densitometría (valores arbitrarios)

	fosfo-P42	fosfo-P44	fosfo-JNK54	fosfo-JNK46
van	1	1	1	1
van + CRH	0.11 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.005	0.31 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.002

En conclusión, este trabajo describe un efecto estimulador ejercido por CRH sobre la actividad de fosfatasa de tirosinas, y la consiguiente disminución en la fosforilación de P42/44 y JNK46/54, que participaría en la inhibición de la síntesis de testosterona desencadenada por CRH en células de Leydig del hámster.

**542. (254) POSIBLE PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) EN LA REGULACIÓN POR LACTATO (L) DE LAS CÉLULAS GERMINALES TESTICULARES (CG).**

Galardo M.<sup>1</sup>; Riera M.<sup>2</sup>; Regueira M.<sup>3</sup>; Pellizzari E.<sup>4</sup>; Cigranga S.<sup>5</sup>; Meroni S.<sup>6</sup>  
*CEDIE-CONICET<sup>1</sup><sup>2</sup><sup>3</sup><sup>4</sup><sup>5</sup><sup>6</sup>*  
 mngalardo@cedie.org.ar

La espermatogénesis ocurre en un microambiente constituido principalmente por productos de secreción de las células de Sertoli tales como el L, sustrato energético de las CG. Previamente demostramos que en CG el L regula la expresión del transportador de monocarboxilatos 2 (MCT2) y la lactato deshidrogenada C

(LDH C), proteínas involucradas en su propia metabolización. En células musculares se demostró que el L incrementa las ROS y la expresión de genes regulados por ROS. La posibilidad que L pueda ejercer un efecto similar en CG no ha sido aún analizada. El objetivo de este trabajo fue evaluar si L incrementa ROS y la participación de ROS en la regulación por L de señales de transducción y de la expresión génica. Se utilizaron CG (espermatoцитos y espermátides) aisladas de testículos de rata de 31 días de edad. Las CG fueron cultivadas en condiciones control (C), en presencia de L 20mM y de L combinado con N-acetil-cisteína (NAC) 2mM que neutraliza las ROS. Los niveles de ROS se evaluaron por ensayo de TBAR determinando los niveles de malondialdehído (MDA), los niveles de PKB- y p38MAPK- fosforiladas (P) se determinaron por Western blot y los niveles de MCT2 y LDH C por Northern blot. Observamos que el L, al igual que el agua oxigenada, aumenta los niveles de MDA (C:  $0.56 \pm 0.06$ , L:  $0.92 \pm 0.10$ ,  $H_2O_2$  500 $\mu$ M:  $1.25 \pm 0.13$  pmoles MDA/ $\mu$ g proteína/30min,  $X \pm DS$ ,  $n=3$ ,  $p < 0.05$ ). Asimismo, se vio que L incrementa los niveles de PKB-P y p38MAPK-P (PKB-P:  $1.7 \pm 0.2$  y p38MAPK:  $1.8 \pm 0.2$  veces de estímulo respecto a C,  $X \pm DS$ ,  $n=3$ ). Al combinar L con NAC se observó un efecto inhibitorio en las señales activadas por L (PKB-P:  $0.7 \pm 0.1$  y p38MAPK-P:  $1.1 \pm 0.1$ ) y en la expresión de genes regulados por L a las 24 hs (MCT2; L:  $2.2 \pm 0.3$  vs L+NAC:  $1.3 \pm 0.2$ ) (LDH C; L:  $3.1 \pm 0.3$  vs L+NAC:  $2.5 \pm 0.2$ ). Los resultados sugieren que L en CG produce un aumento de ROS y pone en marcha una respuesta celular que conduce a una mayor eficiencia en su metabolización. (PIP 2008 N° 806; PICT 2007 N° 1004).

**543. (270) ONTOGENIA DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES PARA ESTRÓGENOS Y ANDRÓGENOS Y ACTIVIDAD PROLIFERATIVA EN EL TESTÍCULO DE YACARÉ OVERO.**

Durando M.<sup>1</sup>; Zayas M.<sup>2</sup>; Galoppo G.<sup>3</sup>; Stoker C.<sup>4</sup>; Rodríguez H.<sup>5</sup>; Ramos J.<sup>6</sup>; Luque E.<sup>7</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>8</sup>  
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
mdurando@fcb.unl.edu.ar

El yacaré overo posee determinación sexual termodependiente. De huevos incubados a 33°C de temperatura (T°), nacen 100% de crías machos. La administración de estrógenos (E) *in ovo* revierte el efecto de la T° evidenciando la importancia que tiene, para su dinámica poblacional, la exposición a xenoestrógenos. En este trabajo, establecimos la ontogenia del receptor de E alfa (RE), receptor de andrógenos (RA) y evaluamos la actividad proliferativa del testículo. En gónadas de yacaré machos de 10, 90 y 365 días (d) de edad, cuantificamos la proliferación celular (PCNA) y la expresión de RE en las células intratubulares (basales -B- y luminales -L-), también describimos el patrón de expresión de RA. Mediante inmunofluorescencia doble estudiamos la colocalización de PCNA y VASA (proteína específica de células germinales) y demostramos que las células germinales proliferan en las tres edades evaluadas. La proliferación celular fue máxima a los 90d, tanto en células B ( $83,7 \pm 9,5$ ) como L ( $83,8 \pm 10,2$ ), siendo significativamente mayor que a los 10d (B:  $29,3 \pm 5,7$ ;  $p < 0,01$ ; L:  $48,2 \pm 5,7$ ;  $p < 0,05$ ) y 365d (B:  $50,1 \pm 4,6$ ;  $p < 0,05$ ; L:  $43,7 \pm 6,4$ ;  $p < 0,05$ ). En 90d observamos una elevada expresión de RE en las células B ( $30,0 \pm 1,8$ ) que fue significativamente mayor que a los 10d ( $16,3 \pm 2,2$ ;  $p < 0,01$ ) y 365d ( $18,4 \pm 1,9$ ;  $p < 0,05$ ). El RA presentó un patrón diferencial según la edad: a los 10d se expresó mayoritariamente en el citoplasma de las células intratubulares y con escasos núcleos (+) en el compartimiento extratubular; a los 90d aumentó el número de núcleos (+) de células intratubulares como extratubulares; a los 365d sólo se observó una baja expresión en el citoplasma de las células intratubulares y no hubo núcleos (+) en el compartimiento extratubular. Los resultados demuestran una temprana actividad proliferativa de células germinales y la expresión de receptores para hormonas esteroides en la gónada de yacaré, sugiriendo que estos podrían mediar los efectos de la perturbación endocrina.

**544. (316) REGULACION POR CELULAS GERMINALES DE LA PRODUCCION DE CUERPOS CETONICOS EN CELULAS DE SERTOLI.**

Riera M.<sup>1</sup>; Regueira M.<sup>2</sup>; Galardo M.<sup>3</sup>; Pellizzari E.<sup>4</sup>; Meroni S.<sup>5</sup>; Cigorraga S.<sup>6</sup>  
CEDIE-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
frieria@cedie.org.ar

Se demostró previamente que las células de Sertoli (CS) producen cuerpos cetónicos, 3-hidroxibutirato y acetacetato, y que las células germinales (CG) expresan una de las enzimas encargada del metabolismo de los mismos. La producción de cuerpos cetónicos involucra al menos dos enzimas mitocondriales: la carnitina-palmitoil transferasa I (CPT I) y la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (mHMG-CoA sintasa). No se conoce hasta el momento cómo se regula la producción de cuerpos cetónicos en la SC. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de CG y de bFGF, factor de crecimiento producido por las CG, para regular la producción de cuerpos cetónicos y la expresión de CPT I y mHMG-CoA sintasa en CS. Cultivos de CS provenientes de ratas de 31 días de edad fueron mantenidos en condiciones basales y co-cultivados con CG aisladas de los mismos animales o estimulados con bFGF (30ng/ml). Se determinaron los niveles de 3-hidroxibutirato por un método espectrofotométrico y los niveles de ARNm de CPT I (isoforma L) y de mHMG-CoA sintasa por Northern blot. Se observó que la presencia de CG por 48hs aumenta la producción de 3-hidroxibutirato (Basal:  $8.1 \pm 1.4$ , CG/CS:  $19.1 \pm 3.2$  nmol/ $\mu$ g ADN;  $X \pm DS$ ,  $n=3$ ,  $*p < 0.01$ ) y la expresión de CPT I y de mHMG-CoA sintasa en CS. Por otro lado, se observó que no existe expresión de CPT I y de mHMG-CoA sintasa en CG. Adicionalmente, se observó que el tratamiento con bFGF por 72hs incrementa la producción de 3-hidroxibutirato (Basal:  $15.1 \pm 2.8$ , bFGF:  $22.3 \pm 1.8$  nmol/ $\mu$ g ADN;  $X \pm DS$ ,  $n=3$ ,  $*p < 0.05$ ) precedido por un aumento en la expresión de CPT I a las 24 hs. En su conjunto, los resultados sugieren que las CG regulan la producción de cuerpos cetónicos y la expresión de las enzimas involucradas en su síntesis en CS. Considerando que bFGF produce efectos semejantes a CG se postula que dicho factor de crecimiento mediaría, al menos en parte, el efecto de las CG. (PIP 2008 N° 806; PICT 2007 N° 1004)

**545. (374) ALTERACIONES EN GENITALES EXTERNOS DE YACARÉS OVEROS EXPUESTOS IN OVO A AGROQUÍMICOS.**

Zayas M.<sup>1</sup>; Durando M.<sup>2</sup>; Galoppo G.<sup>3</sup>; Stoker C.<sup>4</sup>; Rodríguez H.<sup>5</sup>; Luque E.<sup>6</sup>; Muñoz De Toro M.<sup>7</sup>  
Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas Universidad Nacional del Litoral<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
marcelozayas@hotmail.com

La detección de anomalías en el desarrollo de genitales externos en especies de la fauna y humanos ha aumentado en las últimas décadas. Estudios epidemiológicos y experimentales asocian este aumento a contaminantes ambientales con actividad de perturbadores endócrinos (PE). El yacaré overo (*Caiman latirostris*), habita zonas con altas probabilidades de contaminación por PE. Estudiamos el efecto de dos agroquímicos (clasificados como PE) sobre variables morfométricas del *phallus* (clítoris-pene) de yacaré juveniles. Huevos de yacaré incubados a temperatura productora de machos o de hembras, se topicaron, en el período de ventana para la determinación sexual, con Atrazina (ATZ; 0,2 ppm), Endosulfán (END: 20 ppm) o con etanol 100% (vehículo). Una vez nacidos los yacaré se criaron hasta juveniles (12 a 23 meses de edad) en condiciones controladas. Al sacrificio, se diseccionó la estructura clítoris-pene y se fijó en formol-buffer. Se realizaron estudios morfométricos en imágenes digitalizadas. Las medidas (mm) se expresan normalizadas por el peso del animal (g) x 1000. Mann-Whitney U test se usó para establecer diferencias. El largo del *phallus* es una variable sexualmente

dimórfica, significativamente mayor en machos que en hembras ( $9.94 \pm 1.01$  (n: 12) vs  $6.62 \pm 0.78$  (n: 12);  $p < 0.05$ ). En hembras, la exposición a ATZ y END produjo una disminución significativa en el largo del *phallus* [control:  $6.62 \pm 0.78$  (12); ATZ:  $3.21 \pm 0.21$  (7),  $p=0.001$ ; END:  $3.75 \pm 0.30$  (7),  $p < 0.05$ ]; mientras que en los machos se observa una tendencia [control:  $9.94 \pm 1.01$  (12); ATZ:  $8.04 \pm 0.57$  (9); END:  $7.87 \pm 0.63$  (8)]. ATZ y END no provocaron cambios en el alto y ancho de la cabeza del *phallus* de machos y hembras. Estos resultados evidencian que el largo del *phallus* es una dimensión susceptible de ser modificada por químicos con actividad hormonal. Esta variable puede usarse como bioindicador de exposición a PE y sus alteraciones podrían afectar la eficiencia reproductiva del yacaré.

#### 546. (613) LPS INDUCE UN FENOTIPO MIOFIBROBLÁSTICO EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS

Leimgruber C.<sup>1</sup>; Quintar A.<sup>2</sup>; Sosa L.<sup>3</sup>; Maldonado C.<sup>4</sup>  
Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Médicas. UNC<sup>1 2 3 4</sup>  
carolinaleimgruber83@gmail.com

Las células musculares lisas prostáticas (CMLp) establecen interacciones con el epitelio para mantener la homeostasis glandular. Las CMLp cumplen un importante rol en el desarrollo y progresión de hiperplasia prostática benigna y cáncer; sin embargo, su participación en prostatitis está poco estudiada. Nuestro grupo demostró *in vivo* que las CMLp reaccionan a infección bacteriana con incremento de TLR4, hipertrofia y adquisición de un perfil secretorio a las 48 h postinfección. El objetivo de este trabajo fue estudiar si las CMLp son capaces de responder a LPS bacteriano *in vitro*, evaluando cambios fenotípicos. Cultivos primarios de CMLp de ratas Wistar se estimularon con LPS (0,1, 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 24 o 48 h. Se procesaron para microscopía óptica y electrónica; inmunofluorescencia y western blot (WB) de  $\alpha$ -actina de músculo liso (ACTA2), calponina, vimentina y TLR4. Las CMLp controles mostraron perfil contráctil y expresión ACTA2(+), calponina(+) y vimentina(-). En cambio, las CMLp tratadas con LPS adoptaron un fenotipo secretorio con gran desarrollo de organelas proteínopoyéticas, provocando la redistribución de filamentos contráctiles hacia la periferia. Asimismo, en respuesta a LPS dosis dependiente, las CMLp coexpresaron ACTA2 y vimentina, característica de miofibroblastos. LPS indujo además disminución de calponina ( $p < 0,01$ ) e incremento de vimentina ( $p < 0,05$ ) desde las 24 h, con un pico a las 48 h. Las CMLp tratadas con LPS incrementaron la expresión de TLR4, siendo particularmente notorio a las 48 h ( $p < 0,001$ ). Por último, se corroboró que los cambios en la expresión de los marcadores de citoesqueleto eran inducidos específicamente por LPS ya que el bloqueo de su receptor TLR4 anuló el efecto. Estos resultados indican que las CMLp tienen capacidad de responder a LPS adquiriendo un fenotipo miofibroblástico. Asimismo, el perfil miofibroblástico que adoptan alteraría las interacciones con las células epiteliales, comprometiendo la homeostasis glandular.

#### 547. (681) CITOGÉNÉTICA DE EMBARAZOS ECTÓPICOS EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Asch R.<sup>1</sup>; Blanco L.<sup>2</sup>; Perandones C.<sup>3</sup>; Cañada V.<sup>4</sup>; Mena-cho M.<sup>5</sup>; Tarducci Bonfiglio M.<sup>6</sup>  
PROCREARTE<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
drrhasch@gmail.com

**Introducción:** La incidencia en la población general de embarazos ectópicos es del 1,2%, en las pacientes a las cuales se les realiza una técnica de reproducción asistida, este porcentaje aumenta de un 2 al 11%. Se ha descrito en la literatura que las anomalías embrionarias puede ser la causa en la falla de implantación e implantaciones ectópicas. **Objetivo:** Determinar la citogenética de embarazos ectópicos resultantes de técnicas de reproducción asistida. **Materiales y métodos:** Se analizó mediante un estudio prospectivo, desde 2003 al 2009 en nuestro centro de medicina reproductiva y molecular, 35 mujeres con diagnóstico de embarazos ectópicos, la incidencia de alteraciones cromosómicas en vellosidades coriónicas, resultantes de técnicas de

reproducción asistida. El diagnóstico fue establecido mediante el dosaje de B-HCG seriadas a partir de los 14 días luego de la transferencia y ecografía transvaginal. Todas las pacientes fueron tratadas mediante cirugía translaparoscópica y el material del saco gestacional fue recolectado y enviado a el departamento de genética para su análisis. **Resultados:** 11 muestras fueron excluidas porque no se identificaron vellosidades coriales o por fallas del cultivo. De los 24 casos restantes solamente una muestra tenía un cariotipo anormal: 48XXY +18/48XXY+22(12) (síndrome de Klinefelter asociado a un mosaismo en cromosoma 18 y 22) que representa un 4.3%. 13 casos reportaron un cariotipo masculino normal y 10 casos un cariotipo femenino normal. **Conclusiones:** No se encontró un incremento de las alteraciones citogenéticas en las vellosidades coriales de los embarazos ectópicos de estas pacientes. El resultado obtenido parece demostrar que en los casos de técnicas de reproducción asistida la mayoría de los embarazos tubáricos son secundarios a enfermedad inflamatoria pelviana preexistentes o la presencia de hidrosálpinx, aunque la importancia de factores mecánicos como la presión ejercida durante la transferencia embrionaria o el volumen de medio de cultivo transferido no puede ser excluido.

#### 548. (763) LACTANCIA MATERNA Y VÍNCULO TEMPRANO EN MADRES DE PREMATUROS DE ALTO RIESGO.

Torreccilla M.<sup>1</sup>; Giudice M.<sup>2</sup>; Llanos A.<sup>3</sup>; Valdéz S.<sup>4</sup>; Jahn G.<sup>5</sup>; Rodríguez Echandía E.<sup>6</sup>  
Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo; Hospital Luis Lagomaggiore<sup>1</sup>; Laboratorio de Reproducción y Lactancia. IMBECU - CONICET<sup>2 4 5</sup>; Servicio de Psicología y Psiconeuroinmunología, Hospital Luis Lagomaggiore, Mendoza<sup>3</sup>; Lab. de Farmacología y Evolución del Comportamiento -IMBECU CONICET<sup>6</sup>  
mtorreccilla@lab.crycvt.edu.ar

**Introducción:** Se han reportado innumerables beneficios sobre la leche materna. Después de un nacimiento prematuro, las madres producen una leche con una composición nutricional e inmunológica diferente, cuyas características están adaptadas a la inmadurez y deficiencias que presenta el neonato pretérmino. **Objetivo:** Evaluar calidad nutritiva e inmunológica de leche de madres de prematuros y correlacionarlos con parámetros comportamentales diádicos. **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:** 49% de madres plantearon dificultades en la extracción y cantidad insuficiente de leche. **Macronutrientes:** Triglicéridos:  $3,6 \pm 1,6$  g/100ml, Proteínas:  $1,2 \pm 0,6$  g/100ml; Lactosa:  $6,2 \pm 0,8$  g/100ml. Los valores obtenidos se encontraron intermedios entre los valores de calostro y de leche madura de madres con partos a término. Valores de IgA:  $224 \pm 45$  mg/dl, que resultaron considerablemente más elevados que los de la leche de madres con partos a término (142 mg/100 ml). **Parámetros vinculares:** 1° y 2° semana: Días de riesgo relativo (Madres: conductas desde aceptación con miedo a aceptación plena; Neonatos: pasividad a rechazo activo). A partir 3° semana: Días con conductas de acercamiento y respuestas de satisfacción. **Conclusión:** Los valores de macronutrientes de la leche de prematuros, intermedios entre calostro y leche madura de madres con partos a término, supone una adecuación de características nutricionales y protectoras a los requerimientos del neonato en función del desarrollo. La elevada concentración de IgA en la leche del prematuro beneficia su sistema inmunológico insuficientemente desarrollado. La lactancia materna, durante la internación prolongada, se desarrolla como factor fortalecedor del vínculo.

#### 549. (493) CULTIVO ORGANOTÍPICO DE TESTÍCULOS PRE-PUBERALES HUMANOS: NUEVA HERRAMIENTA PARA INVESTIGACIÓN BÁSICA Y CLÍNICA.

Della Gaspera A.<sup>1</sup>; Berensztein E.<sup>2</sup>; Chirico D.<sup>3</sup>; Lazzati J.<sup>4</sup>; Rivarola M.<sup>5</sup>; Belgorosky A.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Cultivo Celular y Biología Molecular, Servicio de Endocrinología- Hospital de Pediatría J P Garrahan<sup>1 2</sup>; Servicio de Endocrinología- Hospital de Pediatría J P Garrahan<sup>3 4 5 6</sup>



ana\_dellagaspara@yahoo.com.ar

Se ha demostrado que el cultivo organotípico de testículos fetales y neonatales es un buen sistema para estudiar el desarrollo de células somáticas, gonocitos de rata y testículos humanos fetales. Sin embargo, no existe experiencia alguna de cultivo organotípico en testículo humano postnatal. El objetivo fue desarrollar un micrométodo para estudiar el desarrollo y la función de células de Sertoli (SC), células de Leydig (LC) y células germinales (GC) a partir de biopsias de testículos normales y disgenéticos dentro de una histoarquitectura preservada. Se analizaron 4 cultivos organotípicos de testículo humano (3 prepuberal (PP) de 2m, 2m y 2,5a y 1 puberal (Pu) de 13a. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Institución. Los tejidos fueron disecados en fragmentos de aproximadamente 3mm<sup>3</sup>. Se cultivaron 4 a 6 explantos/well en DMEM/F12 a 37°C durante 5 días. Al finalizar este periodo, se realizó estímulo agudo con hCG (100 ng/ml, 3 h). Se evaluó en el medio condicionado (MC): testosterona (T) (marcador de LC), estradiol (de LC) y de AMH (de SC inmaduras). Se fijaron los explantos para análisis inmunohistoquímicos y se caracterizaron los tipos celulares con los marcadores: P450ssc para LC, AMH para SC, c-KIT para GC y TNF $\alpha$  y CD68 para macrófagos. Se detectó secreción de testosterona en el MC aumentando con los días de cultivo en testículos PP y disminuyendo en el Pu. Un aumento de T bajo hCG fue observado en los cultivos de 2m (minipubertad) en un 275% y 139%. Se detectó estradiol en MC en un cultivo PP y en el Pu y AMH sólo en los cultivos PP. Se verificó histoarquitectura conservada de los explantos. Se observó inmunexpresión de los marcadores de células estudiadas. Conclusión: El cultivo organotípico es una herramienta eficiente para el estudio del desarrollo temprano de funciones testiculares que permitirá abordar el estudio de biopsias gonadales. Además, este sistema logra mantener el progreso satisfactorio de todos los linajes celulares.

## ONCOLOGÍA 8

### 550. (41) OPTIMIZACIÓN DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA CONTRA EL CÁNCER MEDIANTE EL SILENCIAMIENTO DE SURVIVINA

Cogno I.<sup>1</sup>; Rodríguez E.<sup>2</sup>; Rivarola V.<sup>3</sup>

Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas Físico Químicas y Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>1 2 3</sup>  
scogno@exa.unrc.edu.ar

Survivina, una proteína inhibidora de la apoptosis es reconocida como un atractivo blanco terapéutico contra el cáncer debido a que se encuentra ausente en la mayoría de los tejidos adultos diferenciados pero se re-expresa en una gran variedad de tumores humanos. Más aun, la expresión de survivina en la mayoría de los cánceres se asocia con baja sobrevivencia de los pacientes, reaparición de la enfermedad, resistencia a quimioterapia o radioterapia. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran un aumento de la expresión de survivina como también su activación (fosforilación) al aplicar Terapia Fotodinámica (TFD). Por lo tanto, los objetivos planteados en este trabajo fueron optimizar la apoptosis y citotoxicidad producida por la TFD en células de cáncer de mama humano T47D, silenciando la expresión de survivina. Se utilizó un RNA de interferencia contra el exón 1 del mRNA de survivina (pSil<sub>1</sub>). pSil<sub>1</sub>, a una concentración de 5 ug/ml, disminuyó 90% la expresión de survivina y además fue capaz de suprimir el crecimiento tumoral en las células T47D. Además, cuando las células T47D fueron tratadas con la combinación de pSil<sub>1</sub> y TFD presentaron elevados niveles de apoptosis y citotoxicidad, comparado con las células tratadas con los tratamientos por separado. Asimismo, se determinó en las células co-tratadas un incremento en la expresión de PARP clivado y caspasa-3, una disminución entre la relación Bcl-2/Bak y una leve activación de la expresión de caspasa-8. Nuestros resultados sugieren que el silenciamiento de survivina en combinación con la TFD, incrementaría de manera sinérgica, la efectividad clínica del tratamiento contra el cáncer.

### 551. (140) INTERACCIÓN ENTRE TEJIDO ADIPOSO MAMARIO HUMANO PROVENIENTE DE MAMAS NORMALES O TUMORALES Y CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS NORMALES O TUMORALES: REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y DE LA PROGRESIÓN TUMORAL

Fletcher S.<sup>1</sup>; Sacca P.<sup>2</sup>; Tesone A.<sup>3</sup>; Bruzzone A.<sup>4</sup>; Lüthy I.<sup>5</sup>; Gonzalez E.<sup>6</sup>; Calvo J.<sup>7</sup>; Pistone Creydt V.<sup>8</sup>

Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, Instituto De Biología y Medicina Experimental, CONICET<sup>1 2 3 7 8</sup>; Laboratorio de Hormonas y Cáncer, Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET<sup>4 5</sup>; Instituto de Oncología "Ángel H. Roffo", UBA<sup>6</sup>; Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA<sup>7</sup>  
sabrifletcher@yahoo.com

El estroma juega un rol preponderante en el desarrollo y diferenciación del tejido mamario, siendo el tejido adiposo el tipo estromal predominante. El objetivo fue evaluar medios condicionados (MC) de explantos de tejido adiposo humano provenientes de mamas normales (EAMNh) y tumorales (EAMTh) sobre la proliferación, adhesión, migración y actividad de metaloproteasas (MMPs) en líneas celulares epiteliales mamarias humanas normales (MCF-10A) y tumorales (MCF-7 y T47D). Obtuvimos EAMNh y EAMTh de pacientes intervenidos quirúrgicamente y recolectamos los MCs de los EAMNh (n=3) y EAMTh (n=5, tumores lobulillar y ductal) luego de 24hs de incubación. Crecimos MCF-10A, MCF-7 y T47D, las incubamos con los MCs y cuantificamos proliferación por MTS; migración por cicatrización y actividad de MMPs por zimografía. Evaluamos la adhesión de MCF-7 y T47D sobre placas expuestas antes a los MCs. La proliferación de las tres líneas celulares aumentó significativamente respecto del control (p<0,05) luego de incubar 24hs con los MCs de EAMTh. El MC de EAMTh del tumor lobulillar fue el único que aumentó la migración de MCF-7 y T47D significativamente (p<0,05). Los MCs de EAMTh mostraron actividad de MMP-2 y MMP-9, siendo significativamente mayor en el MC de EAMTh del tumor lobulillar (p<0,05). Así mismo, la incubación de las células epiteliales con los diferentes MCs de EAMTh estimuló la actividad de MMP-9 en éstas. Por último, la adhesión de MCF-7 y T47D fue significativamente mayor con los MCs de EAMNh respecto a los MCs de EAMTh (p<0,05). En conclusión, observamos que los MCs provenientes de explantos tumorales estimularon la proliferación y la actividad de MMP-9 de células epiteliales normales y tumorales. El MC de EAMTh del tumor lobulillar tendría un mayor efecto sobre la capacidad metastásica de células epiteliales aumentando la migración y la actividad de las MMPs. Los MCs de EAMTh tendrían una expresión significativamente menor de proteínas de adhesión que los MCs de EAMNh.

### 552. (210) ANÁLISIS DE GENES METABOLIZANTES XENOBIÓTICOS EN PACIENTES CON LINFOMA NO-HODKING (NHL)

Acevedo Belén L.<sup>1</sup>; Villanueva M.<sup>2</sup>; Richard S.<sup>3</sup>

IMBICE Instituto Multidisciplinario de Biología Celular<sup>1 2 3</sup>  
srichard@imbice.org.ar

Las Enzimas Metabolizantes Xenobióticas (EMXs) codificadas por los GMXs (genes) metabolizan una amplia variedad de compuestos de importancia a nivel clínico, fisiológico y toxicológico, así como muchos compuestos carcinogénicos y procarcinogénicos. Los genes CYP1A2, N-acetiltransferasa2 (NAT2), Glutatión transferasa (GST), codifican enzimas específicas en el metabolismo de muchos de estos compuestos. El estudio de estos polimorfismos en diferentes poblaciones humanas ha mostrado que están relacionados con el desarrollo de ciertos cánceres como testicular, mama y vejiga. En este trabajo se analizaron en 47 muestras de NHL la constitución alélica del genotipo NAT-2 y los genotipos para las variantes T y M del gen GST. En 20 de ellas también se analizó el alelo C del gen CYP1A2. El análisis de las variantes alélicas CYP1A2 y NAT2 se realizó mediante PCR/RFLP con distintas enzimas de restricción y visualización en geles de agarosa

teñidos con Gel Green. Para los genes GST se realizaron PCRs en dúplex, utilizándose como control positivo un fragmento del gen sintético GSTM2, método que permite observar presencia o ausencia de cada genotipo. Los resultados para NAT-2 muestran una altísima presencia de acetiladores Lentos (95.74%), acetiladores Intermedios (4.25%), y la total ausencia de fenotipos de acetilación Rápida. Para el caso de GSTM1 se observó un importante porcentaje del genotipo null (60.4%), contrario a lo observado en el gen GSTT1 donde sólo el 10.4 % presentó este genotipo. Por último el alelo C del gen CYP1A2, presenta en 90% del fenotipo de metabolización rápida (WT). Los resultados sugieren que en los individuos estudiados los genes metabolizantes de la Fase II poseen predominantemente un fenotipo de acetilación lenta mientras que para la mayoría de estos individuos el gen CYP1A2 (Fase I) presenta una actividad muy alta en la activación de procarcinógenos, lo que nos estaría señalando un desbalance en las rutas metabólicas en los casos de LNH.

**553. (290) POTENCIACIÓN DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA CON EL FLAVONOIDE NATURAL SILIBINA EN CÉLULAS DE VEJIGA**

Gándara L.<sup>1</sup>; Rodríguez L.<sup>2</sup>; Sandes E.<sup>3</sup>; Di Venosa G.<sup>4</sup>; Mamone L.<sup>5</sup>; Batlle A.<sup>6</sup>; Casas A.<sup>7</sup>; Eiján A.<sup>8</sup>  
*CIPYP Hospital de Clínicas "José de San Martín"; Centro de Investigaciones sobre Porphirinas y Porphirias (CIPYP), CONICET, UBA<sup>2,4,5,6,7</sup>; Area Investigaciones, Instituto de Oncología Ángel H. Roffo<sup>3,8</sup>*  
 garandara@hotmail.com

La Terapia Fotodinámica (TFD) a partir del ácido 5-aminolevulínico (ALA) consiste en la administración de un profotosensibilizante que induce la síntesis de porfirinas en el tumor. Luego de la iluminación con luz de una longitud de onda adecuada, se desencadenan reacciones mediadas por radicales libres que inducen citotoxicidad. La TFD en cáncer de vejiga resulta de interés debido al fácil acceso de la luz a la zona tumoral por vía endoscópica. La silibina, flavonoide natural extraído de *Silybum marianum*, se usa actualmente como hepatoprotector, aunque también posee actividad antitumoral y aumenta la eficacia de otros tratamientos antitumorales. En el presente trabajo evaluamos la actividad del tratamiento combinado de ALA-TFD con silibina en líneas celulares de cáncer de vejiga humana (T24) y murina (MB49). Las células se expusieron a una dosis lumínica ( $DL_{50}$ , en Joules/cm<sup>2</sup>) que induce un 50% de muerte celular. A las 19 hs se evaluó la citotoxicidad por el método del MTT. La línea T24 es más sensible a la ALA-TFD que la MB49, siendo las  $DL_{50}$  de 0,025 y 0,05 J/cm<sup>2</sup> respectivamente. El tratamiento combinado se realiza irradiando con  $DL_{50}$  células que fueron tratadas 24 hs antes con silibina. En las MB49, silibina 50  $\mu$ M y 30  $\mu$ M induce 37% y 24% de citotoxicidad respectivamente. La combinación con ALA-TFD potencia la muerte en un 25% y 13% respectivamente. Resultados similares se encontraron en la línea T24, aunque como ésta es menos sensible a silibina, el grado de potenciación fue menor. Cuando el período de exposición a silibina se extendió durante la irradiación y 24 hs luego de TFD, la potenciación fue mayor. Ya que dosis no tóxicas de silibina no potencian el efecto fotodinámico y que el tratamiento combinado con dosis tóxicas de silibina no es sinérgico sino aditivo, podemos concluir que las vías de acción de ambas modalidades terapéuticas no serían compartidas. Estos resultados sugieren que la adición de silibina a la ALA-TFD aumentaría la eficacia de la TFD.

**554. (387) ACCIÓN ANTITUMORAL DE LA DESMOPRESINA (DDAVP) SOBRE UN MODELO DE CÁNCER COLÓNICO.**

Garona J.<sup>1</sup>; Hermo G.<sup>2</sup>; Gomez D.<sup>3</sup>; Alonso D.<sup>4</sup>; Ripoll G.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Oncología Molecular, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes<sup>1,2,3,4,5</sup>*  
 juan\_garona@hotmail.com

DDAVP es un análogo peptídico sintético de vasopresina con propiedades hemostáticas, profibrinolíticas y antimetastásicas en cáncer mamario, actuando como agonista del receptor V2

de vasopresina en endotelio microvascular y células tumorales. Previamente demostramos que DDAVP redujo la implantación esplénica de células de un adenocarcinoma colónico en ratones. En este trabajo, evaluamos la actividad de DDAVP como agente antitumoral en modelos experimentales de cáncer de colon, utilizando las líneas celulares COLO-205 (humana) y CT-26 (murina). En ensayos in vitro, la incubación durante 72 h en presencia de DDAVP redujo significativamente la proliferación de COLO-205 y CT-26 en dosis de 1  $\mu$ M ( $p < 0.001$ ). Se confirmó, además, la expresión del receptor V2 mediante inmunofluorescencia en ambas líneas tumorales. Se exploró también, el efecto de DDAVP junto al quimioterápico 5-fluorouracilo (5-FU), usado habitualmente en el tratamiento del cáncer colorrectal. El tratamiento combinado de DDAVP (1  $\mu$ M) y 5-FU (250  $\mu$ M) resultó en un incremento del efecto citostático del 30% comparado con los tratamientos individuales ( $p < 0.001$ ). Se evaluó la acción de DDAVP (2  $\mu$ g/kg) sobre la progresión tumoral intraperitoneal con una alta carga de CT26 ( $3 \times 10^5$  células) en ratones Balb/c singénicos. Luego de 17 días, DDAVP redujo un 45% el volumen acumulado de ascitis en este modelo (control:  $1,24 \pm 0,75$  ml versus DDAVP:  $0,68 \pm 0,62$ ;  $p = 0.09$ ). Con una menor carga tumoral ( $1 \times 10^5$  células), DDAVP produjo una disminución en la implantación de nódulos tumorales intestinales, en particular de los nódulos de pequeño tamaño ( $p < 0.05$ ). Estos datos indican la actividad antitumoral de DDAVP en modelos murinos de cáncer colónico. Resta determinar los esquemas más apropiados de administración in vivo del péptido en combinación con quimioterapia.

**555. (428) CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS DE ORIGEN MAMARIO**

Noriega M.<sup>1</sup>; Denninghoff V.<sup>2</sup>; Perazzo F.<sup>3</sup>; Lago N.<sup>4</sup>; Paesani F.<sup>5</sup>; Krupitzki H.<sup>6</sup>; Nieto S.<sup>7</sup>; García A.<sup>8</sup>; Avagnina A.<sup>9</sup>; Elsner B.<sup>10</sup>  
*CEMIC<sup>1,3</sup>; CEMIC-CONICET<sup>2</sup>; Facultad de Medicina-UBA<sup>4</sup>; CEMIC<sup>5,6,7,8,9,10</sup>*  
 vcdennin@yahoo.com.ar

*Introducción.* El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en la mujer. Los tumores de origen desconocido (TOD) representan 5-15% de las neoplasias malignas, correspondiendo 1,5% a primitivo mamario. Seleccionamos un panel inmunohistoquímico con marcadores clásicos y más recientes, como Mamaglobina (MAG) para tumores de origen mamario. *Objetivos.* 1) Determinar la sensibilidad y especificidad de dicho panel, tomando en cuenta especialmente la inclusión del marcador MAG, y 2) Comparar los resultados de la IHQ en cortes completos de tacos tumorales con respecto a los *tissue microarray* (TMA). *Diseño del estudio.* Se incluyeron 29 metástasis mamarías como si fueran TOD. Se seleccionaron 48 biopsias como controles. Se realizó TMA. Se realizó inmunohistoquímica para MAG, GCDFFP-15, Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) y Citoqueratina 7 (CK7). *Resultados.* Se observó marcación positiva en 10/29 casos para MAG, 13/29 para GCDFFP-15, 20/29 para RE, 9/29 para RP y 25/29 para CK7. Dentro de los Controles, MAG fue positiva en 2/42 y GCDFFP-15 en 4/42. *Conclusión.* La inclusión marcador MAG a un panel IHQ considerado en paralelo (RH, CK7, GCDFFP-15) no aumenta la sensibilidad del mismo, pero mostró un mayor Valor Predictivo Positivo (VPP), que el otro marcador de origen mamario, GCDFFP-15. Esto indica que la inclusión del marcador MAG dentro del panel de IHQ aumenta la probabilidad de detectar una metástasis de carcinoma mamario. La técnica utilizada TMA tiene la gran ventaja de ser más económica que la técnica tradicional. No obstante, esta técnica tiene sesgos cuando se emplean anticuerpos con patrones de marcación mixtos (focal y difuso de distintas intensidades) como en nuestro estudio. En conclusión, la estrategia diagnóstica con mayor VPP resultó ser la que consideró RH y MAG en serie y no en paralelo, siendo el VPP de ésta 87.5%.

**556. (467) LA ALFA 6 INTEGRINA MEDIA LA RESISTENCIA AL TAMOXIFENO INDUCIDA POR LAMININA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA.**

Sampayo R.<sup>1</sup>; Pontiggia O.<sup>2</sup>; Raffo D.<sup>3</sup>; Simian M.<sup>4</sup>  
*INSTITUTO DE ONCOLOGIA ANGEL H. ROFFO<sup>1,2,3,4</sup>*  
 ro\_sampa@hotmail.com

Demostramos previamente que componentes de matriz extracelular como la laminina (LN) y la fibronectina (FN) inducen resistencia al tamoxifeno utilizando las líneas celulares de cáncer de mama LM05-E (murina) y MCF-7 (humana). Por otra parte determinamos que la beta 1 integrina media el efecto protector de la FN. El objetivo de este trabajo fue investigar qué integrina media el efecto protector de la LN y si estos componentes de matriz regulan la actividad del receptor de estrógeno en células LM05-E y MCF-7. Para contestar la primera pregunta se sembraron células sobre LN en presencia del anticuerpo bloqueante para integrina alfa 6 (GoH3; 0,15  $\mu$ M) y se trataron con 1% SFBch + estradiol ( $10^{-8}$ M), con o sin 4-OH-tamoxifeno ( $10^{-6}$ M) durante 48 horas. Se midió muerte celular por marcación con yodo de propidio a las 48 horas. Se encontró que el efecto protector de la LN se revirtió en presencia de GoH3 (n=3, P< 0.01). A continuación las células fueron transfectadas de manera transiente con un vector reportero pSV40-ERE-Luc (0.2  $\mu$ g) conteniendo 3 copias sitio ERE clonado río arriba del gen de luciferasa y un vector pRL-TK-Renilla (Promega) (0,04  $\mu$ g) como control interno de transfección. Se trató a las células con LN o FN (30  $\mu$ g/ml) en presencia y ausencia de 4-OH-tamoxifeno ( $10^{-6}$ M) y estradiol ( $10^{-8}$ M) durante 8 hrs. Ni la FN ni la LN fueron capaces de modular la actividad del receptor de estrógeno, a diferencia del estradiol y el 4-OH-tamoxifeno (n=3, P<0.001). Nuestros resultados sugieren que los componentes de matriz extracelular vía su interacción con integrinas modulan la resistencia endocrina mediante mecanismos que no implican la regulación de la actividad transcripcional del receptor de estrógeno. Este trabajo es subsidiado por la Fundación Susan G. Komen for the Cure (BCTR0600341) y la ANPCYT (PICT 2008-0325).

**557. (477) EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE LOS GENES DE LA TIMIDINA QUINASA DEL VIRUS HERPES SIMPLEX Y DEL INTERFERÓN BETA CANINO SOBRE CULTIVOS 2D Y 3D DE CÉLULAS DE MELANOMA ESPONTÁNEO CANINO**

Gil Cardeza L.<sup>1</sup>; Villaverde M.<sup>2</sup>; Rossi U.<sup>3</sup>; Glikin G.<sup>4</sup>; Finocchiaro L.<sup>5</sup>

Unidad de Transferencia Genética, Área Investigación, Inst. de Oncología Roffo.<sup>1 2 3 4 5</sup>  
lourgilcardeza@hotmail.com

Con el fin de estudiar la sensibilidad a la terapia génica del gen de la timidina quinasa del virus herpes simplex (HSVtk) con agregado de 1  $\mu$ g/ml de ganciclovir (HSVtk-GCV) y del gen interferón beta canino (ciFN $\beta$ ) se co-lipofectaron 4 líneas celulares derivadas de melanoma espontáneo canino, Ak, Bk, Br y Rkb, con plásmidos que expresan HSVtk y ciFN $\beta$  (psCMVHSVtk; psCMVciFN $\beta$ ) complementados con liposomas catiónicos. Como controles se co-lipofectó el plásmido que expresa el gen de la  $\beta$ -Galactosidasa de *E. coli* (psCMV $\beta$ Gal) con cada uno de los plásmidos terapéuticos. El efecto de los tratamientos se evaluó sobre las células creciendo en dos configuraciones espaciales, monocapa (2D) y esferoides (3D), pues los esferoides recrean más fielmente que la monocapa las áreas pobremente oxigenadas y la resistencia multicelular presente en los tumores *in vivo*. Los esferoides se formaron sembrando el número de células necesario para obtener un esferoide único por pozo (placas de 96 pozos) sobre 1,5% de agar (500 células por pozo de Ak y 5000 células por pozo de Bk, Br o Rkb). La viabilidad celular se evaluó al cabo de 5 días para los cultivos 2D y de 12 días para los cultivos 3D con el ensayo de la fosfatasa ácida (APH). En 3 de las 4 monocapas (Ak, Br y Rkb) prevaleció el efecto del gen ciFN $\beta$  sobre el del sistema HSVtk-GCV (p<0,05 HSVtk-GCV+ $\beta$ Gal vs HSVtk-GCV+ciFN $\beta$  y n.s. ciFN $\beta$ + $\beta$ Gal vs HSVtk-GCV+ciFN $\beta$ ) mientras que en Bk la co-lipofección de los genes terapéuticos produjo un efecto mayor que las co-lipofecciones controles tanto en la monocapa como en los esferoides (p<0,05 ciFN $\beta$ + $\beta$ Gal y HSVtk-GCV+ $\beta$ Gal vs HSVtk-GCV+ciFN $\beta$ ). En los esferoides de Rkb se mantuvo la prevalencia del gen ciFN $\beta$  sobre el sistema HSVtk-GCV mientras que en los esferoides de Ak y Br, que presentan una tasa de crecimiento mayor que los anteriores, se invirtió la prevalencia: el sistema de HSVtk-GCV fué más efectivo que el gen de ciFN $\beta$  (p<0,05 ciFN $\beta$ + $\beta$ Gal vs HSVtk-GCV+ciFN $\beta$  y n.s. HSVtk-GCV+ $\beta$ Gal vs HSVtk-GCV+ciFN $\beta$ ).

**558. (485) EVALUACIÓN DE POSIBLES MARCADORES DE RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA (QTM) CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y CELECOXIB (CEL), TOXICIDAD Y CALIDAD DE VIDA EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA, PROGRESADAS A QUIMIOTERAPIA ESTÁNDAR.**

Perroud H.<sup>1</sup>; Rozados V.<sup>2</sup>; Alasino C.<sup>3</sup>; Rico M.<sup>4</sup>; Giordano R.<sup>5</sup>; Pezzotto S.<sup>6</sup>; Scharovsky O.<sup>7</sup>

Instituto de Genética Experimental - Facultad Ciencias Médicas - UNR<sup>1 2 4 6 7</sup>; Instituto de Oncología y Especialidades Médicas<sup>3</sup>; Laboratorio Cibic<sup>5</sup>; C.I.U.N.R. Rosario<sup>7</sup>  
<haperroud@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 mediados, en parte, por un efecto antiangiogénico. Nuestro objetivo es evaluar los niveles de CEPs (células endoteliales progenitoras, CECs (células endoteliales circulantes), células T reguladoras (Tregs), VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) y TSP -1 (trombospondina-1), toxicidad de la QTM con Cy + Cel en pacientes con cáncer de mama avanzado, progresadas a quimioterapia estándar y su calidad de vida (Protocolo en curso, aprobado por Comité de Bioética y ANMAT). Las pacientes reciben 50mg Cy + 400mg Cel/día vía oral, y se realizan controles clínicos, de laboratorio general, y de biomarcadores cada 15-30días. La permanencia en el ensayo de las pacientes incluidas va de 4 a 34 semanas. No se observaron modificaciones de los parámetros bioquímicos en 5/7 pacientes, 1/7 presentó plaquetopenia Grado II lo que requirió reducción de Cy a 25 mg/día y 1/7 mostró valores elevados de CPK, con reducción transitoria de Cel a 200 mg/día. Tras un aumento inicial del % de CECs y CEPs (citometría de flujo) éstos descendieron en las pacientes con mayor permanencia y sin un patrón definido en las de menor permanencia. En ninguna de las pacientes se detectó Tregs circulantes. La concentración sérica de VEGF y TSP-1 (ELISA) no presentó cambios significativos durante el tratamiento, sin embargo las pacientes con menor valor inicial de VEGF y menor relación VEGF/TSP-1 fueron las de mejor respuesta. La evaluación de la calidad de vida mostró ausencia de modificaciones negativas y presencia de algunas positivas. El tratamiento no mostró toxicidad y la calidad de vida mejoró. Los niveles bajos iniciales de VEGF y de relación VEGF/TSP-1 podrían pronosticar respuesta al tratamiento, la cual iría acompañada de un descenso de CEPs y CECs.

**559. (561) ROL DE HO-1 EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL (CCR): IMPORTANCIA DE P53**

Andrés N.<sup>1</sup>; Gandini A.<sup>2</sup>; Fermento M.<sup>3</sup>; Gonzalez Donna M.<sup>4</sup>; Ferro A.<sup>5</sup>; Facchinetti M.<sup>6</sup>; Curino A.<sup>7</sup>

Laboratorio de Biología Básica del Cáncer Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca INIBIBB CCT CONICET Bahía Blanca<sup>1 2 3 6 7</sup>; Servicio de Oncología, Hospital Italiano Regional del Sur, Bahía Blanca<sup>4 5</sup>  
ncandres@criba.edu.ar

Recientemente se ha obtenido evidencia de que la hemoxygenasa-1 (HO-1) está implicada en el desarrollo y progresión tumoral, sin embargo escasos trabajos describen la expresión y el rol de HO-1 en CCR humanos. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la expresión de HO-1 en biopsias quirúrgicas de CCR metastásico correlacionándola con factores pronósticos y estudiar los efectos de la modulación de la enzima sobre la supervivencia celular. Se emplearon 32 biopsias humanas de CCR (estadio IV) a las cuales se les realizó inmunohistoquímica (IHQ) para determinar la expresión de HO-1. El 71,8% de los tumores fueron positivos (>10% de células inmunomarcadas). La zona adyacente con histología normal mostró solo marcación a nivel del epitelio apical. Además, la comparación de la intensidad de marcación mostró diferencias entre el epitelio tumoral y el no maligno (p=0,0018). Sin embargo no se observó correlación entre la

expresión de HO-1 y el grado de diferenciación ( $p=0,1912$ ), índice mitótico ( $p=0,7615$ ), índice nuclear ( $p=0,8329$ ) y estado del k-ras (salvaje/mutado,  $p=0,5348$ ). No obstante, la sobreexpresión de la proteína se correlacionó con una mayor sobrevida de los pacientes (log Rank test,  $p<0,001$ ). Se moduló la expresión de HO-1 con hemina (40 y 100  $\mu\text{M}$ ) en las líneas HCT116 p53 (+/+ y HCT116 p53 (-/-), observándose aumento de los niveles proteicos de la enzima. La modulación de HO-1 produce alteración en la proliferación/supervivencia celular ( $p<0,001$ ) y aumento en los niveles de p53, p21 y p27 en la línea HCT116 p53 (+/+). En cambio, no se observó variación en la expresión de estas proteínas en las HCT116 p53 (-/-). Se empleó citometría de flujo para confirmar estos resultados. Los resultados de este estudio muestran que HO-1 se encuentra sobreexpresada en CCR y sugieren que la proteína podría estar participando en la progresión tumoral del CCR a través de la regulación de p53 y modulando proteínas reguladoras del ciclo celular.

**560. (649) EFECTO PROLIFERATIVO DE LA HORMONA TIROIDEA SOBRE LOS TUMORES DE CÉLULAS MAMARIAS LM3 EN EL RATÓN.**

Alippe Y.<sup>1</sup>; Lavia F.<sup>2</sup>; Colombo L.<sup>3</sup>; Biancolini C.<sup>4</sup>; Carreras M.<sup>5</sup>; Poderoso J.<sup>6</sup>

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 4</sup>; Instituto de Oncología Roffo, Universidad de Buenos Aires<sup>3</sup>; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno y Departamento de Bioquímica Clínica-FFYB; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires; CONICET<sup>5</sup>; Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno; Hospital de Clínicas; Universidad de Buenos Aires; CONICET<sup>6</sup>  
yaelalippe@gmail.com

Numerosas publicaciones hacen referencia al efecto de la hormona tiroidea sobre el cáncer de mama en mujeres pre y postmenopáusicas así como en distintos modelos experimentales, pero los resultados difieren según la metodología y el diseño utilizado. El propósito del presente trabajo fue estudiar el efecto del hiper e hipotirodismo inducidos artificialmente, sobre el desarrollo de tumores originados por inoculación de células LM3 en ratones. Se inocularon 9 ratones con LM3 ( $2 \times 10^5$  células/animal) por vía subcutánea en región dorsal. El grupo 1 ( $n = 3$ ) se trató con metimazol al 0.05% diluido en el agua de bebida que se suministró *ad libitum* comenzando 20 días antes de la inoculación. El grupo 2 ( $n = 3$ ) se trató con T4 por vía intraperitoneal comenzando 7 días antes de la inoculación. El grupo 3 ( $n = 3$ ) se utilizó como control recibiendo solución fisiológica intraperitoneal en volumen semejante al grupo 2. Cuando el tamaño lo permitió, aproximadamente 20 días después de la inoculación, se midieron periódicamente con un Venier 3 diámetros del tumor aplicándose la fórmula del ovoide para calcular el volumen. Se calculó el incremento porcentual diario del volumen a partir de la medición anterior y el número de días que separan las mediciones. En la última medición realizada el día 33 postinoculación, se observó un incremento significativamente mayor del volumen tumoral en los animales del grupo 2 ( $0.99 \pm 0.07$ ) respecto a los grupos 1 y 3 ( $0.32 \pm 0.04$ ;  $0.2 \pm 0.08$  respectivamente; anova  $p < 0.000$ ; 2 vs 1 y 3  $p < 0.05$ ), no habiendo diferencia significativa entre los últimos. Se concluye que la administración de hormona tiroidea incrementó la proliferación de las células tumorales en este modelo experimental. La inhibición de la glándula mediante la administración de metimazol no logró reducir el crecimiento tumoral, al menos con la dosis utilizada.

**561. (652) OPTIMIZACIÓN DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE TIROIDES MEDIANTE EL USO DE INHIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASAS (HDACI)**

Perona M.<sup>1</sup>; Thorp S.<sup>2</sup>; Pozzi E.<sup>3</sup>; Casal M.<sup>4</sup>; Pisarev M.<sup>5</sup>; Juvenal G.<sup>6</sup>; Dagrosa M.<sup>7</sup>  
Departamento de Radiobiología (CNEA), CONICET<sup>1 6 7</sup>; Dpto de Química, Dpto de Instrumentación y Control (CNEA)<sup>2 3</sup>; Instituto de Oncología "Ángel Roffo" (UBA)<sup>4</sup>;

Dpto de Radiobiología (CNEA); CONICET; Dpto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>  
mariperona@gmail.com

**Introducción y Objetivos:** El cáncer de tiroides es usualmente curable, sin embargo algunos pacientes no responden a ninguna de las terapias actualmente disponibles. En estudios previos demostramos que la terapia por captura neutrónica en boro (BNCT) podría ser una alternativa. El objetivo de este trabajo fue estudiar el uso del inhibidor de histonas deacetilasas (HDACI) butirato de sodio (NaB) como radiosensibilizador para la optimización de BNCT en el tratamiento del cáncer de tiroides. **Materiales y Métodos:** Células de la línea de cáncer humano tiroideo folicular (WRO) fueron incubadas 24, 48 y 72 horas con dosis crecientes de NaB (0,1-1,5 mM). Posteriormente, células en proliferación fueron distribuidas en los siguientes grupos: 1) BPA (para-borofenilalanina)(10  $\mu\text{g}^{10}\text{B/mL}$ )+neutrones; 2) BOPP (2,4-bis ( $\alpha,\beta$ -dihydroxyethyl)-deutero porphyrin IX)(10  $\mu\text{g}^{10}\text{B/mL}$ )+neutrones; 3) neutrones solos. Se utilizó el haz de neutrones térmicos del RA3 (flujo:  $7.5 \cdot 10^{10}\text{n/cm}^2$  seg) obteniéndose dosis físicas entre 1-5 Gy ( $\pm 10\%$ ). La sobrevida celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromuro) al día 4. Además se evaluaron el ciclo celular y la muerte celular post irradiación. **Resultados:** Solamente a las 24 h no se observó para el NaB un efecto inhibidor de la proliferación celular. El porcentaje de sobrevida celular disminuyó en función de la dosis física absorbida en todos los tratamientos realizados. Este efecto fue mayor para los grupos irradiados con compuestos de boro y el NaB ( $p < 0.05$ , factor modificador de la dosis igual a 1,3). Se observó un aumento significativo de la apoptosis y la necrosis celular en los grupos BNCT incubados con NaB a las 24 y 48 h. En todos los grupos irradiados se observó un arresto en G2 a las 24 h independiente del agregado del radiosensibilizador. **Conclusiones:** El butirato de sodio actuaría como radiosensibilizador de la radiación de alto LET (neutrones y neutrones más compuestos de boro).

**562. (669) ROR1 ACTIVA LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT Y MEDIA LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DE MELANOMA**

Fernández N.<sup>1</sup>; Lorenzo D.<sup>2</sup>; López-bergami P.<sup>3</sup>  
IBYME<sup>1 2 3</sup>  
natyfernandez24@gmail.com

Melanoma se caracteriza por la activación constitutiva de diversas vías de transducción de señales tales como MAPK y PI3K/Akt. La vía no-canónica de Wnt (independiente de  $\beta$ -catenina) se encuentra activa en melanoma pero poco se sabe de los mecanismos intracelulares involucrados. El objetivo de este trabajo es ampliar nuestro conocimiento sobre esta vía de señalización. Para ello, se determinaron los niveles de ARN mensajero de los receptores pertenecientes a las familias Fzd y Ror. Mediante ensayos de PCR en tiempo real se demostró que Fzd7 y el receptor de tirosina quinasa Ror1 se encuentran sobreexpresados en melanoma. Para estudiar la importancia de la sobreexpresión de Ror1 en melanoma se diseñaron y clonaron en el vector retroviral pRetroSuper dos short hairpin ARN (shRNA) específicos contra Ror1. La transducción de células de melanoma Lu1205 con estos retrovirus provocó una eficiente inhibición de Ror1 en ensayos de western blot. La reducción en los niveles de Ror1 se asoció a una mayor inducción de apoptosis por privación de suero (22,4% vs 13,4%) y por tratamiento con Wnts. Para identificar mediadores intracelulares de la señalización por Ror1 estudiamos la fosforilación y activación de Dvl2 (intermediario de la vía Wnt) por Wnt5a en las células Lu1205. Este experimento demostró que la activación de Dvl2 por Wnt5a se encuentra disminuida cuando las células expresan el shRNA de Ror1. Por otro lado, mediante ensayos de luciferasa con un gen reportero cuyo promotor es activado por la vía dependiente de  $\beta$ -catenina y utilizando Wnt3a (ligando canónico) como estímulo, observamos menores niveles de estimulación en las células que expresan el shRNA de Ror1 con respecto al control. En conjunto, estos resultados indican que la sobreexpresión de Ror1 en melanoma estaría implicada en

mecanismos de resistencia a apoptosis y a una mayor actividad de las vías canónica y no-canónica de Wnt y que estos efectos estarían mediados por Dvl2.

## FARMACOLOGÍA 5

### 563. (27) ELIMINACIÓN RENAL DE P-AMINOHIPURATO EN RATAS CON CALCIFICACIÓN DISTRÓFICA. ROL DE LOS TRANSPORTADORES DE ANIONES ORGÁNICOS OAT1 Y OAT3.

Bulacio R.<sup>1</sup>; Hazelhoff M.<sup>2</sup>; Torres A.<sup>3</sup>

*Farmacología Fac Cs Bioq y Farm Unr*<sup>1 2</sup>; *Farmacología Fac Cs Bioq y Farm UNR, CONICET*<sup>3</sup>  
robulacio@hotmail.com

La calcificación distrófica es una patología que cursa con calcificación de tejidos blandos sin modificaciones en los niveles de calcio plasmático. En nuestro laboratorio hemos demostrado que ratas con calcificación distrófica presentan alteraciones en la excreción renal de fármacos. El Transportador de Aniones Orgánicos 1 (Oat1) y el Transportador de Aniones Orgánicos 3 (Oat3) son proteínas presentes en membrana basolateral renal, que transportan aniones orgánicos de importancia fisiológica y farmacológica. En el presente trabajo se evaluó la expresión renal de Oat1 y de Oat3, y el clearance renal de *p*-aminohipurato (PAH, anión orgánico modelo) en ratas Wistar macho adultas con calcificación distrófica. Esta patología se produjo por la administración de una dosis de Vitamina D<sub>3</sub> (300.000 UI/kg p.c; i.m.) diez días antes del experimento (grupo Tratado T, n=6). En paralelo se trabajó con un grupo Control (C, n=6). Se determinaron Uremia (U, g/L) y Calcemia (Ca, g/L) mediante técnicas espectrofotométricas, clearance de PAH (Cl<sub>PAH</sub>, mL/min/100 g p.c) con técnicas convencionales de clearance y las expresiones de Oat1 y Oat3 en Homogenados (H) y en Membranas Plasmáticas (MP) provenientes de corteza renal, empleando Western blotting e Inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos se expresan como la media ± SEM. Los mismos se analizaron estadísticamente con el test t de Student no apareado (\*p<0,05). U (g/L): C=0,48 ± 0,03, T= 0,52 ± 0,04; Ca (mg/dL): C= 9,0 ± 0,9, T= 8,9 ± 0,7; Cl<sub>PAH</sub> (mL/min/100 g p.c.): C = 2,03 ± 0,27, T = 2,95 ± 0,27\*. Expresiones de Oat1 y Oat3 (%) en H y MP:

	Oat1 H(n=4)	Oat1 MP(n=4)	Oat3 H(n=4)	Oat3 MP(n=4)
C	100 ± 8	100 ± 4	100 ± 5	100 ± 4
T	64 ± 9*	135 ± 10*	134 ± 10*	124 ± 6*

Los datos obtenidos con Western blotting fueron confirmados por los estudios inmunohistoquímicos. El aumento observado en la expresión de Oat1 y Oat3 en MP explicaría al menos en parte, la mayor eliminación renal de PAH en los animales con calcificación distrófica.

### 564. (126) POTENCIACIÓN DE LOS EFECTOS VASOCONSTRICTORES DE LA SEROTONINA (5-HT) POR LOS INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA RECAPTACIÓN DE 5-HT EN VASOS UMBILICALES HUMANOS.

Armesto A.<sup>1</sup>; Kilstein Y.<sup>2</sup>; Daray F.<sup>3</sup>; Valenzuela M.<sup>4</sup>; Rothlin R.<sup>5</sup>; Errasti A.<sup>6</sup>

*Tercera Cátedra de Farmacología Fac. Medicina UBA*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>

arnaldoarmesto@yahoo.com.ar

La 5-HT contrae la vena (VUH) y arteria umbilicales humana (AUH) a través de receptores 5-HT<sub>1B</sub> y 5HT<sub>2A</sub>. La 5-HT es captada por un transportador específico. El objetivo fue evaluar la respuesta contráctil a 5-HT en presencia y ausencia de inhibidores selectivos del transportador de 5-HT, fluoxetina (F) y citalopram (C). Se montaron anillos de VUH y AUH en baños de órgano aislado. Después de 2 hs los anillos fueron incubados con y sin inhibidores por 30 min y luego se realizaron curvas concentración-respuesta (CCR) a 5-HT. Citalopram 10 nM potenció la CCR a 5-HT tanto

en VUH (control: pCE<sub>50</sub> = 7.69 ± 0.08, n=6; C: pCE<sub>50</sub> = 8.00 ± 0.17, n=7, p<0.05) como en AUH (control: pCE<sub>50</sub> = 7.76 ± 0.11; C: pCE<sub>50</sub> = 8.20 ± 0.08, n=7, p<0.05). Citalopram 100 nM no modificó la CCR a 5-HT, mientras que 1 μM produjo un corrimiento a la derecha de la CCR en AUH (control: pCE<sub>50</sub> = 7.76 ± 0.11; C: pCE<sub>50</sub> = 7.27 ± 0.10, n=7, p<0,05) pero no se observaron diferencias significativas en VUH (control, pCE<sub>50</sub> = 7.69 ± 0.08, n=6; C: pCE<sub>50</sub> = 7.60 ± 0.13, n=7). Fluoxetina 10 nM potenció la CCR a 5-HT tanto en VUH (control: pCE<sub>50</sub> = 7.71 ± 0.10, n=9; F: pCE<sub>50</sub> = 7.94 ± 0.11, n=7, p<0.05) como en AUH (control: pCE<sub>50</sub> = 7.46 ± 0.14; F: pCE<sub>50</sub> = 7.93 ± 0.19, n=3, p<0.05). Fluoxetina (100 nM) no modificó la CCR a 5-HT, mientras que 1 μM produjo un corrimiento a la derecha de la CCR tanto en VUH (control: pCE<sub>50</sub> = 7.71 ± 0.10, n=9; F: pCE<sub>50</sub> = 6.79 ± 0.13, n=8, p<0.05) como en AUH (control: pCE<sub>50</sub> = 7.46 ± 0.14; F: pCE<sub>50</sub> = 6.89 ± 0.25, n=3, p<0.05). En ambos vasos, los inhibidores potenciaron las CCR a 5-HT en concentraciones acordes a sus IC<sub>50</sub> para la recaptación de 5-HT (C: IC<sub>50</sub> = 1.8 nM; F: IC<sub>50</sub> = 6.8 nM). Estos resultados son consistentes con la presencia de un mecanismo eficiente de recaptación extraneuronal, dado que estos vasos no se hallan invadidos. Por otro lado, con mayores concentraciones de los inhibidores se observó un corrimiento a la derecha de la CCR a 5-HT, causado posiblemente por un bloqueo de los receptores a 5-HT.

### 565. (206) BENZNIDAZOL (BZL) MODULA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE DROGAS EN HÍGADO DE RATA Y EN LA LÍNEA CELULAR HEPG2.

Perdomo V.<sup>1</sup>; Rigalli J.<sup>2</sup>; Luquita M.<sup>3</sup>; Villanueva S.<sup>4</sup>; Ruiz M.<sup>5</sup>; Mottino A.<sup>6</sup>; Echenique C.<sup>7</sup>; Catania V.<sup>8</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>; *Área de Parasitología (Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Unr)*<sup>7</sup>; *Instituto de Fisiología Experimental*<sup>8</sup>  
virginiaperdomo@yahoo.com.ar

La expresión y actividad de proteínas transportadoras de drogas se modifica por el tratamiento con distintos compuestos resultando en interacciones droga-droga. BZL es la única droga disponible para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Se desconoce si BZL modifica la expresión de proteínas transportadoras de drogas y si esto podría afectar su propia excreción. OBJETIVO: Evaluar el efecto de BZL sobre la expresión de proteínas de flujo de drogas de origen murino y humano. Ratas Wistar macho adultas recibieron BZL (25 y 50 mg i.p./kg/día, 3 días consecutivos; n=3) o vehículo. En hígado se determinó la expresión de las proteínas canaliculares P-gp y Mrp2 por *western blotting*. A la dosis mayor, BZL indujo la expresión de P-gp (+170%) y no se observaron cambios significativos en los niveles de Mrp2 entre grupos. Además, células HepG2, derivadas de un hepatocarcinoma humano que retiene propiedades de hepatocitos, se trataron con BZL (2, 20 y 200 μM, n=3) o vehículo por 48 h, y P-gp y MRP2 se detectaron por *western blotting*. A la mayor concentración, BZL indujo P-gp (+78%) y MRP2 (+140%). MRP3 (transportador basolateral) no se modificó (control negativo). En el cultivo celular también se evaluó si BZL es transportado por P-gp. Las células se incubaron con BZL (0,5 mM, 2 h, n=3) en presencia o ausencia de verapamilo (inhibidor de P-gp, 100 μM). El contenido intracelular de BZL (medido por HPLC) fue mayor en las células incubadas con verapamilo (407 ± 39 vs 332 ± 21 pmoles BZL, p<0,05), indicando que su eflujo es parcialmente dependiente de P-gp. Conclusión: los resultados muestran diferencias en la regulación de los genes murinos y humanos de P-gp y Mrp2 por BZL. Considerando que estos transportadores son responsables de la excreción biliar de muchos compuestos endógenos y exógenos (incluyendo fármacos), su inducción por BZL podría tener implicancias clínicas importantes al modificar la biodisponibilidad de drogas co-administradas e inclusive la del propio BZL.

### 566. (244) CAPACIDAD PORTADORA Y PROMOTORA DE LA ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA DE FÁRMACOS DE UN NUEVO VEHÍCULO DERIVADO DEL ACEITE DE JOJOBA.

Maggia N.<sup>1</sup>; Manzo R.<sup>2</sup>

*Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Córdoba*<sup>1 2</sup>  
nmaggia@gmail.com

El Aceite de Jojoba (AJ) es una cera líquida, formada por una mezcla de ésteres de ácidos grasos monoinsaturados de cadena lineal de 20 a 22 átomos de C y alcoholes homólogos del mismo tamaño, con una instauración a cada lado de la unión éster. El AJ como vehículo de formulaciones cosméticas o farmacéuticas sólo tiene capacidad para disolver principios activos (PA) lipofílicos, pero no es de utilidad como portador de PA hidrofílicos. En nuestro laboratorio desarrollamos un producto derivado del AJ, que llamamos Aceite de Jojoba Hidrolizado (AJH)<sup>1</sup>, el cual contiene una dispersión acuosa de los ácidos grasos salificados y los alcoholes del AJ en forma libre, que conforman un sistema disperso bajo la forma de cristales líquidos. El AJH es un vehículo no irritante, viscoso, con propiedades tixotrópicas, capaz de incorporar PA lipofílicos e hidrofílicos. Se prepararon formulaciones modelo conteniendo Diclofenac al 1% en AJH (DICLO-AJH), y se realizaron estudios de permeación a través de piel de rata y epidermis humana en celdas de Franz, con temperatura constante de 37°C, y muestreo durante 24h. La cantidad de droga permeada a través de la piel se cuantificó por HPLC. En cada ensayo se comparó DICLO-AJH con productos de referencia (Voltarén emulgel® y Oxa gel®). En otro estudio se prepararon formulaciones conteniendo Aciclovir al 5% (ACV5%-AJH) y al 1% (ACV1%-AJH) que se compararon con el producto Lysovir®. Se pudo observar el efecto promotor de permeación del vehículo AJH respecto a las referencias comerciales, que fue de 2,3 veces para DICLO-AJH por sobre Voltarén y Oxa, en ambos casos y de 12 veces para ACV5%-AJH por sobre Lysovir en piel de rata. En piel humana la cantidad permeada de ACV fue muy similar en las formulaciones al 1% y al 5%, y no pudo detectarse permeación de Lysovir. Se puede concluir que AJH se comporta como promotor de permeación transdérmica de fármacos.

<sup>1</sup> Solicitud de Patente Argentina N° 20100101915

#### 567. (346) EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE GLICOPROTEÍNA-P EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE OVINOS

Ballent M.<sup>1</sup>; Lifschitz A.<sup>2</sup>; Wilkens M.<sup>3</sup>; Maté L.<sup>4</sup>; Muscher A.<sup>5</sup>; Virkel G.<sup>6</sup>; Schröder B.<sup>7</sup>; Lanusse C.<sup>8</sup>  
*Lab. Farmacología; Facultad de Ciencias Veterinarias; UNCPBA*<sup>1 2 4 6 8</sup>; *Department of Physiology, Univ. Vet. Med, Hannover, Alemania*<sup>3 5 7</sup>  
 mballent@vet.unicen.edu.ar

La glicoproteína-P (Gp-P) es una proteína perteneciente a la familia de transportadores celulares del tipo ABC. Gp-P transporta un importante número de sustratos desde el interior al exterior celular en diferentes tejidos. Poco se conoce sobre los procesos de transporte mediados por Gp-P en rumiantes, donde las particularidades de su fisiología digestiva hacen imposible la extrapolación de la información obtenida en otras especies animales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión y actividad de la Gp-P en el tracto gastrointestinal de ovinos. Adicionalmente se evaluó el efecto de la dexametasona (DXM), reconocido inductor enzimático, sobre la función y expresión de esta proteína. Dieciocho (18) ovinos Corriedale machos fueron divididos en dos (2) grupos experimentales. El grupo A recibió DXM (3 mg/kg, intramuscular, durante 7 días). Los animales del grupo B no recibieron tratamiento (Control). Los animales fueron sacrificados y muestras de hígado, duodeno, yeyuno e íleon fueron tomadas para la cuantificación de la expresión proteica (Western-blot) y génica (PCR en tiempo real) de la Gp-P. La actividad de la Gp-P se evaluó a través del transporte intestinal (íleon) de Rodamina 123 (Rod-123) con la técnica de Cámaras de Ussing. Se observó un elevado flujo de Rod-123 mediado por Gp-P en íleon (cociente de flujo= 5.32). La secreción de Rod-123 aumentó un 50% en los intestinos de ovinos tratados con DXM. La proteína Gp-P fue detectada en el hígado y los diferentes segmentos intestinales de ovino. El tratamiento con DXM no indujo un incremento en la expresión de proteína ni en los niveles tisulares del ARNm comparados con los obtenidos en los animales controles. En el duodeno, la expresión de Gp-P disminuyó significativamente en los animales tratados. La compresión de la actividad y distribución tisular de esta proteína permitirá modular las potenciales interacciones y mejorar la terapéutica con drogas que sean sustratos de la misma.

#### 568. (784) AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE EFLUJO BCRP EN PLACENTA POR EL TRATAMIENTO CRÓNICO CON EL ANTIRRETROVIRAL ZIDOVUDINA

Filia M.<sup>1</sup>; Di Gennaro S.<sup>2</sup>; Rubio M.<sup>3</sup>; Peroni R.<sup>4</sup>  
*Instituto de Investigaciones Farmacológicas CONICET UBA*<sup>1 2 3 4</sup>  
 ffilia@ffyba.uba.ar

La zidovudina ó AZT es un inhibidor nucleosídico de la transcriptasa inversa del VIH considerado de primera línea en la profilaxis de la transmisión vertical del virus en mujeres embarazadas seropositivas. La biodisponibilidad y la distribución de AZT pueden verse influenciadas por transportadores de eflujo tal como la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP). Dado que BCRP es importante en la limitación del pasaje de drogas a través de la barrera placentaria, el objetivo del presente trabajo fue investigar la posible modificación del perfil de expresión de BCRP en placenta a consecuencia del tratamiento oral crónico con AZT. A partir de los días 3 u 11 de preñez, ratas Sprague-Dawley recibieron 60 mg/kg de AZT o de su vehículo p.o., una vez al día durante 8 días. El día siguiente a la última administración, las ratas se sacrificaron y se extrajeron las placentas. Se realizó un homogenato total y dos centrifugaciones sucesivas a 600 y 10000 Xg conservando el sobrenadante en todos los casos. Las proteínas (20-30 mg) se separaron por electroforesis en SDS-page al 7% y se analizó por Western Blot la expresión de BCRP. La proteína b-actina sirvió como control de carga. Observamos que en el día 11, la intensidad de la banda correspondiente a BCRP (72 kDa) es máxima tanto en las ratas control como en las tratadas con AZT, siendo significativamente mayor en este último grupo (13±1%, p<0.05). Por otro lado, la abundancia de BCRP disminuye hacia el final de la preñez (día 19) en ambos grupos (control: 97±3%, p<0.001; AZT: 54±6%, p<0.001), pero continúa siendo significativamente mayor en las ratas tratadas con AZT (95±5%, p<0.001). Nuestros resultados sugieren que, independientemente del estadio gestacional, la expresión del transportador BCRP aumentaría en presencia de la zidovudina con el fin de limitar su llegada al feto y así disminuir sus efectos tóxicos potenciales.

#### 569. (325) ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DE UN EXTRACTO DE FRUTOS DE BROMELIA HIERONYMI EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA EN RATAS

Errasti M.<sup>1</sup>; Caffini N.<sup>2</sup>; Rotelli A.<sup>3</sup>; Pelzer L.<sup>4</sup>  
*LIPROVE, Departamento de Cs. Biológicas, Facultad de Cs. Exactas, UNLP, 47 Y 115, 1900 LA PLATA*<sup>1 2</sup>; *Lab. de Farmacología de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, UNSL, Chacabuco y Pedernera, 5700 San Luis*<sup>3 4</sup>  
 meerrasti@biol.unlp.edu.ar

La bromelina, un extracto acuoso de *Ananás comosus* Merr. (Bromeliaceae), se usa como terapia alternativa o complementaria a los glucocorticoides por su acción antiinflamatoria y su baja toxicidad la hace adecuada para el tratamiento de inflamaciones crónicas. Se ha sugerido que el efecto antiinflamatorio estaría mediado por la acción proteolítica de sus cisteinendopeptidasas. A partir de frutos de otra especie perteneciente a la familia Bromeliaceae, *Bromelia hieronymi* Mez, se han aislado y caracterizado al menos tres cisteinendopeptidasas, lo que ha llevado a formular la hipótesis de que un extracto de frutos de *B. hieronymi* parcialmente purificado podría presentar acción antiinflamatoria. Empleando el modelo de inflamación crónica "Test de granuloma" en ratas se ensayó la acción antiinflamatoria de un extracto crudo de frutos de *B. hieronymi* parcialmente purificado por precipitación etanólica y posterior redisolución en buffer fosfato (PER). A efectos comparativos, un grupo de animales fue tratado con una dosis equivalente en actividad proteolítica (30 UCas/Kg) de bromelina de tallo (Sigma) y otro con dexametasona (7 mg/Kg). Todas las drogas fueron administradas intraperitonealmente. Los porcentajes de inhibición del granuloma respecto al control fueron 34% para bromelina, 41% para el PER y 57% para dexametasona. El ANOVA y posterior evaluación por test de Dunnett permitieron

concluir que los pesos de los granulomas de los grupos tratados con bromelina ( $p < 0,05$ ) y PER ( $p < 0,01$ ) se diferenciaron significativamente respecto a los del control. El resultado del test de Tukey ( $p < 0,05$ ) permitió concluir que no existen diferencias significativas entre los pesos de los granulomas de los grupos tratados con las drogas. Se puede concluir que el PER tiene acción antiinflamatoria al inhibir la formación del granuloma generado en ratas y que su efecto es similar al de una dosis con igual actividad proteolítica de bromelina.

**570. (626) EFECTOS DE LA VALERIANA OFFICINALIS SOBRE ORGANO AISLADO DE RATA WISTAR**

Arzac M.<sup>1</sup>; Di Corpo M.<sup>2</sup>; Arrieta B.<sup>3</sup>; Guerrini E.<sup>4</sup>; Brizuela N.<sup>5</sup>; Sesin J.<sup>6</sup>

Universidad Católica de Córdoba - Universidad Nacional de Córdoba<sup>1 2 3 4 6</sup>; Universidad Nacional de Córdoba; universidad Católica de Córdoba<sup>5</sup>  
sole\_arzac22@hotmail.com

**Introduction:** Valeriana officinalis is a plant used in folk medicine for anxiety and sleeping disorders, antioxidant effects, gastrointestinal disorders. **AIMS:** In this study we evaluated the effects on tone, amplitude and frequency of contractions induced by extract of Valeriana officinalis in isolated trips of duodenal and yeyuni. **Material and Method:** Animals used as experimental model were Wistar rats, adult females clinically healthy and with a weight average of 250 grams. We uses trips of duodenal and yeyuni. Each one of de segments mounted on two strips in a bath of organ insolated with Ringer lactate solution and glucose (3gr per liter) at 36 °C pH 7.3-7.4 and bubbled with 95% O<sub>2</sub>; 5% CO<sub>2</sub>. one of the strips was connected vertically to the button of the bath and the other to a transducer of tension connected to a Beckman polygraph. We applied 500 mg of basal tension. After the stabilization, the ethanolic extract of Valeriana officialinis was added in increasing doses. **Results:** In duodenal strips with 50 ml/ml it loded 30,11% the tone, 26,16% the frequency and 44,39% the amplitude. All these effects were over more important with increasing doses (100 ml). In yeyuni trips with 50 ml/ml doses, it lower 66,75% the tone, 8,31% the frequency and 50,37% the amplitude. With the first doses amplitude and tone decreased but frequency was modified significantly with higher concentration. **Conclusions:** Even though relaxing effects in smooth muscle were demonstrated, becomes necessary to realize a further studies to find the relation between doses and effects comparing it with others well known spasmolytics and to elucidate the active principles and mechanisms involved in this activity.

**571. (640) ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT AND ISOLATED COMPOUNDS OF URTICA CIRCULARIS**

Marrassini C.<sup>1</sup>; Acevedo C.<sup>2</sup>; Miño J.<sup>3</sup>; Ferraro G.<sup>4</sup>; Gorzalczy S.<sup>5</sup>;

Cátedra de Farmacognosia-iquimefa<sup>1 4</sup>; Cátedra de Farmacología-FFYB-UBA<sup>2 3 5</sup>  
cmarra@ffyub.uba.ar

It has been widely shown that many plant-derived substances have a relevant place in the process of development of new strategies to treat complains related with pain. *Urtica circularis* (Hicken) Sorarú is an Argentinean native herb used in folk medicine as a diuretic, antihypertensive, against hepatic affections and cough and for the relief of pain in inflammatory process. Taking into account that no pharmacological study has been carried out on the possible antinociceptive effect of this plant up to now, we studied this activity of the ethanolic extract of *U. circularis* and carry out a phytochemical analysis. The effects of the ethanolic extract of *U. circularis* on three classical nociception models in mice: the acetic acid-induced writhing, the formalin test and the hot plate test were tested. The pretreatment with *U. circularis* (10-500 mg/kg i.p.) produced a dose-dependent inhibition of the acetic acid-induced writhing response (ED50: 77.1 mg/kg). Besides, 500 mg/kg p.o. produced a significant inhibition of the writhing response (48.4%). To evaluate some of the possible mechanisms

involved in the antinociceptive response, yohimbine (1 mg/kg, i.p.), l-arginine (40 mg/kg, i.p.), l-NAME (20 mg/kg i.p.), glibenclamide (2 mg/kg i.p.) and atropine (2 mg/kg i.p.) were used. Only atropine significantly prevented the antinociception caused by *U. circularis*. In the formalin test, 30 mg/kg i.p or 500 mg/kg p.o. produced a marked reduction of 78.5 and 88.5% of the licking time in the late phase respectively, showing an ED50: 15.8 mg/kg i.p.. The antinociceptive effect was not reversed by pretreatment with naloxone. Moreover, the extract (250 mg/kg. i.p.) had no effect on thermal pain meanwhile morphine (10mg/kg s.c.) increased the latency time in hot plate test. Chlorogenic acid, caffeic acid, vitexin and apigenine were identified by HPLC method. In the writing test, chlorogenic acid and vitexin (10 mg/kg i.p.) showed a significant antinociceptive effect meanwhile caffeic acid produced a slight activity at the same dose and apigenin didn't produce any effect. In conclusion, the results of the present study demonstrated that the extract of *U. circularis* produced dose-related antinociceptive action in chemical models of nociception in mice. The activation of cholinergic systems seems to be one of the possible mechanisms through which the extract exerts its action. Vitexin and chlorogenic acid may be responsible of the effect observed.

**572. (746) SURFACTANTE PULMONAR: ANÁLISIS POR RESONANCIA DE ESPÍN ELECTRÓNICO (ESR) DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES INDUCIDOS POR PROTEÍNAS SÉRICAS Y CALCIO**

Martínez Sarrasague M.<sup>1</sup>; Cimato A.<sup>2</sup>; Rubin De Celis E.<sup>3</sup>; Facorro G.<sup>4</sup>

Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
mmartinezsarrasague@yahoo.com.ar

El Ca<sup>2+</sup> disminuye la viscosidad de los surfactantes pulmonares exógenos (SPE), esto facilitaría la administración de las formulaciones farmacéuticas. En numerosas patologías, la terapia con surfactante resulta ineficaz debido a la presencia de proteínas séricas que lo inactivan. Por lo tanto interesa conocer la naturaleza de dicha interacción y el posible efecto de la adición de Ca<sup>2+</sup> en la mejora de preparaciones terapéuticas. El objetivo de este trabajo es estudiar los cambios en la microestructura del SPE adicionado con proteínas séricas y Ca<sup>2+</sup>, y analizar su relación con las propiedades biofísicas del mismo. El SPE fue adicionado e incubado con suero, albúmina, gamma globulinas o Ca<sup>2+</sup>. La tensión superficial (TS) se midió con un surfactómetro de burbuja pulsátil y la viscosidad aparente (VA) con un viscosímetro rotacional de cono-plato a 384 s<sup>-1</sup>. Por ESR usando 5 y 16 doxil-estearico como sondas marcadoras, se estudiaron cambios conformacionales y de fluidez mediante el análisis de los parámetros espectrales A/B, S y t. Suero, albúmina o gamma adicionados al SPE en concentraciones superiores a 10 mg/ml disminuyeron significativamente la VA ( $p < 0.01$ ). Solamente la albúmina disminuyó la relación A/B. t aumentó en presencia de suero y albúmina; S aumentó con el suero pero no con la albúmina ( $p < 0.01$ ). La adición de gamma globulinas no provocó cambios en los parámetros espectrales analizados, lo mismo ocurrió con el Ca<sup>2+</sup>. Las medidas de TS indicaron que la presencia de gamma y albúmina no modificaron la actividad tensioactiva del SPE, mientras que el suero sí lo inactivó ( $p < 0.01$ ). En conclusión: la interacción de la albúmina genera cambios estructurales diferentes a los provocados por otras proteínas presentes en el suero; la modificación en la microestructura inducida por la albúmina no sería la responsable de la pérdida de la actividad; no se detecta que la gamma altere la estructura del SPE; el Ca<sup>2+</sup> disminuye la macroviscosidad sin alterar la microestructura del SPE.

**573. (774) FÁRMACOS HIPOURICEMIANTES EN LA TERAPIA ANTIHIPERTENSIVA**

Urdugo Calderon R.<sup>1</sup>; Wendel G.<sup>2</sup>; Trujillo L.<sup>3</sup>; Fuentes L.<sup>4</sup>

Universidad Nacional de San Luis<sup>1 2 3 4</sup>  
rodverd1@yahoo.com.ar

Estudios epidemiológicos reportan asociación positiva entre los niveles de ácido úrico y el riesgo de hipertensión (HTA). La

hiperuricemia es una de las complicaciones más comunes relacionada con el inicio de HTA, así como la HTA puede incrementar el índice de hiperuricemia. El control de la hiperuricemia es crítico en la terapia antihipertensiva. Las causas de la hiperuricemia en pacientes HTA pueden ser múltiples, una disminución de la excreción del ácido úrico urinario puede atribuirse al tratamiento con diuréticos. El objetivo fue analizar el uso de diuréticos como terapia antihipertensiva en pacientes hiperuricémicos. Se realizó un estudio retrospectivo en 666 individuos hipertensos (> 20 años) de un Instituto Cardiológico. Se documentaron: edad, sexo, HTA, hiperuricemia, y tratamientos terapéuticos. Se usó el programa SPSS (Versión 12.0) para el análisis estadístico. La población presenta las siguientes características: edad  $55,6 \pm 13,0$  años, peso  $85,7 \pm 17,4$  kg. Las drogas utilizadas en el tratamiento antihipertensivo incluyen: 58,0% inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, 50,0% beta bloqueantes, 24,0% bloqueantes de los canales de calcio, 32,0% antagonistas de los receptores de angiotensina II, 8,0% diuréticos y 10,0% terapia combinada (hidroclorotiacida y otra droga). La terapia hipouricemiantes en pacientes hipertensos representó el 7,8% (89,3% allopurinol; 7,1% allopurinol + colchicina; 3,6% Colchicina). El allopurinol fue el principal hipouricemiantes utilizado con la terapia antihipertensiva. En nuestra población el uso de diuréticos representó un 18% con el riesgo que esto implica. Es importante el cuidado de la terapia antihipertensiva con diuréticos o drogas combinadas que los posean, para prevenir un tratamiento que induzca la aparición o el exacerbamiento de la hiperuricemia. La presencia de hiperuricemia en un sujeto hipertenso debe alertarnos para extremar las precauciones en el control global de su riesgo cardiovascular.

**574. (778) DETECTION OF ERGOT DERIVATES FROM IPO-MOEAE CARNEA RESPONSIBLE OF ADDICTIVE EFFECT IN INTOXICATED GOATS**

Cholich L.<sup>1</sup>; Ana T.<sup>2</sup>; Camargo F.<sup>3</sup>; Rios E.<sup>4</sup>; Acosta O.<sup>5</sup>  
*Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste*<sup>2 3 4 5</sup>  
 cholichlu1981@hotmail.com

*Ipomoea carnea* is a toxic plant, able to generate a poisoning in the goats, it is characterized by hepatic damage, nervous upheavals and death. The addiction in ruminant is commonly cited as a clinical sign of *Ipomoea* intoxication. The main objective of the present study was identify the possible alkaloid responsible for this preference. 1 g of the dry leaves were powdered and extracted by maceration with methanol for 72 h. Thereafter, the extracts were filtered under vacuum and concentrated using a rotary evaporator. It was come to make different tests for the d-Lysergic acid detection. Such were fluorescence test (365 nm), chromatic test (Dragendorff and Van Urk-Erlach reagents) and thin-layer chromatographic (TLC) procedure based on the use of silica gel GF as adsorbent and chloroform-methanol (9:1) as eluent. The extract of dry leaves *I. carnea* was analyzed by TLC, this showed seven fluorescent spot at Rf of 0; 0,02; 0,03; 0,07; 0,10; 0,26; 0,41; 0,67 and 0,76. Three fluorescent blue spot at 365 nm with Rf of 0,02, 0,41 and 0,67 have been visualized and gave a positive reaction with Van Urk reagent. The results demonstrated the presence of derivatives del ergot.

**575. (813) ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF CHILIOTRICHUM DIFFUSUM (ASTERACEAE) FLOWERS EXTRACTS CONTAINING FLAVONOIDS**

Alcalde S.<sup>1</sup>; Córdoba O.<sup>2</sup>; Gorzalkzany S.<sup>3</sup>; Flores M.<sup>4</sup>; Taira C.<sup>5</sup>  
*Farmacología I y II, Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB*<sup>1</sup>; *Química Biológica II, CRIDECIT, Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB, Km 4, Comodoro Rivadavia*<sup>2</sup>; *Farmacología e INFIBIOC, FFyB, UBA Junín 956 1113, Buenos Aires, Argentina*<sup>3 5</sup>; *Farmacognosia, CRIDECIT, Facultad de Ciencias Naturales, UNPSJB, Comodoro Rivadavia*<sup>4</sup>; *sandyalcalde@hotmail.com*

*Chiliotrichum diffusum* (Asteraceae), known as "mata negra", "kooor" (Shelkman u Ona), is an endemic specie growing in South America (SW of Argentina). In folk medicine had been described with ophthalmic uses. In this work we studied antinociceptive and anti-inflammatory effects of decoction (DF) and the aqueous purification fraction (Wp-DF) from them. Flowers were collected in Santa Cruz, Argentina, in summer of 2006 and air-dried after its collection. Powdered flowers were extracted by decoction and purification with solvents. Antinociceptive tests (hot plate and writhing tests) were carried out in mice and carrageenin anti-inflammatory test was carried out in rats. In addition, we also analyzed the flavonoids group and the content of total phenolics and flavonoids in Wp-DF. Aqueous fraction of the purification decoction showed flavonol glycosides: quercetagenin-7-O-glucoside, quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-robinobioside-7-O-rha and the other derivatives from kaempferol and quercetin. The proportion of total phenols results of the 7.3% and the flavonoids, an 18.7%. The doses-related antinociceptive response were obtained in the writhing test were 30, 125, 250 y 500 mg/kg, i.p.; and 500 mg/kg p.o. (percentage of inhibition 62%); this effect was not antagonized by pretreatment with atropine 2 mg/kg i.p. Significant effect was obtained in the hot-plate test with a doses 500 mg/kg. This effect were antagonized by pretreatment with naloxona 5 mg/kg i.p. Aqueous extract were analyzed for anti-inflammatory activity with the carrageenan-induced paw edema in rats. The extracts showed this activity in a dose 100 mg/kg i.p in the test. The results obtained indicate that *Chiliotrichum diffusum* has analgesic and topical anti-inflammatory activities.

**576. (440) INTERRELACIONES ENTRE LOS SISTEMAS NITRÉRGICO, DOPAMINÉRGICO Y NEUROTENSINÉRGICO CON LA ACTIVIDAD DE LA NA+, K+-ATPASA NEURONAL.**

López Ordieres M.<sup>1</sup>; Budriesi P.<sup>2</sup>; Rodríguez De Lores Arnaiz G.<sup>3</sup>  
*IBCN*<sup>1 2 3</sup>  
 glopez@ffyub.uba.ar

El óxido nítrico (NO) es un mensajero intercelular que participa en diversas funciones del SNC, en la maduración y la sinaptogénesis durante el desarrollo neuronal. La administración de un inhibidor de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOs) a ratas neonatas produce cambios bioquímicos de la esquizofrenia en animales jóvenes (35 días) y adultos (56 días). Previamente habíamos demostrado que el péptido neurotensina (NT) inhibía la actividad de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa neuronal, efecto mediado por el receptor NTS1 y totalmente prevenido por la administración de L-NAME en el período postnatal. Para demostrar que el tratamiento con L-NAME era adecuado, se realizaron pruebas conductuales en un campo abierto observándose que las actividades locomotora y exploratoria eran significativamente diferentes entre los animales jóvenes y adultos. Además, se realizaron ensayos de fijación de los radioligandos [<sup>3</sup>H]-ouabaína (para el sitio de K<sup>+</sup> de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa) y [<sup>3</sup>H]-NT a membranas de corteza cerebral y cuerpo estriado. En los animales inyectados postnatalmente con L-NAME, la presencia de  $1 \times 10^{-6}$  M NT disminuyó la fijación específica de [<sup>3</sup>H]-ouabaína 23% en membranas estriales de animales jóvenes y 57% en membranas corticales de animales adultos. En las membranas de animales controles de ambas edades, la inhibición por la NT fue sólo del 14%. Se sabe que la NT es un modulador del sistema dopaminérgico y que los bloqueantes dopaminérgicos (como el haloperidol) son empleados en el tratamiento de la esquizofrenia. Nos interesó estudiar la fijación de [<sup>3</sup>H]-NT a membranas luego de alterar la síntesis de NO por la administración neonatal de L-NAME, en condición de bloqueo de los receptores dopaminérgicos. La fijación específica de [<sup>3</sup>H]-neurotensina a membranas de corteza cerebral de ratas inyectadas con haloperidol, sin tratar con L-NAME, aumentó 56%, mientras que con el tratamiento combinado, se observó una disminución del 40% en la fijación del ligando. Estos resultados estarían sugiriendo una interrelación en el funcionamiento de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa neuronal y de los sistemas nitrérgico, dopaminérgico y neurotensinérgico.



## CARDIOVASCULAR 3

**577. (228) PAPEL DE LA AUTOFAGIA (AF) EN LA RECUPERACIÓN POST-ISQUEMICA DE AURICULAS IZQUIERDAS AISLADAS DE RATA SOMETIDAS A ISQUEMIA SIMULADA-REPERFUSIÓN**Hermann R.<sup>1,2</sup>; García Allevi M.<sup>2</sup>; Limeres M.<sup>3</sup>; Torresin M.<sup>4</sup>; Marina Prendes M.<sup>5</sup>; Savino E.<sup>6</sup>; Varela A.<sup>7</sup>*Cátedra de Fisiología, FFYB, UBA, IQUIMEFA-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*

romina\_hermann@yahoo.com.ar

La AF es activada bajo condiciones de privación de nutrientes e hipoxia como ocurre en la isquemia. El objetivo fue estudiar el papel de la AF en la injuria por isquemia-reperfusión. Se trabajó con aurículas izquierdas aisladas de ratas hembras Sprague-Dawley, sometidas a isquemia simulada (Is) (75 min)-reperfusión (Rp) (75 min) en ausencia y en presencia de 3-metiladenina (MA) 5 mM, inhibidor específico de la AF. Las aurículas fueron montadas isométricamente en baños tisulares de doble pared mantenidos a una temperatura constante de 31°C, estimuladas a 60 pulsos/minuto e incubadas en medio Krebs-Ringer CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> conteniendo glucosa 10 mM, gaseado con O<sub>2</sub> 95% - CO<sub>2</sub> 5%, pH 7,4. Luego de 60 min de estabilización, se inició la isquemia simulada reemplazando el O<sub>2</sub> por N<sub>2</sub> y la glucosa 10 mM por 2-desoxiglucosa 10 mM, pH 6,8-7,0. La contractilidad se evaluó mediante la fuerza pico de contracción y la contractura con la tensión de reposo. Se midió la viabilidad celular con la técnica espectrofotométrica (ε 550 nm) del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol. Se empleó ANOVA, n=6. La incidencia de arritmias fue analizada mediante el test del χ<sup>2</sup>. La MA administrada durante los 150 min posteriores a los 60 min de estabilización careció de efectos en aurículas incubadas en aerobiosis con medio normal. En aurículas sometidas a Is-Rp dicho inhibidor no modificó la fuerza pico de contracción ni la viabilidad celular, pero generó desarrollo de contractura durante los primeros minutos de Rp (5 min: 18±8 vs 3±1%; 10 min: 14±7 vs 0,5±0,4 % p<0,05). Por otro lado, durante toda la Rp se observó la aparición de arritmias severas en presencia del inhibidor, hecho que no fue observado en su ausencia.

	n	Incidencia de arritmias (%) durante la Rp				
		10 min	20 min	35 min	55 min	75 min
Control	6	0	0	0	0	0
MA	6	67*	50*	33*	67*	67*

\*p&lt;0,001 vs control

Los resultados sugieren que la inhibición de la AF bajo estas condiciones experimentales sería nociva para la recuperación funcional post-isquémica.

**578. (531) DISMINUCION DE LA RESERVA INOTROPICA EN UN MODELO DE RATON TRANSGENICO CON SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GSÁ E HIPERTROFIA MIOCÁRDICA SECUNDARIA AL EJERCICIO.**Wilensky L.<sup>1</sup>; Matorra F.<sup>2</sup>; Kerman C.<sup>3</sup>; Morales C.<sup>4</sup>; Gelpi R.<sup>5</sup>*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
lucianawilensky@hotmail.com

El efecto de la hiperactividad simpática sobre la reserva inotrópica en el miocardio con hipertrofia secundaria al ejercicio es controversial. El objetivo fue evaluar en ratones transgénicos (TG) con sobreexpresión cardíaca específica de la proteína G<sub>s</sub>α e hiperactividad simpática la reserva inotrópica y cronotrópica después del ejercicio y compararlos a otro grupo con estrés simpático pero sin hipertrofia. Grupos experimentales: grupo 1 (G1, n=9): estos ratones no TG realizaron natación (2 sesiones de 90 min diarias, durante 6 días a la semana, en un total de 28 días); G2 (n=4): ratones no TG realizan un protocolo de ejercicio de 5

minutos diarios (6 días a la semana, en un total de 28 días), y G3 (n=7): ratones TG con sobreexpresión de la proteína G<sub>s</sub>α e hiperactividad simpática sometidos al mismo ejercicio que G1. Antes del sacrificio, los 3 grupos fueron anestesiados y se les administró isoproterenol (4 ug/kg). El cociente peso del ventrículo izquierdo/peso del ratón, un índice de hipertrofia, fue de 4.09±0.08 en el G1, de 3.06±0.32 en el G2 (P<0.05 vs. G1 y G3) y 3.96±0.16 en el G3 (P<0.05 vs. G1 y G2). La máxima velocidad de ascenso de la presión ventricular izquierda, +dP/dt<sub>max</sub>, aumentó 35,34±3,95% en el G1, 71,15±3,06% en el G2 (P<0.05 vs. G1 y G3) y 13,68±5,56% en el G3 (P<0.05 vs. G1 y G2). La frecuencia cardíaca aumentó 44,06±7,27% en el G1, 61,73±13,10% en el G2 y 21,46±7,52% en el G3 (P<0.05 vs. G1 y G2). Así, los ratones TG con hiperactividad simpática desarrollan hipertrofia miocárdica secundaria al ejercicio, pero con reserva inotrópica y cronotrópica disminuida. Por otro lado, los ratones no TG con hiperactividad simpática aguda pero mantenida en el tiempo aumentan la reserva inotrópica y mantienen la cronotrópica. Estos datos sugieren que la hiperactividad simpática crónica tiene un efecto deletéreo que predomina sobre el efecto benéfico de la hipertrofia inducida por ejercicio.

**579. (537) MECÁNICO-ENERGÉTICA DE UN MODELO DE HIPOPERFUSIÓN-REPERFUSIÓN EN CORAZONES DE RATA Y EFECTO CARDIOPROTECTOR DEL CLONAZEPAM.**Colareda G.<sup>1</sup>; Consolini A.<sup>2</sup>*Cátedra de Farmacología Facultad de Ciencias Exactas UNLP<sup>1 2</sup>*

colareda83@hotmail.com

La isquemia-reperfusión cardíaca genera una disfunción contráctil y energética con diverso grado según el modelo en estudio. En trabajos previos demostramos que en la isquemia de no flujo-reperfusión (I/R) del corazón de rata, la mitocondria aporta Ca<sup>2+</sup> para regular la recuperación contráctil post-isquémica (RCPI), y el pretratamiento con clonazepam (Clzp, inhibidor del mNXC) reduce la RCPI. El objetivo de este trabajo fue evaluar la función del mNXC mitocondrial en un modelo de isquemia de hipoperfusión-reperfusión (Hip/R). Se estudió el comportamiento mecánico-calorimétrico de la Hip/R en corazón de rata en ausencia (C) y presencia de pretratamiento con 10 μM Clzp (C+Clzp). En corazones aislados de rata perfundidos por técnica de Langendorf con Krebs-2 mM Ca<sup>2+</sup> en un calorímetro de flujo a 37°C, latiendo a 2 Hz, se midió la presión intraventricular isovolumétrica (en mmHg.) calculando la sistólica (P) y la diastólica (LVEDP), y el flujo de calor total (Ht en mW/g), antes y durante la reducción del flujo desde 6 a 1.2 ml/min durante 45 min (Hip) y reperfusión a 6 ml/min por otros 45 min (R). *En corazones C:* la Hip redujo P hasta un 5.2±5.2% de la inicial (Pi: 100±24mmHg, n=7) y Ht desde 27.7±2.7 hasta 3.9±1.1 mW/g, y elevó la LVEDP en +13.4±2.4 mmHg. Durante R, generó un nuevo DLVEDP de +19.5±2.7 mmHg y una RCPI de hasta 32.6±8.3% de Pi con un Ht del 64.6±9.1% del Hti. *En corazones pretratados con C+Clzp:* la Hip no alteró LVEDP (D: -4.3±5.4 mmHg, n=7) aunque se produjeron las mismas caídas de P y Ht que en C. Durante la R, mejoró la RCPI al 55.5±11.1% de Pi (p<0.001 vs C en todo R) y Ht al 90.9±11.6% de Hti (p<0.05 vs C en R). Los resultados sugieren que: a) clonazepam ejerce un efecto cardioprotector en el modelo de Hip/R, contrario al producido sobre la I/R de corazones de rata, b) la mitocondria ejercería un efecto deletéreo liberando Ca<sup>2+</sup> vía el mNXC al citosol que contribuye a la contractura diastólica y a la disfunción contráctil. UNLP-X-513.

**580. (696) EL TRICHOSTATIN (TSA), UN INHIBIDOR DE DEACETILASA DE HISTONAS, AFECTA LA EXPRESIÓN DE TRH EN CULTIVOS NEURONALES.**Landa M.<sup>1</sup>; García S.<sup>2</sup>; Gironacci M.<sup>3</sup>; Schuman M.<sup>4</sup>; Peres Dias L.<sup>5</sup>; Pirolo C.<sup>6</sup>*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari<sup>1 4 5 6</sup>, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari.UBA. IDIM-CONICET<sup>2</sup>; Facultad de Farmacia y Bioquímica.UBA. IQUIFIB-CONICET<sup>3</sup>*  
elenabarauskas@yahoo.com.ar

Además de su función endocrina, la TRH actúa en el sistema nervioso central regulando la función cardiovascular. La modificación de la cromatina afecta la expresión de genes aunque su implicancia en enfermedades cardiovasculares es casi desconocida. Así, estudiamos mecanismos epigenéticos involucrados en la regulación del gen de TRH encefálica. Testeamos el efecto de TSA, sobre la expresión de TRH en cultivos neuronales de neonatos SHR y WKY y se les extrajo diencéfalo y tallo encefálico para el cultivo primario de las neuronas. Se estimuló con TSA (100, 500, 1000 nM) durante 24hs, se extrajo RNA de las células y se evaluó la expresión génica mediante retrotranscripción y PCR en tiempo real utilizando B-actina como control de carga. Un estudio de curso temporal previo con 500nM mostró que el máximo efecto observado fue a las 24hs. Los resultados corresponden a la relación TRH/Bactina y se expresan como media  $\pm$  E.S., ANOVA, Test de Fisher. El nivel basal de expresión de TRH fue mayor en las ratas SHR vs WKY ( $1.3 \pm 0.30$  vs.  $0.4 \pm 0.30$ ,  $p < 0.03$ ,  $n = 4/\text{grupo}$ ), evidenciando que el mecanismo de expresión diferencial entre las cepas en la edad adulta previamente descrito, está presente al nacer y se mantiene "in vitro". El tratamiento no afectó la expresión de TRH en las células WKY a ninguna concentración. Por el contrario, al evaluar el efecto del TSA sobre las neuronas de SHR se observó que a la dosis de 500 nM la expresión del gen disminuyó respecto al control ( $0.14 \pm 0.29$  vs  $1.30 \pm 0.30$ ,  $p < 0.03$ ,  $n = 4/\text{grupo}$ ), el tratamiento no afectaría la viabilidad celular ya que ni el conteo celular ni el índice BAX/BCL2 presentaron cambios respecto al control. De esta manera demostramos en cultivos primarios de neuronas que el TSA disminuye la expresión del gen de TRH evidenciando cambios en la regulación epigenética, como la acetilación de histonas, en las SHR sugiriendo que este mecanismo puede ser importante en el desarrollo de la hipertensión arterial.

**581. (741) LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS POR ESTIMULACIÓN VAGAL EFERENTE PRE ISQUEMICA AUMENTA EL TAMAÑO DE INFARTO DE MIOCARDIO EN CONEJOS**

Buchholz B.<sup>1</sup>; Rodríguez M.<sup>2</sup>; Ivalde F.<sup>3</sup>; Alvarez Yuseff M.<sup>4</sup>; Donato M.<sup>5</sup>; Gelpi R.<sup>6</sup>  
*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular. Facultad de Medicina. UBA*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 bbuchholz@fmed.uba.ar

Existe evidencia que la estimulación vagal (EV) induce efectos cardioprotectores y que la administración de acetilcolina mimetiza el preconditionamiento isquémico. Sin embargo, no existen datos concluyentes acerca de los efectos de la EV *in vivo* sobre el tamaño del infarto de miocardio con reperusión. El objetivo fue evaluar los efectos de la EV sobre el tamaño de infarto. Se utilizaron conejos a los que se les realizó isquemia miocárdica regional de 45 min seguida de 4 hs de reperusión (G1, n=9). En el grupo 2 (G2; n=6) se repitió el protocolo anterior pero se aplicó 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. En el grupo 3 (G3, n=4) se repitió el protocolo de G2 pero se administró atropina durante la EV. En otros experimentos se repitió el protocolo de G2 pero se administró durante la estimulación un bloqueante adrenérgico  $\alpha$ 1selectivo de acción corta (Esmolol) (G4, n=7) o de acción larga (Atenolol) (G5, n=5). El área de riesgo se midió con Azul de Evans y las zonas infartadas se evaluaron utilizando TTC. El tamaño de infarto se expresó como porcentaje del área de riesgo. La EV aplicada antes de la isquemia aumentó significativamente el tamaño de infarto desde  $43,04 \pm 4,37$  a  $60,17 \pm 5,17\%$  ( $p < 0.05$ ). La administración de atropina durante la EV revirtió este efecto, reduciendo el tamaño de infarto a  $41,25 \pm 2,06\%$  ( $p < 0.05$  vs G2). La administración de esmolol y atenolol atenuaron el incremento del tamaño de infarto a  $50,14 \pm 4,15$  y  $50,00 \pm 2,92\%$ , respectivamente. Conclusiones: La estimulación vagal eferente, realizada antes de la isquemia, incrementa significativamente el tamaño de infarto a través de un mecanismo colinérgico muscarínico. Este efecto deletéreo es parcialmente revertido por bloqueo beta adrenérgico.

**582. (742) CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES DE RATAS SHR ALIMENTADAS CON FRUCTOSA**

Lembo C.<sup>1</sup>; Renna N.<sup>2</sup>; Diez E.<sup>3</sup>; Vazquez- Prieto M.<sup>4</sup>; Miatello R.<sup>5</sup>

*Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular IMBECU CONICET*<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 clembo@fcm.uncu.edu.ar

La administración crónica de fructosa a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) genera un modelo experimental de resistencia a la insulina (RI), que altera a las células progenitoras endoteliales (EPC) que llegan a los sitios de injuria endotelial y se diferencian hacia célula endotelial madura, contribuyendo así a la reparación vascular. *Objetivo:* Estudiar los cambios de cantidad y capacidad funcional de las EPC asociados a la RI presente en este modelo experimental. *Métodos:* Ratas Wistar Kyoto (WKY) y SHR macho, de 30 días se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos ( $n = 8$  c/u): I WKY: controles; II FFR: WKY recibiendo fructosa en agua de bebida al 10% (v/v) durante 8 semanas; III SHR; IV FFHR: SHR recibiendo fructosa (ídem II). Al final del protocolo se realizó: índice HOMA. Cuantificación de EPC en sangre periférica y médula ósea por citometría de flujo. Cultivo celular de EPC obtenidas por separación inmunomagnética. Morfología por tinción H&E, (IFI) de marcadores específicos CD34/VEGFR-2/CD133 en microscopio confocal y ensayo de formación de colonias. Los datos (media $\pm$ sem) se analizaron por ANOVA I. Los símbolos indican: \* $p < 0,01$  v WKY; ^ $p < 0,01$  v SHR; # $p < 0,01$  v FFR. *Resultados:*

Variable	WKY(n=8)	FFR (n=8)	SHR (n=8)	FFHR(n=8)
Índice HOMA	4,32 $\pm$ 0,10	7,20 $\pm$ 0,10*	10,93 $\pm$ 0,10*#	14,1 $\pm$ 0,40*#^
EPC MO (%)	0,30 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,01*^	0,25 $\pm$ 0,09	0,06 $\pm$ 0,02*^
EPC SP (%)	0,15 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	0,008 $\pm$ 0,005*^
Colonias /campo	3,4 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,9	1,25 $\pm$ 0,9*

El número de colonias es menor en SHR, a pesar de tener mayores niveles de EPC, hecho posiblemente atribuible a la mayor RI del grupo. Se observó por H&E morfología en "cobblestone" (adoquines). Por IFI se constató que el 100% de las células fueron CD34<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup>. *Conclusiones:* Los resultados sugieren que las EPC presentarían un acortamiento en su vida media y potencial clonogénico posiblemente atribuible a los niveles de RI a los que se encuentran expuestas en este modelo experimental.

**583. (750) EFECTO CARDIOPROTECTOR DE UN EXTRACTO NO ALCOHÓLICO OBTENIDO DE LA FERMENTACIÓN DEL MORTIÑO (VACCINIUM MERIDIONALE SWARTZ) CONTRA LA INJURIA POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

González Arbeláez L.<sup>1</sup>; Lopera Y.<sup>2</sup>; Pérez Núñez I.<sup>3</sup>; Fantinelli J.<sup>4</sup>; Schinella G.<sup>5</sup>; Mosca S.<sup>6</sup>

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares*<sup>1 3 4 6</sup>; *Cátedra de Farmacología Básica-CIC. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata*<sup>2 5</sup>  
 luisafgarbelaez@hotmail.com

Nuestro objetivo fue evaluar las propiedades antioxidante y cardioprotectora de un extracto no-alcohólico obtenido por fermentación del mortiño (arándano colombiano) (EM) en modelo de isquemia-reperusión (I-R). Se determinó en EM el contenido de fenoles totales (FT) y de antocianinas (A) y la actividad antioxidante frente a diferentes especies reactivas de oxígeno. Para evaluar los efectos en I-R, corazones aislados de ratas y perfundidos según la técnica de Langendorff fueron sometidos a los siguientes protocolos: 1) Control Isquémico (CI): 20 min de isquemia global y 30 min de reperusión y 2) EM: los corazones fueron tratados con 50 mg/mL del extracto 10 min antes de I y durante los 10 min iniciales de R. La función sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo fue evaluada a través de la presión desarrollada (PD) y de la presión diastólica final (PDF), respectivamente. Al final de R se evaluó en el tejido miocárdico la concentración de las sustancias

reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el contenido de glutatión reducido (GSH), la nitración de proteínas y la expresión de la óxido nítrico sintasa (eNOS / iNOS). El contenido de FT y A fue de 49 µg ac. cafeico/mg y 34 µg cianidina/mg, respectivamente. El EM mostró actividad antioxidante frente a los radicales superóxido y peroxinitrito e inhibió la peroxidación lipídica inducida en sistemas no enzimáticos. El tratamiento con EM mejoró significativamente la función contráctil postisquémica (PD:  $87 \pm 12\%$  vs  $20 \pm 12\%$  en los corazones CI; PDF:  $18 \pm 6$  vs  $79 \pm 6$  mmHg), disminuyó TBARS ( $13 \pm 1$  vs  $19 \pm 2$  nmol/g), preservó el contenido de GSH ( $240 \pm 10$  vs  $110 \pm 20$  nmol/g), mientras que el nivel de nitración proteica y la expresión de ambas NOS no se modificaron. Estos resultados muestran que el tratamiento con EM mejora la función miocárdica postisquémica, es decir, posee efecto cardioprotector en I-R, el que podría ser relacionado a la elevada capacidad antioxidante del extracto, sin la participación de las NOSs.

#### 584. (309) EFECTOS DEL PIRUVATO EN LA DISFUNCIÓN MECÁNICO-ENERGÉTICA DE CORAZONES DE RATA NEONATA Y ADULTA EXPUESTOS A ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Bonazzola P.<sup>1</sup>; Consolini A.<sup>2</sup>

Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Fac. Medicina, UBA-CONICET<sup>1</sup>; Cátedra de Farmacología, Fac. Cs. Exactas, UNLP<sup>2</sup>  
patri@biofis.odon.uba.ar

Es discutido el efecto protector de piruvato (Pyr) en corazones hipóxicos o isquémicos. En corazones de cobayo poscargados aumentó el potencial de fosforilación y  $VO_2$ . En corazones de rata adulta isovolumétricos Pyr 10 mM redujo la recuperación de corazones cardiopléjicos y lentificó la relajación, sugiriendo que afecta al RS. El objetivo de este estudio fue evaluar la incidencia del retículo sarcoplásmico (RS) en la cardioprotección (CP) del Pyr, comparando corazones de rata neonata (menor función de RS) con adulta (N vs A) en isquemia-reperfusión (I/R). Se perfundieron los corazones con Krebs (2 mM Ca, 30°C y 1 Hz) en un calorímetro y se determinó el flujo de calor (Ht, en mW/g) y la presión intraventricular (LVP en mmHg) calculando la máxima P. Se pretrataron con Krebs en ausencia (C) y presencia de Pyr 10 mM (C+Pyr) seguido de 45 min I/45 min R. Otro grupo de N fue pretratado y reperfundido con Pyr (C+Pyr-R+Pyr). Previo a I, Pyr dio inotropismo(-) (ino-) en A (-13.7±5.5% de Pi, n=6) e ino+ en N (+26.1±5.0% de Pi, n=14), en ambos con mayor Ht (+14.8±4.5% en A y +46.9±4.7% en N, p<0.05). En R, Pyr aceleró P% en N, pero no en A. Para dilucidar si la CP de Pyr en N es debida al ino+, se reperfundió con Pyr. La R+Pyr redujo la P% (a 15min R: 47.5±3.4= 50.6±6< 76.9±9.6% de Pi para R+Pyr, C y C+Pyr respect., ANOVA p=0.019). Pyr redujo la economía (Eco=P/Ht) pre-I (-17.4±3.3% en N y -22.3±3.7% en A) pero no afectó la caída de Eco propia de I/R en N (a 45min R: 54.5±4.3 vs 62.8±6.9% en C, NS) ni en A (67.0±4.6 vs 81.3±8.8% en C, NS). En R+Pyr (N) la Eco cayó al 37.3±5.1% (n=6, p=0.02). Conclusiones: a) el ino+ en N sugiere que Pyr induce a que el RS atenue el transitorio de  $Ca^{2+}$  en A; b) la CP en N se asociaría a alcalinización por lavado del Pyr, pues no se ve en los N con C+Pyr-R+Pyr; c) los  $\Delta Eco$  pre-I son similares en N y A e independientes del ino, asociándose a efectos metabólicos; d) el  $\Delta Eco$  en R+Pyr sugiere aditivos efectos metabólicos y acidificantes. X513-UNLP

#### 585. (314) PARTICIPACIÓN DE MECANISMOS INHIBITORIOS ESPINALES EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL EN RATAS TRATADAS CRÓNICAMENTE CON FRUCTOSA.

García M.<sup>1</sup>; Godoy Y.<sup>2</sup>; Rubio M.<sup>3</sup>; Celuch S.<sup>4</sup>;  
ININFCA (CONICET) y Cát Farmacología (FFyB, UBA)<sup>1</sup>;  
ININFA (CONICET)<sup>2 3 4</sup>  
scluch@ffyb.uba.ar

La administración crónica de fructosa en roedores induce varias condiciones de riesgo cardiovascular que forman parte del síndrome metabólico y de la diabetes tipo II. En este modelo

experimental se ha descrito una disfunción endotelial y sensorial perivascular, y también se observó un aumento en las respuestas a agentes presores inyectados por vía endovenosa. El objetivo del presente estudio fue evaluar si se producen alteraciones en los mecanismos regulatorios de la presión arterial a nivel espinal. Ratas macho Sprague-Dawley recibieron fructosa 10% en el agua de bebida (FR) o agua corriente (control, CN) durante 2 meses. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg, ip). Se colocó un catéter en la arteria femoral para el registro de la presión arterial (PA) y otro a nivel T<sub>12</sub>-L<sub>1</sub> de la médula espinal para la administración intratecal (it) de drogas. No hubo diferencias entre la PA media (PAM) de ratas anestesiadas CN y FR (99.6±2.8 mmHg y 98.9±3.5 mmHg respectivamente; n=32). Tampoco hubo diferencias entre las respuestas presoras inducidas por el agonista adrenérgico noradrenalina (100 nmoles, it) [ $\Delta PAM$  31.0±5.4 y 45.0±6.2 mmHg en CN (n=3) y FR (n=4) respectivamente], o por el agonista glutamatérgico N-metil-D-aspartato (30 nmoles, it) [ $\Delta PAM$  38.3±8.7 y 31.3±5.7 mmHg en CN (n=6) y FR (n=4) respectivamente]. En cambio, la fructosa previno la hipotensión inducida por la administración del endocanabinoide anandamida (100 nmol) [ $\Delta PAM$  -20.7±5.5 y 0.7±3.2 mmHg en CN y FR respectivamente; n=7; p<0.01] o del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (125 pmoles, it) [ $\Delta PAM$  -15.0±2.0 y -0.8±2.8 mmHg en CN (n=3) y FR (n=4) respectivamente; p<0.02]. Se sugiere que en patologías asociadas al síndrome metabólico podría haber una menor participación de mecanismos inhibitorios espinales en la regulación de la actividad preganglionar simpática, lo que podría resultar en un mayor tono vasomotor. Financiado por CONICET PIP 112-200801-00330.

#### 586. (390) INTERACCIÓN FUNCIONAL MITOCONDRIA-RETÍCULO SARCOPLÁSMICO EN LA CARDIOPROTECCIÓN CARDIOPLEJICA DE CORAZONES DE COBAYO EN ISQUEMIA-REPERFUSIÓN: ESTUDIO MECÁNICO-ENERGÉTICO Y FARMACOLÓGICO.

Ragone M.<sup>1</sup>; Consolini A.<sup>2</sup>

Cátedra de Farmacología Facultad de Ciencias Exactas UNLP<sup>1 2</sup>  
mariainesragone@hotmail.com

En trabajos previos encontramos que en corazones de rata la mitocondria (Mit) interacciona funcionalmente con el retículo sarcoplásmico (RS) durante la cardioprotección (CP) cardiopléjica de alta [K]<sub>o</sub>-baja [Ca]<sub>o</sub> (CPG) aportando  $Ca^{2+}$  para la recuperación contráctil post-isquémica (RCPI), efecto que es reducido por clonazepam (Clzp) y diazóxido (Dzx) (*J Card Pharmacol* 2009). El actual objetivo fue evaluar esa interacción en un corazón con menor reservorio del RS como el de cobayo, en un modelo de 30 min de isquemia y 45 min de reperfusión (I/R). Se midió simultáneamente la presión intraventricular máxima contráctil (P), la presión diastólica (LVEDP) y el flujo de calor total (Ht) de corazones perfundidos con Krebs latiendo espontáneamente en un calorímetro de flujo a 30°C en ausencia (C) y presencia de pretratamiento con CPG. La CPG indujo una RCPI hasta un 89.0±9.4% de P y del Ht hasta un 102.8±8.0% del valor pre-I. Se adicionaron a CPG las drogas: Clzp 10 µM (inhibidor del mNCX) aumentó la RCPI (al 115.3±12.1%, p<0.05 vs CPG) y Dzx 30 µM (inductor del mK<sub>ATP</sub>) aumentó RCPI solo al inicio (91.4±8.8%, p<0.05 CPG), ambos sin cambios en Ht (%) ni en los  $\Delta LVEDP$  propios de I/R. K-BR7943 5 µM (inhibidor del  $Ca^{2+}$ -uniporter [UCam] y del  $NXC_{SL}$ ) no modificó la RCPI, el %Ht ni los  $\Delta LVEDP$  vs. CPG. Además, CPG y CPG+Clzp 10 µM no modificaron la contractura inducida por 10 mM cafeína-baja [Na<sup>+</sup>] en la R (area-bajo-curva: 93359±5881 y 101266±7458 vs 102907±16726 mmHg.min en C, ANOVA: NS). Los resultados demuestran la CP aditiva por CPG, Clzp y Dzx, y una menor interacción funcional Mit-RS que en la rata, sugiriendo que: a) la CP de CPG estaría relacionada con aumento del transitorio de  $Ca^{2+}$  en R sin incrementar el reservorio del RS sensible a cafeína; b) el bloqueo del  $NXC_m$  por Clzp en CPG elevaría más el transitorio de  $Ca^{2+}$  sin alterar la carga del RS; c) la activación del mKATP potencia la CP-CPG, pero el UCam y el  $NXC_{SL}$  no participan significativamente de la CP. UNLP-X-513.

**587. (500) INCREMENTO EN LA RELACIÓN ÁCIDOS GRASOS LIBRES OMEGA 3/OMEGA 6 Y RIESGO VARDIOVASULAR EN CONEJOS ALIMENTADOS CON UNA DIETA RICA EN GRASAS**

Medina M.<sup>1</sup>; Scacchi F.<sup>2</sup>; Van Nieuwenhove C.<sup>3</sup>; Saad S.<sup>4</sup>; Peral De Bruno M.<sup>5</sup>; Jerez S.<sup>6</sup>  
*Facultad de Ciencias Naturales e IML de la Universidad Nacional de Tucumán<sup>1 2 4</sup>; Facultad de Ciencias Naturales e IML de La Universidad Nacional de Tucumán; Cerela (CONICET)<sup>3</sup>; Facultad de Medicina; INSIBIO CONICET<sup>5</sup>; Facultad de Ciencias Naturales e IML de la Universidad Nacional de Tucumán; INSIBIO CONICET<sup>6</sup>*  
 medmirta@yahoo.com.ar

Un consumo elevado de ácidos grasos  $\omega_6$  se vincula con la resistencia a la insulina, alteraciones hepáticas y enfermedades cardiovasculares (CDV). Por el contrario los ácidos grasos  $\omega_3$  demostraron proteger contra dichas patologías. Por lo tanto, la relación entre los ácidos grasos libres  $\omega_6/\omega_3$  permitiría evaluar el riesgo CDV. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la incidencia de una dieta rica en grasas (DG) en la relación  $\omega_6/\omega_3$  y la tolerancia a la glucosa, la presión arterial, la obesidad y la morfología hepática. Dos grupos de conejos machos híbridos de Flanders fueron alimentados con una dieta control (DC) o con una dieta rica en grasas (DG) durante 12 semanas. Se determinó tolerancia a la glucosa, presión arterial media (PAM) por método directo y peso. Se extrajo el hígado para dosar ácidos grasos libres por HPLC y realizar análisis histológico. En los resultados obtenidos se observó una relación ácidos grasos libres  $\omega_6/\omega_3$  en el hígado significativamente mayor en conejos con DG (21,6) con respecto a los DC (11), una curva alterada de glucosa (Glu) en los conejos con DG (Glu.Basal: 108,5±2,4; 60': 265±20; 120': 180,5±10,5 mg/dl), una mayor PAM (75,8±3,2 vs 62,7±5,1 mmHg) e incremento del peso (DC: 2172±178 vs DG: 2952±90 g). Además los conejos con DG presentaron esteatosis microvesicular, sin deformación de hepatocitos ni desplazamientos del núcleo a la periferia. En conclusión, el incremento de la relación entre los ácidos grasos libres  $\omega_6/\omega_3$  inducido por una DG, produciría modificaciones hepáticas tempranas y aumento de factores de riesgo CDV tales como la intolerancia a la glucosa, la presión arterial y la obesidad.

**588. (752) LA INHIBICIÓN DE LA QUINASA DEPENDIENTE DE CALCIO – CALMODULINA (CaMKII) FAVORECE LA RECUPERACIÓN MECÁNICA EN EL ATONTAMIENTO MIOCÁRDICO (AM) EN CONEJOS.**

Donato M.<sup>1</sup>; Mundiña-weilenmann C.<sup>2</sup>; D'annunzio V.<sup>3</sup>; Buchholz B.<sup>4</sup>; Gelpi R.<sup>5</sup>; Mattiazzi A.<sup>6</sup>  
*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular Fac. de Medicina UBA<sup>1 3 4 5</sup>; Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Fac Medicina UNLP<sup>2 6</sup>*  
 ramattia@med.unlp.edu.ar

En experimentos previos en roedores describimos un rol dual de las fosforilaciones dependientes de CaMKII, específicamente del sitio Thr<sup>17</sup> de fosfolamban (PLN), la proteína que regula el secuestro de Ca<sup>2+</sup> por la Ca-ATPasa del retículo sarcoplasmático, en la isquemia/reperfusion (I/R): Beneficioso en el atontamiento miocárdico (AM), pero deletéreo en la injuria irreversible por I/R. El mecanismo de este rol dual se desconoce. En este trabajo estudiamos el rol de la CaMKII en el AM en conejos sobre parámetros mecánicos y de fosforilación. Se perfundieron corazones de conejo (técnica de Langerdorff) y se sometieron a I/R (15/15 min). La contractilidad a los 15 min de la R, fue significativamente menor respecto a los valores pre-isquémicos (Presión desarrollada 45.6±3.3 vs 74.8±10.2 mmHg). La fosforilación del sitio Thr<sup>17</sup> de PLN aumentó significativamente al minuto de R (159±32.9% del control n=6), evidenciando un aumento en la actividad de la CaMKII al comienzo de R. La inhibición específica de CaMKII con KN-93 disminuyó significativamente la fosforilación del sitio Thr<sup>17</sup> de PLN y aumentó significativamente la recuperación mecánica durante la reperfusion respecto del grupo no tratado (Presión desarrollada por el ventrículo izquierdo: 74.8±5.5 vs. 51.5±3.4%

tratado vs. no tratado respectivamente), con disminución de la presión diastólica final y sin cambios en el tiempo de relajación. **Conclusiones:** A diferencia de lo que sucede en roedores, la actividad de CaMKII perjudicial para la recuperación mecánica del AM de conejo, una especie en la que el manejo de Ca<sup>2+</sup> intracelular es similar al del corazón humano. \*p<0.05 vs I/R. PIP 2139 a AM

**589. (760) ALDOSTERONA Y EGFR: DOS NUEVOS ESLABONES EN LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DISPARADA POR ANGIOTENSINA II**

Nolly M.<sup>1</sup>; Caldiz C.<sup>2</sup>; Ennis I.<sup>3</sup>; Chiappe De Cingolani G.<sup>4</sup>; Cingolani H.<sup>5</sup>  
*Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
 mariela.nolly@gmail.com

En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que la Angiotensina II (AngII) induce la producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) de origen mitocondrial y el aumento de la fosforilación de la ERK 1/2. Evidencias recientes sugieren la existencia de un mecanismo de transactivación entre AngII, Aldosterona (AL) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Con la finalidad de estudiar la presencia de este mecanismo en el miocardio, se determinó la fosforilación de ERK 1/2 en respuesta a ambos agonistas por Western blot en miocardio de rata. AL incrementó la P-ERK 1/2 (209.8 ± 18%), este efecto fue abolido cuando se bloqueó el receptor de mineralocorticoides con espironolactona (121 ± 4.0%) y el EGFR con AG1478 (104.5 ± 12.9%). El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también incrementó la fosforilación de ERK 1/2 (137 ± 2 %) efecto que no fue inhibido por espironolactona (149 ± 9.9%). Tanto AL como EGF indujeron un aumento de superóxido, determinado por quimioluminiscencia con lucigenina (166.1 ± 7.2% y 151 ± 9.1%; respectivamente), que fue abolido por espironolactona (111 ± 7.6 %) y AG1478 (102 ± 2.1%) en el caso de AL; mientras que nuevamente espironolactona no fue capaz de abolir el efecto de EGF (156 ± 10.4 %). Para explorar la participación de la mitocondria en esta cascada de eventos, determinamos fosforilación y producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en presencia del bloqueante de la cadena respiratoria Rotenona y de los canales de potasio dependientes de ATP, 5HD. Ambos inhibidores bloquearon la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la fosforilación de ERK 1/2 inducida por AL. Estos resultados sugieren que tanto la AL como el EGFR constituyen eslabones necesarios para la cascada de señalización disparada por Ang II que involucra la activación del sistema ERK 1/2 a partir de ROS derivados de la mitocondria.

**590. (712) IMPACTO BIOLÓGICO DE LAS PARTÍCULAS AÉREAS URBANAS DE BUENOS AIRES (UAP-BA) SOBRE EL SISTEMA CARDIORRESPIRATORIO.**

Orona N.<sup>1</sup>; Delfosse V.<sup>2</sup>; García Gras E.<sup>3</sup>; Tasat D.<sup>4</sup>  
*Universidad Nacional de San Martín, Escuela de Ciencia y Tecnología, Cesyma.<sup>1 2 3</sup>; Universidad Nacional de San Martín, Escuela de Ciencia y Tecnología, Cesyma; Universidad de Buenos Aires, FO-UBA.<sup>4</sup>*  
 naorona@gmail.com

Estudios epidemiológicos muestran una asociación entre la exposición al material particulado aéreo (MP) y aumentos en la morbo-mortalidad por enfermedades cardiopulmonares. A nivel cardiovascular, la comunicación célula a célula es imprescindible. Las uniones intercelulares entre los cardiomiocitos, conocidas como uniones gap, están constituidas por conexinas, siendo una de ellas conexina 43. Alteraciones en los niveles de expresión de estas proteínas, podrían provocar una variedad de patologías como arritmogénesis y remodelación eléctrica cardíaca. En el presente estudio comparamos sobre el sistema cardiorrespiratorio en un modelo murino la toxicidad de dos partículas ambientales: ROFA (residual oil fly ash) un conocido contaminante ambiental y UAP-BA. Ratonas Balb/c jóvenes (3 meses de edad) recibieron vía intranasal tres dosis diarias (0.17mg/kg de peso corporal) de ROFA o UAP-BA tres veces durante una semana. La respuesta pulmonar de animales controles y expuestos al MP se evaluó ana-

lizando la viabilidad de células del lavado bronqueoalveolar (BAL) y la apoptosis mediante TUNEL en cortes de tejido. En homogenatos de corazón se evaluaron los niveles de conexina 43, mediante la técnica de western blot en los tres grupos experimentales. Observamos que tanto UAP-BA como ROFA reducen la viabilidad celular en el BAL (Co:  $97.6 \pm 2.38\%$ , UAP-BA:  $82.25 \pm 3.40\%$ , ROFA:  $75.74 \pm 2.73\%$ ,  $p < 0.05$ ) y aumentan marcadamente la ocurrencia de apoptosis en tejido pulmonar (Co:  $1.44 \pm 0.12$  cél/campo, UAP-BA:  $5.20 \pm 0.41$  cél/campo, ROFA:  $4.68 \pm 0.48$  cél/campo,  $p < 0.001$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de conexina 43 entre los diferentes grupos. En conclusión, si bien a nivel pulmonar UAP-BA provoca efectos adversos sobre el sistema respiratorio sugiriendo que la inhalación de MP de la Ciudad de Buenos Aires representa una amenaza para la salud, es necesario analizar otros parámetros para determinar el posible daño a nivel cardíaco producido por UAP-BA.

### AGENTES INFECCIOSOS 1

#### 591. (158) EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE HEPATITIS C EN LA CIUDAD DE MAR DEL PLATA: ALTA PREVALENCIA DEL GENOTIPO 1<sup>a</sup>

Elizalde M.<sup>1</sup>; Campos R.<sup>2</sup>; Barbini L.<sup>3</sup>

Cátedra de Virología Fac. de Farmacia y Bioquímica UBA Laboratorio de Virología; Instituto Nacional de Epidemiología<sup>1</sup>; Cátedra de Virología Fac. de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>2</sup>  
mecheeli@hotmail.com

**Introducción.** El virus de hepatitis C (HCV) es uno de los principales causantes de enfermedades hepáticas, incluyendo hepatitis aguda y crónica, cirrosis y hepatocarcinoma. Aproximadamente 170 millones de personas se encuentran infectadas con el virus en la actualidad. Estudios desarrollados en Argentina han documentado una prevalencia de HCV cercana al 2%, siendo el genotipo 1b el más predominante. **Objetivos.** Describir la epidemiología molecular de HCV en la ciudad de Mar del Plata. Determinar la distribución de genotipos circulantes. **Materiales y métodos.** Se analizaron 120 sueros con serología positiva para HCV. Se extrajo el RNA de las muestras y se amplificaron por RT-nested PCR las regiones 5'UTR y NS5B del genoma viral. Los amplicones se secuenciaron en ambos sentidos. Las secuencias se alinearon con referencias de cada uno de los genotipos con el programa ClustalX. La genotificación se realizó mediante la reconstrucción de las relaciones filogenéticas usando los métodos de Neighbour Joining y Maximum Likelihood. **Resultados.** De los 120 sueros con serología positiva para HCV, 51 (42,5%) fueron HCV RNA positivos por RT-nested PCR. De estos, 41 (80,39%) fueron amplificadas en la región 5'UTR y 44 (86,27%) en la región NS5B. Se identificó el genotipo 1a (76,47 %) como al más prevalente, seguido por el genotipo 3a (17,65 %) y en menor medida los genotipos 1b (3,92%) y 4 (1,96%). No se detectaron los genotipos 2, 5 y 6. Estos hallazgos difieren de otros resultados encontrados en Argentina, en los cuales el genotipo 1b resultó ser el más prevalente. Por otra parte, los genotipos 1a y 3a están asociados al uso de drogas intravenosas, indicando que esta sería la principal vía de transmisión de la infección en esta ciudad. **Conclusión.** Los resultados muestran una alta prevalencia del genotipo 1a de HCV en la ciudad de Mar del Plata. Esta predominancia no ha sido reportada hasta el momento en la distribución de genotipos de HCV de Argentina.

#### 592. (166) ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS ALKALINE PHOSPHATASE AS A GERMINAL CELL MARKER

Albani C.<sup>1</sup>; Kiss F.<sup>2</sup>; Brehm K.<sup>3</sup>

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, UNMDP<sup>1</sup>; Instituto de Higiene y Microbiología, Universidad de Würzburg, Alemania<sup>2</sup>; <sup>3</sup>  
calbani@mdp.edu.ar

The larval stage of *Echinococcus multilocularis* (Em) is the causative agent of alveolar echinococcosis (AE), a severe disease that untreated leads to death. Recently, significant advances have

been made in the *in vitro* cultivation of totipotent somatic stem cells (neoblasts) from this parasite. The isolated cells are able to generate mature metacystode vesicles under laboratory conditions in a manner that closely resembles the oncosphere-metacystode transition during natural infections. Alkaline Phosphatase (AP) activity has been used as a convenient marker of undifferentiated totipotent or pluripotent cells in other invertebrate models. Because of this we proposed that AP could be an interesting marker also for Em primary cells. AP positive cells could be detected when *in vitro* experiments were carried out. Also this pattern was abolished using the DNA synthesis inhibitor Hydroxyurea and the AP specific inhibitor levamisole. A survey in the genomic data of Em revealed the presence of four distinct AP genes: *Emap1* – *Emap4*. On the base of gene expression patterns, *Emap1* is the gene most likely encoding the neoblast specific AP and its cDNA was fully characterized. The expression pattern and the results of the *in vitro* experiments indicate that EmAP1 could be a specific marker for mitotic active cells in Em.

#### 593. (274) CUANTIFICACIÓN Y UNIÓN A PROTEÍNAS DE ABEJAS Y SUBPRODUCTOS DE LA COLMENA A ANTI-BIÓTICOS USADOS PARA EL CONTROL DE LA LOQUE AMERICANA

Reynaldi F.<sup>1</sup>; Lacunza J.<sup>2</sup>; Alippi A.<sup>3</sup>; Rule R.<sup>4</sup>

CCT CONICET La Plata CIDEFI FCAYF UNLP Cat Farmacología Aplicada Fcm Unlp<sup>1</sup>; Cat Farmacología Aplicada FCM UNLP<sup>2</sup>; CIDEFI. FCAYF. UNLP. CIC PBA<sup>3</sup>; Cat Farmacología Aplicada FCM UNLP CIC PBA<sup>4</sup>  
freynaldi@yahoo.com

Las abejas melíferas (*Apis mellifera* L.) son afectadas por enfermedades infecciosas producidas por virus, bacterias, hongos y parásitos eucariotas. La Loque Americana es una enfermedad que afecta a larvas y pupas de abejas ocasionando pérdidas económicas. Su agente etiológico, *Paenibacillus larvae*, es una bacteria Gram positiva con capacidad de formar esporas que permanecen infectivas y viables por largos períodos. La administración de antibióticos es la principal alternativa para el control de dicha enfermedad en colmenares con altos niveles de infección. Los objetivos del presente trabajo fueron cuantificar las proteínas presentes en abejas adultas, larvas mayores y menores de 72 horas, jalea de obreras, miel y polen y determinar sus uniones a los antibióticos tilosina, tilmicosina y oxitetraciclina con la finalidad de comenzar a diseñar la ruta cinética de dichos antibióticos. La cuantificación de proteínas y sus uniones a antibióticos fueron realizadas utilizando la técnica de Bradford y un método biológico, respectivamente. Los valores de unión a proteínas fueron: larvas menores de 72 h  $21.2 \pm 2.63$ ; larvas mayores de 72 h  $17.9 \pm 1.89$ ; abejas adultas  $35.8 \pm 2.68$ ; Jalea de obreras  $71.0 \pm 5.02$ ; miel  $23.0 \pm 1.98$ ; polen  $224.0 \pm 16.89$  mg/g. La tilosina y oxitetraciclina presentaron porcentajes (promedio) de uniones a proteínas de un 15% en tejidos y subproductos de la colmena que resultaron inferiores a lo observado para tilmicosina (29%) ( $p = 2,62 \text{ E-}05$ ). En conclusión, la tilosina debido a sus características químicas, actividad antimicrobiana y unión a proteínas tisulares y subproductos de la colmena presenta características farmacocinéticas que podrían representar una ventaja terapéutica en el tratamiento de Loque Americana en colmenas. Sin embargo, sería conveniente seguir realizando estudios farmacocinéticos y determinación de ventana de selección de mutantes para calcular dosis, tiempos y formas farmacéuticas de administración para optimizar su uso en colmena de un modo más racional.

#### 594. (399) RESPUESTA INFLAMATORIA Y SU MODULACIÓN EN INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON CEP A CRÓNICA Y AGUDA DE TRYPANOSOMA CRUZI

Penas F.<sup>1</sup>; Mirkin G.<sup>2</sup>; Hovsepian E.<sup>3</sup>; Goren N.<sup>4</sup>

CEFYBO CONICET<sup>1</sup>; Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología Facultad de Medicina UBA<sup>2</sup>; CEFYBO CONICET<sup>3</sup>; <sup>4</sup>  
federicopenas@hotmail.com

La infección con *Trypanosoma cruzi* (Tc), está relacionada con el establecimiento de procesos inflamatorios agudos y cróni-

cos en diversos órganos. 15-Deoxy-<sup>Δ12,14</sup> PGJ2 (15d), ligando de PPAR $\gamma$ , ha sido implicada en la regulación de la inflamación. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta inflamatoria en la enfermedad de Chagas en modelos murinos de infección crónica (cepa K-98) y agudo (cepa RA) de *Tc*. Además analizar el rol de 15d en la inflamación por *Tc*. Ratones BALB/c infectados con K-98 ( $1 \times 10^5$ ; i.p.), revelaron expresión de NOS-2 en corazón, bazo y músculo esquelético mediante Western Blot (Wb), a los 21 y 49 días post-infección (dpi). En sueros se cuantificó la parasitemia (21dpi:  $1.2 \times 10^5 \pm 5.6 \times 10^4$ ; 49dpi:  $1.6 \times 10^6 \pm 6.9 \times 10^5$  K-98/ml;  $p < 0.01$ ) y se detectó actividad de metaloproteasas-9 (MMP-9) mediante zimografía, (Control(C):  $0.1 \pm 0.01$ ; 21dpi:  $0.16 \pm 0.01$ ; 49dpi:  $1.1 \pm 0.06$  D.O/mm $^2$ ;  $p < 0.05$ ). En el modelo de infección con cepa RA ( $1 \times 10^5$ ; i.p.), se evidenció expresión de NOS-2 en corazón, hígado, bazo y músculo esquelético mediante Wb. Se midió la parasitemia (7dpi:  $1.6 \times 10^6 \pm 9.5 \times 10^5$ ; 10dpi:  $1.9 \times 10^6 \pm 8.9 \times 10^5$  RA/ml;  $p < 0.05$ ) y actividad de MMP-2 en sueros (C:  $0.08 \pm 0.01$ ; 8dpi:  $0.39 \pm 0.04$ ; 10dpi:  $1.1 \pm 0.03$ ; D.O/mm $^2$ ;  $p < 0.05$ ). NF- $\kappa$ B fue analizado mediante Wb y se observó activación por p65 y por  $\kappa$ -B $\alpha$  a las 36 y 48hs pi. Mediante ensayos de retardo de la movilidad en gel (EMSA), se confirmó la activación de esta vía a las 48hs pi. Simultáneamente para evaluar el papel de 15d sobre la respuesta inflamatoria aguda, los ratones infectados fueron tratados con 15d (1mg/Kg; i.p) y se evidenció inhibición en la expresión de NOS-2 en los órganos estudiados y un aumento significativo de la parasitemia ( $53.63 \pm 6.9\%$ ;  $n = 3$  8 ratones/grupo;  $p < 0.05$ ) a los 10dpi. Concluimos que ambas cepas inducen una respuesta inflamatoria probablemente a través de NF- $\kappa$ B. Además, 15d modularía la expresión de NOS-2, con la consecuente disminución en la producción de NO que favorecería a un aumento de la parasitemia.

- 595. (499) ALTO NIVEL DE RESISTENCIA A LOS AMINOGLUCÓSIDOS EN CEPAS DE ENTEROCOCCUS SPP. RECUPERADAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**  
 Delpech G.<sup>1</sup>; Pourcel G.<sup>2</sup>; Schell C.<sup>3</sup>; De Luca M.<sup>4</sup>; Basualdo J.<sup>5</sup>; Sanchez Bruni S.<sup>6</sup>; Sparo M.<sup>7</sup>  
*Escuela Superior de Ciencias de la Salud, UNCPBA<sup>1 2 7</sup>; Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>3 4 5 7</sup>; Laboratorio de Farmacología Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA; CONICET<sup>6</sup>; Laboratorio de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA<sup>7</sup>*  
 gastondelpech@yahoo.com.ar

El género *Enterococcus* integra la microbiota habitual de alimentos de origen animal. Las infecciones humanas causadas por enterococos con alto nivel de resistencia (ANR) a los aminoglicósidos tienen gran importancia clínica-terapéutica debido a que excluye la sinergia con otros antimicrobianos como beta-láctamicos y glucopéptidos. Sin embargo, en Argentina existe escasa documentación sobre la ocurrencia de estas cepas en alimentos de origen animal. Objetivo: investigar la presencia de cepas de *Enterococcus* spp. con ANR a los aminoglicósidos en alimentos de origen animal. Se analizaron 21 muestras de carne picada, 30 de leche de cabra, 18 salamines y 21 quesos artesanales, provenientes de granjas elaboradoras de productos artesanales y carnicerías de Tandil. La caracterización fenotípica de las cepas se realizó mediante pruebas bioquímicas convencionales y análisis de las proteínas totales solubles (SDS-PAGE). En 39 cepas de *Enterococcus* (31 *E. faecalis*, 5 *E. faecium*, 2 *E. raffinosus*, 1 *E. gallinarum*) se investigó ANR *in vitro* a gentamicina y estreptomina mediante la realización de Concentración Inhibitoria Mínima (CLSI, 2010). Se detectó ANR a los aminoglicósidos en el 41% de las cepas. En 6 cepas de *E. faecalis* aislados de salamin y carne picada y en 4 de *E. faecium* aislados de queso bovino, salamin y leche de cabra expresaron ANR a gentamicina (CIM > 1000  $\mu$ g/mL) y estreptomina (CIM > 2000  $\mu$ g/mL). En 4 cepas de *E. faecalis* provenientes de queso bovino y carne picada se detectó ANR a gentamicina (CIM > 500  $\mu$ g/mL). En 2 cepas de *E. faecalis* recuperadas de queso bovino y carne picada se observó ANR a estreptomina (CIM > 2000  $\mu$ g/mL). En *E. raffinosus* y *E. gallinarum* no se detectó ANR a los aminoglicósidos. Los alimentos de origen animal constituyen un reservorio de *Enterococcus* spp. con ANR a los aminoglicósidos. La presencia de estas cepas en

alimentos de origen animal constituye un riesgo relevante para la Salud Pública humana.

- 596. (544) EFECTO DE LA PROTEÍNA X DEL VIRUS HEPATITIS B (HBV) SOBRE LAS PROTEÍNAS ABC MDR1 Y MRP1: POTENCIALES IMPLICANCIAS EN LA ONCOGÉNESIS VIRAL.**  
 Gentile E.<sup>1</sup>; Cuestas M.<sup>2</sup>; Castillo A.<sup>3</sup>; Delfino C.<sup>4</sup>; Oubiña J.<sup>5</sup>; Mathet V.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Hepatitis Virales, Dpto. de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>; Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>2</sup>*  
 emilianogentile@gmail.com

Los carcinomas hepatocelulares representan el 4% de los tumores de todo el mundo siendo la 5 $^{\circ}$  causa de cáncer en el hombre. El 80% de los mismos se asocia a la infección crónica por HBV. La proteína X del HBV (HBx), fundamentalmente las mutantes K130M y V131I (HBxmt) desempeñan un rol principal en la hepatocarcinogénesis. Las proteínas ABC son bombas transmembrana activas que transportan sustratos en contra del gradiente de concentración. Su sobreexpresión está asociada a la resistencia a múltiples drogas; y en algunos casos, a la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis y el cáncer. El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto de las proteínas *wild type* (HBxwt) y HBxmt sobre los niveles de ARNm y de las proteínas MDR1 y MRP1. Para ello se transfectaron transitoriamente células HeLa y Huh7 con plásmidos que codificaban para HBxwt y HBxmt. Al cabo de 24 h se les evaluó mediante *Real Time PCR* la variación en la expresión relativa de los genes *mdr1* y *mrp1*. La detección de la expresión de sus respectivas proteínas se realizó por *Western blot*. En células HeLa, que no expresan MDR1, se evidenció una disminución en la expresión de *mrp1* debido a la expresión de HBxwt, mientras que en aquellos cultivos que expresaban HBxmt no se observó variación en los niveles de dicho gen. En células Huh7 se detectó un aumento en la expresión de *mrp1* debido a HBxwt, pero no en presencia de HBxmt. No se observó variación en la expresión de *mdr1* por ninguna de las dos HBx. Se evidenció un comportamiento dependiente de la estirpe celular estudiada, hepatocitaria vs epitelial, y de la naturaleza salvaje o mutada de HBx. Merece especial consideración la observación de un aumento en la expresión de *mrp1* en células Huh7, con potenciales nuevas implicancias en la hepatocarcinogénesis, dado que su sobreexpresión, además de conferir resistencia a drogas, estaría asociada a la inhibición de la apoptosis al bloquear la liberación de citocromo C desde la mitocondria al citosol.

- 597. (547) EFECTO DE LA PROTEÍNA X DEL VIRUS HEPATITIS B (HBV) SOBRE LA PROTEÍNA BCRP DE LA SUPERFAMILIA DE TRANSPORTADORES ABC.**  
 Castillo A.<sup>1</sup>; Cuestas M.<sup>2</sup>; Gentile E.<sup>3</sup>; Delfino C.<sup>4</sup>; Oubiña J.<sup>5</sup>; Mathet V.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Hepatitis Virales, Dpto. de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA.<sup>1 2 3 4 5 6</sup>; Departamento de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.<sup>2</sup>*  
 amalia19@gmail.com

La proteína X del HBV (HBx) desempeña un rol importante en la oncogénesis hepática. Las mutantes K130M y V131I (HBxmt) exhiben una actividad transactivadora mayor que la proteína *wild type* (HBxwt) sobre genes celulares, lo que produce un aumento en su contribución a la hepatocarcinogénesis. Las ABC son bombas transmembrana activas que transportan sustratos en contra del gradiente de concentración, utilizando la hidrólisis de ATP como fuente de energía. La proteína BCRP se encuentra implicada en la homeostasis celular de fosfolípidos y colesterol. Su sobreexpresión está asociada a la resistencia a múltiples drogas. *Objetivo*: Analizar el efecto de la expresión de las proteínas HBxwt y HBxmt sobre los niveles de ARNm y sobre los niveles de expresión de la proteína BCRP. *Metodología*: Se transfectaron transitoriamente células HeLa y Huh7 con plásmidos que contienen la secuencia de

HBxwt o HBxmt. A las 24h se evaluó mediante *Real time* PCR la variación en la cantidad relativa de ARNm de BCRP. La detección de la expresión de dicha proteína se realizó mediante *Western blot*. **Resultados:** En células HeLa se evidenció un incremento en la expresión de *bcrp* debido a la expresión de HBxmt. No se observó una variación estadísticamente significativa en la expresión de dicho gen cuando los cultivos celulares expresaban HBxwt al compararse con las células control. En contraposición, en células Huh7 se detectó un incremento en la expresión de *bcrp* debido a la expresión de HBxwt, mientras que esto no se evidenció con la mutante. **Conclusiones:** Al estudiar el efecto de las proteínas HBxwt y HBxmt sobre los niveles de ARNm correspondientes al gen *bcrp*, se observó un comportamiento dependiente de la naturaleza salvaje o mutante de dicha proteína viral. El incremento de la expresión de BCRP por HBx podría estar asociado a la resistencia a múltiples drogas antitumorales y antivirales, produciendo eventuales fallas en el tratamiento de la Hepatitis B en los pacientes crónicamente infectados.

**598. (602) FRACASOS EN TERAPIA ANTIMICROBIANA: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS EVR AISLADAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL**

Pourcel G.<sup>1</sup>; Schell C.<sup>2</sup>; Delpech G.<sup>3</sup>; De Luca M.<sup>4</sup>; Basualdo J.<sup>5</sup>; Sanchez Bruni S.<sup>6</sup>; Sparo M.<sup>7</sup>  
*Escuela Superior de Ciencias de la Salud, UNCPBA<sup>1 3</sup>*  
*7; Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>2 4 5 7</sup>*; *CONICET; Laboratorio de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA<sup>6</sup>*; *Laboratorio de Farmacología Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA*  
*giselapourcel@yahoo.com.ar*

El género *Enterococcus* puede integrar la microbiota de animales de origen animal. En la última década, en Argentina se han descrito infecciones invasivas humanas producidas por enterococos resistentes a vancomicina (EVR). La emergencia de estas cepas no se puede explicar solamente por la presión selectiva de los antimicrobianos en los hospitales sino también por su emergencia en la comunidad a través de alimentos de origen animal. En las cepas de EVR es relevante la identificación fiable de *Enterococcus faecium*, pues su mecanismo de resistencia a glucopéptidos es adquirida y transferible a otras cepas de *Enterococcus* o *Staphylococcus aureus*, constituyendo un riesgo para la Salud Pública. Los métodos fenotípicos no han demostrado reproducibilidad y fiabilidad en la identificación de las distintas especies de EVR (*E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*) **Objetivo:** Identificar genotípicamente las cepas de EVR aisladas de alimentos de origen animal elaborados en un área rural del centro de la Provincia de Bs.As. Se procesaron 20 muestras de alimentos, 6, de origen cárnico y 14, lácteo. Las cepas que fueron resistentes mediante concentración inhibitoria mínima (CIM) a vancomicina y/o teicoplanina (CLSI, 2010) se identificaron mediante PCR amplificando los genes *tuf* y *sodA* para género y especie respectivamente. Se detectaron 18 cepas con alto nivel de resistencia simultánea a vancomicina y teicoplanina (CIM > 64 µg/mL) que fueron identificadas como *E. faecium*. La identificación por métodos moleculares de cepas de *E. faecium* es una herramienta rápida y fiable que permitiría explicar parte del origen de algunos fracasos en terapia antimicrobiana con glucopéptidos.

**599. (764) EFECTO DE LOS BISFOSFONATOS EN LA CÉLULA DE LÍNEA EGPE PROVENIENTES DE PROTOESCÓLICES DE E.GRANULOSUS BOVINOS**

Fuchs A.<sup>1</sup>; Echeverría C.<sup>2</sup>; Perrone A.<sup>3</sup>  
*Centro de Altos Estudios en Ciencias de la Salud, Universidad Abierta Interamericana<sup>1 2 3</sup>*  
*alicia.fuchs@vaneduc.edu.ar*

Los bisfosfonatos son compuestos que se utilizan en terapéutica donde hay defectos secundarios o primarios de la calcificación ósea. Los mecanismos de acción de los bisfosfonatos son los siguientes: inhibición de la vía del mevalonato y la prenilación de las proteínas, bloqueando las GTPasas pequeñas,

unión al calcio libre y el etindronato y el clordronato podrían revertir las reacciones pirofosfólíticas catalizando las aminocil-tRNA, produciendo análogos al ATP. Los bisfosfonatos. La infección por *E. granulosis* en los hospedadores secundarios forma quistes. La autolimitación natural de la infección es debida a la calcificación de la membrana laminar del quiste parasitario. El Calcio se encuentra en una concentración superior en el líquido hialinídico que en el plasma (4,7 vs 1,2 mM, respectivamente) y el fosfato 10 veces menos a la plasmática 0,1 mM. **Hipótesis:** El tratamiento con bisfosfonatos inhibe la proliferación celular de las EGPE y su acción es calcio dependiente. **Materiales y métodos:** Bisfosfonato: Olpadronato, Ibandronato y Pamidronato provistos por Laboratorios Gador, se disolvieron en PBS a pH 7,4. 10<sup>4</sup> células EGPE se incubaron en medio líquido en presencia de bisfosfonatos y de CaCl<sub>2</sub> a concentraciones de 0; 0,6 y 1,2 mM. Las células fueron tratadas desde el día 0 con 30 y 90 µM de los distintos bisfosfonatos durante 3 días. Las células se contaron para evaluar el efecto de los bisfosfonatos sobre la proliferación celular. Los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se evaluaron por t de student. **Resultados:** Se encontró una disminución significativa (p<0,05) del número de células, respecto al control sin tratamiento en los cultivos tratados con Olpadronato 30 y 90 µM en presencia de 0,6mM de calcio; Etindronato 30 y 90 µM en ausencia de adición de calcio. El Ibandronato no mostró diferencias significativas. **Conclusión:** Los mecanismos de acción del etindronato y del Olpadronato serían diferentes en las células EGPE.

**600. (803) INHIBICIÓN DIFERENCIAL POR EXTRACTOS SEMIPURIFICADOS DE PLANTAS AUTÓCTONAS ARGENTINAS SOBRE DISTINTOS GENOTIPOS DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS**

Entrocassi A.<sup>1</sup>; López P.<sup>2</sup>; Ouviaña A.<sup>3</sup>; Mercado M.<sup>4</sup>; Gallo Vaulet M.<sup>5</sup>; Broussalis A.<sup>6</sup>; Ferraro G.<sup>7</sup>; Rodríguez Fernepin M.<sup>8</sup>  
*INFIBIOC: Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica, UBA; Inmunología Clínica Cátedra Análisis Clínicos I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.<sup>1 5 8</sup>*; *Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>2 3</sup>*  
*67*; *Unidad de Estudio de Chlamydia. Cát. de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>4</sup>.*  
*clamidia@ffyba.uba.ar*

*Chlamydia trachomatis* es el agente causal de la infección de transmisión sexual bacteriana más prevalente en el mundo. Incluye 18 genotipos, y los del D al K son productores de infecciones genitales y conjuntivitis en adultos y neonatos. La aparición de los primeros reportes de cepas resistentes a antibióticos hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes con actividad anticlamidial. Se diseñó un estudio para detectar posibles efectos inhibitorios de extractos semipurificados de plantas nativas argentinas sobre el crecimiento de *C. trachomatis*, y evaluar su acción sobre distintos genotipos. Se ensayaron extractos de *Lithraea molleoides* (E1, E2 y E3), *Hydrocotyle bonariensis* (E4), e *Hybanthus parviflorus* (E5), sobre la línea celular LLC-MK2, frente a cinco cepas de *C. trachomatis*: ATCC L2/434/BU genotipo L2, dos aislamientos clínicos de conjuntivitis neonatal (genotipos K y E), y dos aislamientos clínicos genitales (genotipos D y E). Los extractos se ensayaron en cinco condiciones que involucraron distintas etapas del ciclo de desarrollo de *C. trachomatis*. Los extractos que presentaron inhibición en el crecimiento de *C. trachomatis* fueron el precipitado de extracto metanólico de *L. molleoides* (E2) y el extracto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *H. bonariensis* (E4). E4 mostró la más amplia actividad inhibitoria frente a todas las cepas, y la mayor actividad se evidenció en contacto durante el desarrollo de la inclusión clamidial. E2 mostró inhibición durante el ingreso de las clamidias a la célula en la cepa ATCC y las cepas conjuntivales, pero no en las cepas genitales. Los resultados evidencian que ambos extractos actúan sobre distintas etapas de la interacción clamidia-célula, lo que muestra que el mecanismo de acción de sus principios activos son diferentes. Por otra parte, el extracto que interfiere con el ingreso de la bacteria a la célula muestra actividad diferencial de acuerdo con el origen de la cepa, aún

en cepas de igual genotipo. Se debe profundizar el estudio del mecanismo de acción de estos extractos.

**601. (484) EUDRAGIT E100-OFLOXACINO: CAMBIOS EN EL POTENCIAL E INTEGRIDAD DE MEMBRANA INDUCIDOS POR EL POLIMERO CATIONICO INCREMENTAN LA ACCIÓN DEL ANTIMICROBIANO CON TARGET INTRACELULAR FRENTE A PSEUDOMONAS AERUGINOSA RESISTENTES A FLUOROQUINOLONAS**

Romero V.<sup>1</sup>; Manzo R.<sup>2</sup>; Bocco J.<sup>3</sup>; Alovero F.<sup>4</sup>

Depto. de Farmacia. Facultad de Ciencias Químicas UNC<sup>2 4</sup>; Depto. de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas, UNC<sup>3</sup>.

vromero@fcq.unc.edu.ar

La impermeabilidad de la membrana externa de *Pseudomonas* contribuye a su resistencia intrínseca a los antimicrobianos. Eudragit E100 (Eu) es un polímero catiónico que interactúa con el grupo carboxílico de ofloxacino (OFLO) generando dispersiones claras (EuCl-OFLO) de pH 6,4 y potencial electrocinético (+). Resultados previos muestran que Eu potencia la acción bactericida de OFLO frente a *Pseudomonas aeruginosa* resistentes. Por microscopía electrónica se observaron alteraciones en la superficie bacteriana y estructuras vesiculares sobre las mismas. Se estudia el mecanismo por el cual Eu incrementa la eficacia de OFLO usando citometría de flujo a fin de evaluar cambios en potencial de membrana conducentes a pérdida de integridad de las envolturas bacterianas. Los sistemas EuCl-OFLO fueron preparados en nuestro laboratorio. Dos aislamientos clínicos de *P.aeruginosa* fueron tratados con EuCl-OFLO, OFLO o EuCl. Se estudió efecto de tiempo de contacto y concentración. Alícuotas teñidas con DIBAC (sonda fluorescente) se evaluaron por citometría de flujo. La sonda sólo entra a células con depleción en el potencial de membrana e interactúa con componentes intracelulares lipídicos. Las células expuestas a EuCl-OFLO exhiben alta intensidad de fluorescencia, independientemente del tiempo de contacto. Por su parte la población expuesta a OFLO solo difiere del control en concentraciones supra-CIM y luego de 24 hs, con desplazamiento a zonas de mayor fluorescencia, sin alcanzar los niveles de Eu-OFLO. Esto podría atribuirse a una respuesta secundaria a la acción de OFLO manifestada en largos tiempos de incubación. Similar comportamiento se observó al analizar la granularidad generada por los tratamientos comparados. Eu interactúa con la superficie aniónica celular y produce pérdida en potencial de membrana y alteraciones en la integridad de membrana, aunque carece de acción bactericida directa, actuando como permeabilizante para *Pseudomonas* e incrementando la acción de OFLO.

**602. (492) EFECTO DEL PROBIÓTICO ENTEROCOCCUS FAECALIS CECT7121 EN INFECCIÓN POR CÁNDIDA ALBICANS EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS.**

Confalonieri A.<sup>1</sup>; Sparo M.<sup>2</sup>; Urbizu L.<sup>3</sup>; Rivulgo M.<sup>4</sup>; Sánchez Bruni S.<sup>5</sup>

CONICET; Lab Farmacología Fac Cs Veterinarias UNCPBA<sup>1 3 4 5</sup>; Lab Farmacología Fac Cs Veterinarias UNCPBA<sup>2</sup>.

aleconfa@vet.unicen.edu.ar

En pacientes inmuno-suprimidos (HIV-SIDA), el fracaso terapéutico de las drogas antifúngicas constituye un grave problema en el tratamiento de candidiasis sistémicas. Es escasa la información de la efectividad de los probióticos sobre infecciones fúngicas experimentales en huéspedes inmunosuprimidos. El probiótico *Enterococcus faecalis* CECT7121, ha demostrado en estudios previos *in vivo*, actividad microbiocida e inmunomoduladora. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto del probiótico *E. faecalis* CECT7121, en infección por *Cándida albicans* en ratones inmunosuprimidos (IS). Para el desafío de los ratones, se utilizó una cepa de *C. albicans* aislada de hemocultivos de un paciente con HIV-SIDA y con enfermedad diseminada. Dos grupos de ratones Balb-c (n=10) se trataron con el siguiente esquema: Grupo Control (GC): desafío con 1 dosis de 100 µl de *C. albicans*

2,5x10<sup>8</sup> UFC/ml, vía intragástrica (IG). Post-desafío 6 dosis de 300 µl de solución fisiológica c/24 h vía IG. Grupo Experimental (GE): igual desafío que GC, pero el post-desafío fue realizado con 6 dosis de 300 µl de *E. faecalis* CECT7121 3x10<sup>8</sup> UFC/ml c/24 h vía IG. Ambos grupos fueron previamente inmunosuprimidos con dexametasona (10 dosis de 0.5 mg C/24h). Se compararon el estado de salud general y la supervivencia de ambos grupos durante 20 días post-desafío. Para el análisis estadístico se utilizó Fischer Exact Test. En el GE se observó un mayor *score* de salud general que el GC. Al día 10 post-desafío se alcanzó el 100% de letalidad del GC, comparado con solo el 30% del GE (*p* < 0.05). Este último grupo finalmente, alcanzó el 100% de letalidad al día 20 post-desafío, obteniendo una prolongación significativa (*p* < 0.001) en la supervivencia (20 días) con respecto al GC (10 días). *E. faecalis* CECT7121 podría constituirse en un complemento de la terapia convencional con drogas antifúngicas de infecciones por *C. albicans* en pacientes inmunosuprimidos.

**603. (722) ESTUDIO EXPERIMENTAL EN RATONES INFECTADOS CON LA CEPA NICARAGUA DE TRYPANOSOMA CRUZI TRATADOS CON BENZNIDAZOL (BZ) Y ALOPURINOL (ALO).**

Grosso N.<sup>1</sup>; López Alarcón M.<sup>2</sup>; Bua J.<sup>3</sup>; Fichera L.<sup>4</sup>

INP<sup>1</sup>; INP/ANLIS/Malbrán Paseo Colón 568; CAECIS, Universidad Abierta Interamericana.<sup>2 3 4</sup>

noelialorenag@yahoo.com.ar

En nuestro laboratorio caracterizamos una cepa de *T. cruzi* de área endémica perteneciente al linaje Tc I. Nuestro objetivo es estudiar el efecto combinado de bz y alo en ratones infectados con esta cepa, con el fin de observar la evolución de la infección en la etapa crónica. Ratones C3H/He fueron infectados con 10<sup>3</sup> tripomastigotes ip y tratados con 30 dosis vía oral, desde los 2 dpi, con bz (50, 75 y 100 mg/Kg/día) o bz combinado con alo (20 o 64 mg/Kg/día). A los 6 meses pi se evaluó la presencia de parásitos en sangre y en los cortes histológicos del tejido muscular asociado inflamación. Todos los ratones tratados sobrevivieron con una disminución significativa de parásitos respecto de los controles, en los que sólo el 20% sobrevivió. En miocardio y músculo esquelético de los ratones tratados con 50 bz + alo, observamos una disminución significativa de parásitos tisulares respecto del tratamiento con 50 bz. En el miocardio de los tratados con 75 bz + alo se observó una disminución significativa de la inflamación respecto de los otros tratamientos y controles. A los 6 meses, adicionamos 30 dosis de alo 64 a un grupo de ratones tratados en la etapa aguda de la infección. La histopatología, mostró una reducción significativa de parásitos en el músculo esquelético, respecto de los tratamientos tempranos con 50 y 75 bz y en el miocardio luego del tratamiento con 75 bz más alo 64. **Conclusión:** todos los tratamientos ensayados disminuyeron significativamente los parásitos en los tejidos estudiados. La dosis temprana más baja de bz combinada con alo, provocó una disminución significativa de parásitos y con la dosis de 75 bz más alo se observó además, un mayor efecto antiinflamatorio. La adición de alo en la etapa crónica potenció el efecto parasiticida en el miocardio. Estos resultados sugieren la sinergia de bz y alo en la reducción del efecto patológico de la infección con *T. cruzi*.

## ONCOLOGIA 9

**604. (74) TERAPIA FOTODINÁMICA: ANTRAQUINONAS FOTOSENSIBLES AISLADAS DE HETEROPHYLLAEA PUSTULATA PROMUEVEN APOPTOSIS EN CÉLULAS MALIGNAS.**

Fernandez I.<sup>1</sup>; Comini L.<sup>2</sup>; Rumie Vittar N.<sup>3</sup>; Agostini E.<sup>4</sup>; Núñez Montoya S.<sup>5</sup>; Cabrera J.<sup>6</sup>; Rivarola V.<sup>7</sup>

Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>1 3 4 7</sup>.

Universidad Nacional de Córdoba<sup>2 5 6</sup>.

ivimar2002@yahoo.com.ar

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica basada en la acción combinada de un fotosensibilizador (FS) y



luz visible. Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio mostraron que antraquinonas (AQs) naturales extraídas de hojas, tallo y callos de *Heterophyllaea pustulata* presentaron propiedades fotosensibilizantes. En este trabajo nos planteamos: 1) evaluar la acción fotodinámica de rubiadina, soranjidiol, 5-5'-bisoranjidiol y 1-metil éter de soranjidiol respecto a dosis-luz sobre células de cáncer de mama humano (MCF-7c3), 2) utilizar cultivos de callos como herramienta biotecnológica para la obtención mayoritaria de AQs con potencial actividad terapéutica, 3) determinar la localización intracelular de rubiadina y soranjidiol; y 4) caracterizar la muerte celular mediante morfología y señales moleculares de ambas AQs. A bajas dosis de luz aplicada (0.35J/cm<sup>2</sup>), 5-5'-bisoranjidiol (50µM), 1-metil éter de soranjidiol (50µM) y soranjidiol (100µM) mostraron efecto fotodinámico (~58%, 63% y 61.7% de células vivas, respectivamente), mientras que para rubiadina fue a 0.7J/cm<sup>2</sup> exhibiendo un 80.6% de viabilidad celular (ensayo de MTT). En nuestro laboratorio se estandarizó la técnica de cultivos *in vitro* de callos de *H. pustulata*, una alternativa para la producción de compuestos biológicamente activos. A partir de ellos se obtuvieron elevadas concentraciones de soranjidiol y rubiadina (HPLC). En células tumorales, estas AQs manifestaron localización extranuclear (microscopía de fluorescencia). Además, 6 h post-TFD las AQs ocasionaron un alto índice de apoptosis, 11.1 y 8.1, respectivamente; y rubiadina exhibió máxima expresión de caspasa-3 (western blot) a este tiempo. Podemos concluir que las AQs presentan propiedades interesantes como FS candidatos para TFD contra el cáncer y; los cultivos *in vitro* de callos de *H. pustulata* tendrían un importante potencial biotecnológico para la producción de las AQs foto-citotóxicas para las células tumorales.

**605. (152) GLICEROL Y PRENEOPASIA HEPÁTICA: ALTERACIONES EN SU METABOLISMO Y EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DEL MISMO EN LOS FOCOS HEPÁTICOS ALTERADOS.**

Alvarez M.<sup>1</sup>; Parody J.<sup>2</sup>; Ceballos M.<sup>3</sup>; Ronco M.<sup>4</sup>; Francés D.<sup>5</sup>; Ingaramo P.<sup>6</sup>; Pisani G.<sup>7</sup>; Pellegrino J.<sup>8</sup>; Carnovale C.<sup>9</sup>; Carrillo M.<sup>10</sup>.

*Instituto de Fisiología Experimental*<sup>1 2 3 4 5 6 8 9 10</sup>; *Área Morfología. Facultad Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas*<sup>7</sup>. [alvarez@ifise-conicet.gov.ar](mailto:alvarez@ifise-conicet.gov.ar)

El hígado es el principal sitio de metabolismo del glicerol (gly), debido a su abundancia en enzimas clave del mismo. En el hígado, el gly puede usarse para gluconeogénesis, lipogénesis, como transportador de equivalentes del citosol a mitocondria o como sustrato oxidativo para producir energía. El uso de gly en pacientes cancerosos es de particular interés, dado que presentan el gly plasmático elevado así como una producción de glucosa aumentada. Por otra parte, se ha informado que el gly suprime *in vivo* e *in vitro* la proliferación de hepatocitos de hígados de rata como también de la línea celular HepG2. Objetivos: analizar: a) las alteraciones metabólicas del gly en preneoplasia hepática y b) la posible modulación por gly de la proliferación de los focos preneoplásicos. Utilizamos ratas Wistar macho adultas controles (C) y con preneoplasia hepática (IP). Un grupo de animales IP recibió además gly (10%) por vía oral (IPgly). Resultados: a) Los valores séricos de gly en IP (0,55±0,06\* g/L) están aumentados con respecto a C (0,22±0,02 g/L). Estudios en hígados aislados mostraron un aumento significativo (+50%\*) de la gluconeogénesis a partir de gly (dosis: 40, 200 y 400 µM) en animales IP. Estos hallazgos coincidieron con los realizados *in vivo* mediante administración oral de gly. Además, las curvas de tolerancia a la glucosa no mostraron diferencias entre C e IP. b) La cuantificación de los focos (GSTP positivos) por inmunofluorescencia y microscopía confocal, mostró una disminución (-50%\*) del tamaño de los mismos en IPgly vs. IP. En concordancia, el índice de proliferación de los focos se observó disminuido en IPgly (IPgly: 25,1±0,6\*; IP: 28,0±0,2), fundamentalmente por reducción del número de mitosis (IPgly: 0,8±0,4\*; IP: 5,0±0,4) (\**p*<0,05). En conclusión, a) la alteración en el metabolismo de gly es un evento temprano en el desarrollo tumoral hepático y b) la inhibición de la proliferación de los focos por gly podría resultar en una terapéutica de interés.

**606. (195) CD166: UN LIGANDO DE GALECTINA-8 QUE MEDIA LA ACTIVIDAD PRO-ANGIOGÉNICA DE LA LECTINA EN CÉLULAS BAEC.**

Nugnes L.<sup>1</sup>; Cardenas Delgado V.<sup>2</sup>; Fernandez M.<sup>3</sup>; Martinez C.<sup>4</sup>; Troncoso M.<sup>5</sup>; Croci D.<sup>6</sup>; Wolfenstein-Todel C.<sup>7</sup>; Rabinovich G.<sup>8</sup>; Malchiodi E.<sup>9</sup>; Elola M.<sup>10</sup>  
*Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, UBA-CO-NICET*<sup>1 2 4 5 7 10</sup>; *Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), CONICET-UBA*<sup>3 9</sup>; *Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET*<sup>6</sup>.  
[lorena.nugnes@gmail.com](mailto:lorena.nugnes@gmail.com)

La galectina-8 (Gal-8) se caracteriza por poseer secuencias de aminoácidos consenso y dos dominios de reconocimiento a carbohidratos b-galactósidos. Demostramos previamente que Gal-8 está implicada en procesos fisiológicos como tubulogénesis y migración de células endoteliales. Son nuestros objetivos: 1) Identificar ligandos para Gal-8 en células endoteliales BAEC mediante cromatografía de afinidad y espectrometría de masa; 2) Validar la interacción de Gal-8 y sus ligandos mediante inmunoprecipitación y "Resonancia Plasmática de Superficie" (SPR); 3) Estudiar los efectos de los glicanos en la interacción Gal-8/CD166 y 4) Evaluar a CD166 como probable mediador de los efectos de Gal-8. Para ello, a partir de lisados de BAEC y mediante cromatografía en AffiGel-Gal-8, digestión "in gel" y espectrometría de masa, se demostró que CD166 (ALCAM) interactúa con Gal-8. Mediante co-inmunoprecipitación, se detectó la formación de complejos CD166-Gal-8. Mediante SPR, se determinó la constante de disociación aparente (*K<sub>d</sub>*) de 2 µM, indicando la especificidad de la unión Gal-8-CD166. Mediante SPR también se analizó la dependencia de glicanos en la interacción Gal-8/CD166: Gal-8 o Gal-8 pre-incubada con sacarosa rindieron afinidad similar a CD166 inmovilizado mediante análisis de afinidad en estado estacionario (1,9 x 10<sup>-6</sup> M y 1,1 x 10<sup>-6</sup> M, respectivamente). Las KDs aparentes obtenidas por análisis cinético fueron de 2,1 x 10<sup>-6</sup> M y 0,58 x 10<sup>-6</sup> M, respectivamente. Por lo contrario, la lactosa y el TDG, azúcares específicos para esta lectina, inhibieron completamente la unión de Gal-8 a CD166. En cuanto al rol fisiológico de CD166, BAEC pre-incubadas con anti-CD166 mostraron una disminución significativa (~1,5 veces, *P*<0,05) de la tubulogénesis inducida por Gal-8. Asimismo, anti-CD166 bloqueó la actividad migratoria inducida por Gal-8 (~8 veces, *P*<0,05). En conclusión, CD166 es un ligando de Gal-8 en BAEC que media al menos parte de la respuesta angiogénica inducida por la lectina.

**607. (364) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSPORTADOR DE BOROFENILALANINA (BPA) PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) EN MELANOMA.**

Rossini A.<sup>1</sup>; Thomasz L.<sup>2</sup>; Dagrosa M.<sup>3</sup>; Carpano M.<sup>4</sup>; Nievas S.<sup>5</sup>; Juvenal G.<sup>6</sup>; Pisarev M.<sup>7</sup>

*Comisión Nacional de Energía Atómica, Radiobiología*<sup>1</sup>; *Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA)*<sup>2 4 5</sup>; *CNEA-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)*<sup>3 6</sup>; *CNEA-CONICET- Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA)*<sup>7</sup>  
[rossini@cnea.gov.ar](mailto:rossini@cnea.gov.ar)

*Introducción:* En la actualidad ningún tratamiento es eficaz para melanomas en estadios avanzados. Una alternativa podría ser la Terapia por Captura Neutrónica en Boro (BNCT), cuya efectividad se halla directamente relacionada a la captación selectiva de <sup>10</sup>B por parte de las células tumorales. Un compuesto muy utilizado para vehicular el <sup>10</sup>B dentro de las células es la p-borofenilalanina (BPA). Su captación se lleva a cabo a través de un transportador de cuya subunidad catalítica (LAT) se han identificado 4 subunidades: LAT1/2/3 y 4, además de una subunidad pesada (4F2hc/CD98) con la que en algunos casos debe dimerizarse. *Objetivos:* Determinar la actividad de este sistema como una de las principales vías de captación de BPA. Caracterizar la expresión de las distintas subunidades que conforman este sistema

de transporte en 5 líneas de melanomas humanos. *Materiales y Métodos:* Se utilizaron las líneas M8, A375 y NPA (M14) derivadas de melanomas cutáneos primarios y Mel-J y M1/15 derivadas de metastasis pulmonar y hepáticas respectivamente. Mel-J y M1/15 fueron incubadas con BPA en presencia y ausencia del inhibidor específico para este transportador el ácido 2-aminobicyclo [2.2.1] heptano-2-carboxílico (BCH). Se determinó la captación celular de <sup>10</sup>B a través de mediciones con ICP-OES. Se extrajeron los RNA totales de cada una de las líneas (trizol reagent) y utilizando RT-PCR (Super Script II transcriptasa reversa) y PCR (Master Mix Promega) se obtuvieron perfiles de expresión para las líneas celulares a través de electroforesis en gel de agarosa 2% teñidos con EtBr. *Resultados:* Se observó un efecto inhibidor del BCH sobre la captación de BPA indicando la importancia de este sistema de transporte en la acumulación celular de BPA. Diferentes isoformas responsables de este transporte fueron co-expresadas en las diferentes líneas. La línea Mel-J co-expresó LAT1, LAT3 y 4F2hc. La línea A375 co-expresó LAT3, LAT4 y 4F2hc. La línea M1/15 co-expresó junto a 4F2hc LAT1 y LAT4. *Conclusiones:* Las diferentes isoformas coexpresadas serían en gran parte las responsables de la captación de BPA en las diferentes líneas. La inducción de la sobreexpresión y el aumento de actividad de estos transportadores podrían jugar un rol clave en la optimización del BNCT para el tratamiento de melanomas.

**608. (378) ROL DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA ACCIÓN FOTOTÓXICA DE UNA FTALOCIANINA DE ZN(II) CATIONICA.**

*Marino J.<sup>1</sup>; García Vior M.<sup>2</sup>; Awruch J.<sup>3</sup>; Roguin L.<sup>4</sup> IQUIFIB, Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 4</sup>; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>2 3</sup>. julietamarino@yahoo.com.ar*

Previamente identificamos un ftalocianinato de Zn(II) catiónico (Pc13) que presenta efecto fototóxico en células provenientes de un carcinoma orofaríngeo humano (KB). Este compuesto es internalizado por las células y se localiza principalmente en los lisosomas. Con el fin de investigar el mecanismo de acción antiproliferativo de esta ftalocianina, se incubaron células KB con 5 µM de Pc13 y posteriormente se irradiaron con una dosis de luz de 4,7 J cm<sup>-2</sup> (630-700 nm). Demostramos que luego de la irradiación se produce una permeabilización parcial de la membrana lisosomal y liberación de Pc13 al citosol. Teniendo en cuenta que los tratamientos fotodinámicos pueden desencadenar procesos oxidativos, estudiamos la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) con una sonda fluorogénica. Por ensayos de microscopía de fluorescencia y citometría de flujo observamos un incremento de los niveles de ROS a los 30 minutos post-irradiación. También comprobamos que el agregado de un agente antioxidante, como el ácido ascórbico, bloquea casi por completo el efecto antiproliferativo de Pc13. Con el propósito de evaluar la inducción de un mecanismo de muerte apoptótico, determinamos la actividad de caspasas. Las células incubadas con Pc13 e irradiadas registraron un incremento de 3 veces en la actividad de las caspasas-3 y -8, y de aproximadamente 1.5 veces en la de caspasa-9 luego de 3 horas. Asimismo, observamos cambios en los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2, traslocación de Bax a las mitocondrias, modificación del potencial de membrana mitocondrial y liberación de citocromo c al citosol. Los resultados obtenidos permiten proponer que el efecto fototóxico de Pc13 es mediado por un estallido oxidativo. La permeabilización lisosomal inducida luego del tratamiento fotodinámico conduciría a la liberación de ROS, que serían responsables de desencadenar los diferentes eventos que conducen a una muerte celular por apoptosis.

**609. (401) CARACTERIZACIÓN DEL RECEPTOR A HISTAMINA H4 EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO Y SU PAPEL EN LA PROLIFERACIÓN.**

*Brenzoni P.<sup>1</sup>; Martinel Lamas D.<sup>2</sup>; Massari N.<sup>3</sup>; Mondillo C.<sup>4</sup>; Núñez M.<sup>5</sup>; Pignataro O.<sup>6</sup>; Rivera E.<sup>7</sup>; Medina V.<sup>8</sup> Laboratorio de Radioisótopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 5 7 8</sup>; Labo-*

*torio de Endocrinología Molecular y Transducción de Señales. Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME-CONICET)<sup>4 6</sup>. pablorenzoni@hotmail.com*

Previamente reportamos la expresión del receptor a histamina (RH4) en líneas celulares y biopsias de lesiones benignas y malignas de la glándula mamaria humana. Para contribuir al mejor conocimiento del papel del RH4 en el cáncer mamario, en este trabajo comparamos su patrón de expresión, la vía de transducción de señales y las respuestas biológicas asociadas en dos líneas celulares con diferentes características de malignidad (MDA-MB-231, receptor a estrógenos, REá-; MCF-7, REá+). Se determinaron: la acumulación de AMPc por RIA, la proliferación mediante el ensayo clonogénico e incorporación de BrdU, la apoptosis mediante el ensayo de TUNEL y Anexina-V y la senescencia a través de la actividad de β-galactosidasa, empleando agonistas del RH4 [clobenpropit (clob) y VUF8430 (VUF)] y el antagonista JNJ7777120. El patrón de expresión determinado por Western blot resultó diferente en ambas líneas celulares, mostrando la presencia de diversas especies moleculares del RH4 que incluyen isoformas y oligómeros. En las células MDA-MB-231, los tratamientos con clob y VUF disminuyeron la proliferación al 45.5±14.8% y 76.7±5.3%, respectivamente. Este efecto se asoció a una reducción de la incorporación de BrdU, a la inducción de apoptosis observándose un aumento del porcentaje de células Anexina-V y TUNEL-positivas [12.5±0.5 (VUF), 14.5 ±0.5 (clob) vs. 3.1±0.6, P<0.01], y a un aumento de la senescencia (2.5-veces, P<0.01). En las células MCF-7, los agonistas inhibieron el aumento de AMPc producido por forskolina en un 30% y la proliferación en un 50%, aumentando el tiempo de duplicación de 32.6±1.3 a 47.2±0.8 y 44.1±3.1 h con clob y VUF, respectivamente (P<0.05). Además, incrementaron el porcentaje de células apoptóticas (3-veces, P<0.01) y senescentes (2-veces, P<0.01). Las respuestas se bloquearon con JNJ7777120. Podemos concluir que las líneas celulares tumorales mamarías presentan una expresión funcional del RH4, indicando un papel clave en la carcinogénesis mamaria.

**610. (486) LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA (QTM) CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y DOXORUBICINA (DOX) INHIBE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y EL DESARROLLO DE METÁSTASIS DEL ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO M-406.**

*Mainetti L.<sup>1</sup>; Fernandez Zenobi M.<sup>2</sup>; Rozados V.<sup>3</sup>; Scharovsky O.<sup>4</sup> Instituto de Genética Experimental. Fac Cs Médicas. U.N.R.<sup>1 2 3 4</sup> leandromainetti@gmail.com*

La QTM consiste en la administración crónica de fármacos a intervalos regulares y sin períodos prolongados libres de droga. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto antitumoral y antimetastásico de la QTM con Cy+Dox en un adenocarcinoma de mama murino (M-406). Ratones endocriados hembras de la línea CBI fueron desafiados con células neoplásicas en forma s.c. e i.v. En el día 9 (s.c.) y día 3 (i.v.) fueron distribuidos en 4 grupos (n: 5-6/grupo): GI-Testigo: 0.2ml solución fisiológica i.p. 3 veces/semana; GII-Cy: 20mg/kg de peso, diariamente en agua de bebida; GIII-Dox: 0.5 mg/kg de peso 3 veces/semana, i.p.; GIV: igual que GII+GIII. Se evaluó 2 veces/semana la evolución del volumen tumoral y el peso corporal. Se tomaron muestras de sangre en el día 0 y al finalizar el experimento, para evaluar posible toxicidad hematológica a través del recuento de glóbulos blancos. En el modelo s.c. en el día 19 el volumen tumoral fue menor en los GII y GIV con respecto al GI (p<0.01). En el día 41, el volumen tumoral de los animales del GIV fue menor que en el GII (p<0.05), y presentó una regresión completa (1/6). La supervivencia de los animales que pertenecen al GIV fue mayor que la de los grupos restantes (p<0.01). En el modelo i.v. los animales fueron sacrificados en el día 24, cuando el primer ratón mostró signos de enfermedad metastásica. El número de metástasis pulmonares fue menor en el GIV en comparación con el GI (p<0.05). El volumen metastásico total (© volumen de cada metástasis) en GI fue mayor que en GII,

GIII y GIV ( $p < 0.01$ ), correspondiendo el menor volumen a GIV. En ambos experimentos (s.c. e i.v.) no se evidenció toxicidad del tratamiento, evaluada por la evolución del peso corporal y el recuento leucocitario. En conclusión, la QTM combinada con Cy+Dox es más eficaz que los tratamientos individuales, presenta efecto antitumoral y antimetastásico significativo, aumenta la supervivencia y carece de toxicidad en el modelo de adenocarcinoma de mama murino M-406.

**611. (564) EPHRIN2 REGULA LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES Y DE MELANOMA HUMANO.**

Gómez M.<sup>1</sup>; Góngora A.<sup>2</sup>; Bravo G.<sup>3</sup>; Flumian C.<sup>4</sup>; Levy G.<sup>5</sup>; Baldi A.<sup>6</sup>

Instituto de Medicina y Biología Experimental - CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>

*martinxv@hotmail.com*

Los receptores Eph y sus ligandos Ephrin son proteínas transmembrana que interactúan por contacto célula-célula y regulan en la mayoría de los tipos celulares diversas actividades biológicas como adhesión, migración y proliferación. Estudios recientes han demostrado que el sistema receptor/ligando EphB4/Ephrin2 está involucrado en la angiogénesis adulta y podría intervenir en la identidad arteriovenosa asociado con la tumorigénesis. Nuestro objetivo fue describir si el sistema receptor/ligando presenta algún efecto en la regulación de la migración en células endoteliales HUVEC y en líneas de melanoma humano A375, IBB Mel-J y LU1205. Para esto, hemos desarrollado un vector de expresión que codifica la porción extracelular de Ephrin2 fusionado a una porción Fc de IgG1 y generamos clones estables de células CHO productoras de esta proteína recombinante. Mediante un ensayo de cicatrización de herida Ephrin2-Fc aumentó significativamente la movilidad de células endoteliales ( $p < 0.01$ ) y de líneas de melanoma ( $p < 0.05$ ), comparado con Fc solo utilizado como control. Similares resultados se obtuvieron usando una proteína recombinante Ephrin2-Fc comercial (R&D). Se realizaron ensayos de migración en transwells para estudiar la movilidad de HUVEC y de LU1205 hacia Ephrin2-Fc, y se observó un incremento de la migración ( $p < 0.05$ ) de HUVEC y de la línea de melanoma LU1205 comparado con aquellas células incubadas con Fc. Por inmunoprecipitación seguida de inmunotransferencia observamos que Ephrin2-Fc activa la fosforilación de su receptor preferencial EphB4 en células HEK293 transfectadas que sobreexpresan EphB4 y en células de melanoma humano. A partir de estos resultados sugerimos que el sistema receptor/ligando EphB4/Ephrin2 estaría modulando la migración en las células de melanoma y en células endoteliales, lo cual sería un potencial blanco farmacológico en esta patología.

**612. (685) ESTUDIOS IN-VIVO DIRIGIDOS A LA APLICACIÓN DE LA TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) AL TRATAMIENTO INDIVIDUAL DEL MELANOMA MALIGNO.**

Carpano M.<sup>1</sup>; Dagrosa A.<sup>2</sup>; Nievas S.<sup>3</sup>; Santa Cruz G.<sup>4</sup>; Perona M.<sup>5</sup>; Cabrini R.<sup>6</sup>; Juvenal G.<sup>7</sup>; Pisarev M.<sup>8</sup>

Dpto. Radiobiología, CNEA<sup>1 6</sup>; Dpto. Radiobiología, CNEA-CONICET<sup>2 5 7 8</sup>; Dpto. de Química, CNEA<sup>3</sup>; Dpto. Instrumentación y Control, CNEA<sup>4</sup>.

*carpano@cnea.gov.ar*

El melanoma es un tumor agresivo que en los estadios avanzados de la enfermedad no responde a los tratamientos convencionales. La terapia por captura neutrónica de boro (BNCT) se basa en la incorporación selectiva de compuestos de <sup>10</sup>B por el tumor y la posterior irradiación con neutrones térmicos para producir una partícula alfa y un núcleo de <sup>7</sup>Li, ambos letales. En la Argentina han sido tratados por BNCT pacientes con melanomas de extremidades, observándose distintas respuestas para un mismo diagnóstico histopatológico y para una misma aplicación terapéutica. El objetivo de este trabajo es optimizar la técnica de BNCT de acuerdo a características individuales de cada tumor. De esta manera, se evaluaron las diferencias individuales en la captación de borofenilalanina (<sup>10</sup>BPA) en relación a las caracterís-

ticas histológicas y térmicas de cada tumor en un modelo animal. Se utilizaron ratones NIH *nude* que fueron implantados con  $4 \times 10^6$  de células de la línea humana de melanoma MELJ. Se midió el crecimiento tumoral y se realizaron estudios de biodistribución de BPA en función del tiempo. El boro fue medido por el método de ICP-OES y se hicieron preparados histológicos del tumor. Además se realizaron estudios de termografía infrarroja midiendo la temperatura del centro y margen del tumor y la temperatura corporal. La captación de BPA mostró una concentración máxima promedio de  $29.8 \pm 1.3$  ppm de <sup>10</sup>B a las 2 h post inyección ( $p < 0.05$ ), la relación en la concentración de boro tumor-sangre (T/S) a ese tiempo fue de 7.46. Se encontró una correlación positiva significativa entre la temperatura del tumor y la relación de concentración de boro en T/S. Estos estudios indican una correlación directa entre la histología del tumor, la captación de BPA y las características térmicas, mostrando que los tumores con mayor porcentaje de área viable tienen una mayor incorporación de boro, una mejor relación en la concentración de boro entre T/S y una mayor temperatura tumoral.

**613. (695) ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN UN MODELO DE CARCINOMA MAMARIO MURINO (F3II).**

Capobianco C.<sup>1</sup>; Alonso D.<sup>2</sup>; Gomez D.<sup>3</sup>; Aguirre-Ghiso J.<sup>4</sup>; Farina H.<sup>5</sup>

Laboratorio de Oncología Molecular, Universidad Nacional de Quilmes<sup>1 2 3 5</sup>; Department of Medicine and Department of Otolaryngology, Mount Sinai School of Medicine<sup>4</sup>.  
*caluc\_86@yahoo.com.ar*

La gran mayoría de las muertes por cáncer se deben al proceso de diseminación a distancia (metástasis) que compromete las funciones vitales de ciertos órganos. En general, las células que conforman el foco metastático atraviesan tempranamente un estado de quiescencia o "dormancy", en donde se ponen en juego mecanismos moleculares distintos al de una célula en proliferación activa. El diseño de modelos que sean capaces de identificar y aislar células tumorales diseminadas (CTDs) en el estadio en que se encuentran es de gran importancia, junto con la caracterización de sus programas de regulación internos. Algunas de las vías estudiadas hasta el momento involucradas en la regulación de los mecanismos de quiescencia y proliferación incluyen a las quinasas p38 y ERK, respectivamente. Con el propósito de desarrollar un modelo para el estudio de la enfermedad mínima residual (EMR) se obtuvieron células de carcinoma mamario murino F3II que expresan la proteína fluorescente GFP, denominadas F3II GFP. A partir de éstas se obtuvo una población clonal estable, denominada F3II 2H8. Paralelamente, se estudió el efecto de la modulación de la enzima p38 en tumores F3II. Se inocularon  $5 \times 10^4$  F3II en el flanco de ratones Balb/c hembras, las cuales fueron posteriormente tratadas con un inhibidor específico de p38 denominado SB203580, a una dosis subóptima de 2 mg/kg/día durante 10 días. Los resultados preliminares mostraron una disminución en el tiempo de latencia tumoral y un aumento en el tamaño tumoral, sugiriendo que la enzima p38 se encontraría involucrada en los procesos de inducción de la quiescencia en las células tumorales. Este dato, junto con el establecimiento de la línea F3II 2H8, constituyen los primeros pasos en el establecimiento de un modelo experimental que permita entender y estudiar la EMR en el modelo de carcinoma mamario murino F3II.

**614. (701) REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO HUMANAS POR HORMONAS TIROIDEAS.**

Valli E.<sup>1</sup>; Barreiro Arcos M.<sup>2</sup>; Cricco Graciela G.<sup>3</sup>; Cremaschi G.<sup>4</sup>; Martín G.<sup>5</sup>

CEFYBO-CONICET; Lab. de Radioisótopos, FFYB, UBA, Buenos Aires, Argentina.<sup>1</sup>; CEFYBO-CONICET, Buenos Aires, Argentina.<sup>2 4</sup>; Lab. de Radioisótopos, FFYB, UBA, Buenos Aires, Argentina.<sup>3 5</sup>  
*eduardovalli@yahoo.com.ar*

Las hormonas tiroideas (HTs) ejercen un amplio efecto sobre la proliferación y diferenciación celular y tiene distintas y contro-

vertidas acciones sobre la patología tumoral. Así, se comprobó un menor crecimiento tumoral en individuos hipotiroideos y se sugirió que las HTs tendrían un rol proangiogénico, aunque estos efectos no son concluyentes. Para estudiar sus acciones sobre células tumorales en este trabajo analizamos el papel de T3 y T4 sobre las líneas de adenocarcinoma mamario humano, MCF-7 y MDA MB231 (MDA). Para ello se realizaron curvas dosis-respuesta de las HTs y se evaluó su efecto sobre la proliferación celular mediante el ensayo clonogénico y por coloración con CFSE. Encontramos que las HTs regulan la proliferación de ambos tipos celulares: dosis fisiológicas de T4, pero supra fisiológicas de T3 (100 nM ambas) aumentan significativamente la división celular ( $p < 0.05$  vs control). Evaluamos la actividad y expresión de las metaloproteasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9) como factores proangiogénicos, así como también la de sus inhibidores (TIMPs) por zimografía directa o reversa y por RT-PCR respectivamente. Comparamos que las dosis proliferativas de HTs incrementaron la actividad de MMP-2 y 9 en MCF-7 y MDA (a modo de ejemplo: en MCF-7 con T3 la MMP-9 aumentó  $155 \pm 14\%$  y con T4  $122 \pm 12\%$ ,  $p < 0.05$ ; en MDA con T3  $115 \pm 5\%$  y con T4  $120 \pm 7\%$ ,  $p < 0.05$ ). Por RT-PCR encontramos un aumento significativo en la expresión de ambas metaloproteasas. En cuanto a los TIMPs, observamos un aumento del TIMP-3 en MCF-7 ( $180 \pm 20$  vs control,  $p < 0.01$ ), pero no en MDA. Dosis mayores de ambas HTs produjeron inhibición de la proliferación, y también de la producción y la expresión de los factores proangiogénicos. Podemos concluir que las HTs tiene efectos proangiogénicos y proliferativos sobre las líneas de adenocarcinoma mamario aquí usadas. Estos resultados contribuirían a clarificar la acción de las HTs en la patología tumoral.

**615. (709) EL HEXACLOROBENCENO INDUCE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE C-SRC Y DEL REÁ E IMPIDIENDO LA ACCIÓN DE LA PROTEÍNA P27 SOBRE EL CICLO CELULAR EN LA LÍNEA MCF-7.**

Ventura C.<sup>1</sup>; Gaido V.<sup>2</sup>; García M.<sup>3</sup>; Nuñez M.<sup>4</sup>; Kleiman D.<sup>5</sup>; Rivera E.<sup>6</sup>; Randi A.<sup>7</sup>; Cocca C.<sup>8</sup>  
Laboratorio de Radioisotopos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA<sup>1 2 4 6 8</sup>; Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales. Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina, UBA.<sup>3 5 7</sup>  
cventura@ffybio.uba.ar

El cáncer de mama es la patología maligna más frecuente en las mujeres. Se ha demostrado que la exposición a los estrógenos a lo largo de la vida es un factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad. El hexaclorobenceno (HCB) es un fungicida organoclorado de elevada persistencia en el medioambiente. En trabajos anteriores habíamos señalado que en la línea MCF-7 derivada de un carcinoma mamario humano, receptor a estrógeno á (REá) positiva, el HCB induce la proliferación celular y que dicho efecto es inhibido por bloqueantes del receptor estrogénico. *Objetivo:* Estudiar en células expuestas al tóxico el efecto sobre el ciclo celular y las proteínas que lo regulan. *Resultados:* Concentraciones de HCB del orden nM indujeron a las 24 h un aumento del 45% de células en fase S ( $p < 0.05$ ) acompañado de un incremento del 94% en la expresión de la ciclina D1 determinada por western blot ( $p < 0.001$ ). Además, observamos un aumento del 200% en la fosforilación de la Tyr537 del REá asociada a la activación del mismo ( $p < 0.001$ ). No encontramos variaciones significativas en los niveles de expresión de la proteína p27 aunque el análisis por inmunocitoquímica mostró cambios en su localización presentándose principalmente en el citoplasma celular. Asimismo, hallamos que la exposición al tóxico indujo, después de 1 hora, un incremento del 50% en la activación de la proteína oncogénica c-src ( $p < 0.05$ ) y su traslocación a la membrana celular. *Conclusión:* La activación de c-Src y del REá así como el cambio en la localización de p27 sugiere que el HCB a las concentraciones estudiadas involucra la activación de la vía estrogénica e impide a la proteína p27, inhibidora de las proteínas quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), expresarse dentro del núcleo celular donde ejerce su efecto inhibitorio de la progresión del ciclo celular.

**616. (739) PHOSPHORYLATION OF SPECIFIC RESIDUES OF THE CARBOXY-TERMINAL ZINC FINGER DOMAIN (ZD2) REGULATES THE ACTIVITY OF THE TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR ZEB1**

Lorenzatti G.<sup>1</sup>; Cabanillas A.<sup>2</sup>

CIBICI-CONICET, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba<sup>1 2</sup>  
glorenzatti@fcq.unc.edu.ar

ZEB1 (Zn Finger E-box Binding Homeobox) is a master regulator of Epithelial-Mesenchymal Transition, a critical program for tumor metastasis. ZEB1 activity can be regulated by changes in its phosphorylation (PO4) status. We previously reported that the hypo-PO4 ZEB1 binds to target genes more strongly than the hyper-PO4 protein and that the C-term Zn finger domain (ZD2) of ZEB1 contains key phosphorylation sites. Our aim is to identify the specific sites in ZD2 that regulate ZEB1 biological role. We performed site-directed mutagenesis of the ZD2 sites with highest phosphorylation scores generating the mutants ZD2-1A (T904A), ZD2-1B (T904A, S932A), ZD2-2A (S895A), ZD2-2B (S895A, S947A, S951A), ZD2-2C (S895A, S947A, S951A, S961A), ZD2-3A (T851A, S852A, S853A), ZD2-3B (T851A, S852A, S853A, S857A) and ZD2-3C (T851A, S852A, S853A, S857A, T867A, T873A). EMSA and gene reporter assays were used to test the binding capacity and the biological role of the mutants. The mutants or the control ZD2 *wt* and the E-cadherin/ZEB1-luciferase promoters were transfected into CHO-K1 cells. The mutants ZD2-1A, ZD2-1B, ZD2-3A and ZD2-3C repressed luciferase more than ZD2 *wt*, while the mutants ZD2-2 showed no change in promoters activity compared to ZD2 *wt*. The treatment with a PKC activator (PMA/ionomycin) reverted the repression induced by both ZD2 *wt* and ZD2-2 mutants, but not the effect obtained with the other mutants indicating that key phosphorylation sites contained in the mutants ZD2-1A, B and -3A, C were made unresponsive to PMA/ionomycin by mutagenesis. As expected, these unresponsive mutants weren't able to increase their binding capacity to ZEB1 target promoters after treatment with alkaline phosphatase (CIP) in EMSAs. ZD2 *wt* and ZD2-2 mutants induced a bigger binding band after CIP treatment. Our results point out to 8 S/T residues in ZD2 domain as responsible for the transcriptional activity of ZEB1.

## FARMACOLOGÍA 6

**617. (172) PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS SCA-9. ACTIVACIÓN DIFERENCIAL DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA.**

Dmytrenko G.<sup>1</sup>; Dasso M.<sup>2</sup>; Español A.<sup>3</sup>; Sales M.<sup>4</sup>

CEFYO CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
anchik\_do@hotmail.com

Ha sido reportado que los receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G (RAPG) modulan la proliferación de células tumorales, por activación de diferentes vías metabólicas, lo que los hace blanco de acción terapéutica. En nuestro laboratorio demostramos la expresión de dos tipos de RAPG: los receptores muscarínicos (RM) y los de compuestos amargos (T2R) en células tumorales de glándula submaxilar murina, SCA-9. En particular, ambos tipos de receptores se acoplan vía proteína G a fosfolipasa C (PLC) y a adenilil ciclasa lo que produce movilización del calcio con activación de óxido nítrico sintasa (NOS) y modulación de los niveles de AMPc respectivamente. Por esto investigamos el efecto de la activación de RM y T2R en la proliferación de células SCA-9. La expresión proteica se determinó por Western blot (Wb), la proliferación celular por el ensayo de MTT y la actividad de NOS mediante la técnica de Griess. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto del basal. Por ensayos de Wb (D.O. relativa) demostramos la expresión de los subtipos M5>M1>M2>M3>M4 (0,96; 0,84; 0,34; 0,21; 0,13;  $p < 0,01$ ) y de T2R6 (3,61) en células SCA-9. Asimismo comprobamos expresión de Gi>Gust (2,0; 0,75;  $p < 0,001$ ), de la enzima PLCb2 (2,37) y

de NOS3>NOS1>NOS2 (0,72; 0,56; 0,31;  $p<0,01$ ). El tratamiento con el agonista muscarínico carbacol (CARB) o con denatonio (DEN) un ligando de T2R, estimuló la proliferación celular en forma concentración dependiente, produciendo un efecto máximo de  $31,7\pm 2,5\%$   $p<0,001$  y  $34,6\pm 13,2\%$   $p<0,05$  a  $10^{-9}\text{M}$  y  $10^{-10}\text{M}$  respectivamente. Además observamos que mientras que el CARB aumentó la actividad de NOS ( $71,9\pm 26,2\%$ ;  $p<0,001$  vs. basal) el DEN la disminuyó ( $35,9\pm 1,6\%$ ,  $p<0,001$  vs. basal). Concluimos que aunque ambos agonistas ejercen un efecto biológico comparable sobre la proliferación celular al activar a sus respectivos receptores, probablemente se acoplen a través de proteínas G diferentes al mismo sistema efector.

**618. (466) EFECTOS ANTIESPASMÓDICOS DE ALOYSIA POLYSTACHYA: MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA TINTURA Y DE (-) CARVONA.**

Consolini A.<sup>1</sup>; Berardi A.<sup>2</sup>

Cátedra de Farmacología Depto de Cs. Biológicas Facultad de Cs. Exactas Univ. Nac. de La Plata<sup>1 2</sup>  
aliciaconsolini@yahoo.com.ar

*Aloysia polystachya* (Verbenaceae) es conocida como "burrito" (B). Es empleada como eupéptico, tiene propiedades ansiolíticas y contiene en su esencia (-)-carvona. El extracto acuoso inhibió no-competitivamente la curva dosis-respuesta (CDR) de acetilcolina (ACh) en duodenos de rata, y también su tintura (TB, obtenida por maceración en etanol-70° al 20%). Para dilucidar si el efecto de TB es debido a: activación de canales de K<sup>+</sup>, liberación de dopamina (DA) o inhibición de canales de Ca<sup>2+</sup>, se estudió la TB-6mg/ml en las CDR-Ach en ausencia y presencia de TEA 10 mM (bloqueante de I<sub>x</sub>) o metoclopramida 10 μM (Metoc, antagonista D2), y en las CDR de Ca<sup>2+</sup>. Para evaluar si (-)-carvona es responsable del efecto, se la estudió en las CDR-Ach. Los ileon aislados de rata se colocaron en cubas con Tyrode (Ca<sup>2+</sup> 1.8 mM, pH 8.2) a 37°C burbujeadas con aire. Se midió la fuerza contráctil con transductores isométricos. Se realizaron CDR de ACh y de Cl<sub>2</sub>Ca en Tyrode-80 mM K, antes y después del agregado de la TB y/o las otras drogas. Resultados: TB (0.6-6 mg/ml) inhibió no-competitivamente la CDR-Ach hasta  $31\pm 6\%$  Emax (CI50:  $3.1\pm 0.6\text{mg/ml}$ , n=8); TB-6mg/ml relajó la contractura de TEA pero potenció su antagonismo no-competitivo en la CDR-Ach desde  $68\pm 5$  a  $24\pm 9\%$  Emax ( $p<0.05$ ); Metoc no afectó la inhibición de TB-6mg/ml en la CDR-Ach ( $42\pm 4\%$  Emax) pero potenció la inhibición no-competitiva de TEA+TB hasta  $9\pm 3\%$  Emax (n=4). TB (6-60mg/ml) inhibió no-competitivamente la CDR-Ca<sup>2+</sup> (CI50:  $17.9\pm 0.8\ \mu\text{g/ml}$ , n=4). Carvona (3-300 μM) inhibió no-competitivamente la CDR-Ach con afinidad (pD<sub>2</sub>) de  $4.00\pm 0.11$  (K:  $99.5\ \mu\text{M}$ ). Conclusiones: la TB produce efecto antiespasmódico intestinal por inhibir el flujo de Ca<sup>2+</sup>, que se potencia por la despolarización al bloquear los canales de K<sup>+</sup>. El efecto no involucra la liberación de DA actuando en D2 por TB ni por TEA. La (-)-carvona es en parte responsable del efecto de la TB por inhibir no-competitivamente la CDR-Ach. UNLP-X-513 y Magister Plantas medicinales.

**619. (517) BASES ESTRUCTURALES DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN INHIBITORIO DE DEHIDROLEUCODINA SOBRE EL TRÁNSITO INTESTINAL.**

Wendel G.<sup>1</sup>; María A.<sup>2</sup>; Aguilar C.<sup>3</sup>; Pelzer L.<sup>4</sup>

Farmacología FQBF Universidad Nacional de San Luis<sup>1 2</sup>  
<sup>4</sup>; Lab Biología Molecular Estructural FQBF Universidad Nacional de San Luis<sup>3</sup>.  
gwendel@unsl.edu.ar

Los receptores α<sub>2</sub>-adrenérgicos median diversas respuestas fisiológicas en el tracto gastrointestinal, entre ellas la regulación de la motilidad intestinal. Dehidroleucodina (DhL), una lactona sesquiterpénica aislada de *Artemisia douglasiana* Besser, ha mostrado acción inhibitoria sobre el tránsito intestinal. El objetivo del presente trabajo fue valorar el efecto de DhL sobre el tracto gastrointestinal superior y su interacción sobre receptores adrenérgicos. Se empleó el método descripto por Di Carlo y col. (1994), que utiliza carbón como marcador en ratones. Para inves-

tigar el mecanismo de acción de DhL se usaron distintas drogas que actúan sobre los sistemas adrenérgico, colinérgico y opioide (mg/kg): fentolamina (1), prazosin (1), yohimbina (1), propranolol (2.5), atropina (0.25) y naloxona (10). Modelado por homología y docking. El modelo tridimensional del receptor de noradrenalina fue realizado usando MODELLER 9.7. La estructura cristalográfica del β<sub>2</sub>-HAGPCR (PDB dataset 2RH1) fue usado como templado, el cual tiene una identidad de secuencia del 35% y una similaridad del 55%. Se utilizó BLAST para la búsqueda de los templados y para hacer las alineaciones. La calidad del modelo se midió con PROCHECK. El docking de DhL se realizó con AUTODOCK 4. En los controles el marcador de carbón atravesó un  $67.25\pm 1.4\%$  de la longitud total del intestino delgado. DhL (60-80 mg/kg) redujo el tránsito intestinal:  $48\pm 2.4\%$  y  $43.75\pm 2.4\%$ , respectivamente ( $p<0.001$ ). Yohimbina y fentolamina antagonizaron significativamente el efecto inhibitorio de DhL ( $p<0.01$ ), que no fue influenciado por atropina, naloxona, propranolol o prazosin. Los resultados demostraron que DhL se une a un solo sitio, equivalente al sitio de unión de carazolol en el receptor β-adrenérgico. En conclusión, los resultados de los experimentos *in vivo* muestran una correlación con el docking de DhL en el receptor α<sub>2</sub>-adrenérgico, lo que sugiere su participación en el mecanismo de acción en la motilidad intestinal.

**620. (294) "SYNERGISTIC ACTIVITY OF BOVINE SERUM, BOVINE WHITE BLOOD CELLS AND TULATHROMYCIN ON SIX STRAINS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS USING A MODIFIED IN VITRO TIME-KILL CURVE MODEL"**

Fuchs A.<sup>1</sup>; Cerra M.<sup>2</sup>; Gumiy D.<sup>3</sup>; Michel P.<sup>4</sup>; Stiefel S.<sup>5</sup>; Picco E.<sup>6</sup>; Formentini E.<sup>7</sup>

Cátedra de Farmacología Facultad de Ciencias Veterinarias UNL<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
insaeculasaeculorumalina@hotmail.com

The biggest difference between *in vitro* and *in vivo* models is the lack of host defenses, such as white blood cells, immunoglobulins, complement, and cytokines. Consequently, *in vitro* models are a simplification of the *in vivo* situation and usually approximate conditions encountered in an immunodeficient patient. In this study, we modified an *in vitro* time-kill curve model by addition of white blood cells isolated from bovine blood and suspended in bovine serum for mimicking an *in vivo* scenario, to evaluate the synergistic activity of complement, the phagocytic activity of neutrophils and the activity of tulathromycin on six strains of *Staphylococcus aureus* at the concentrations of; 0.5 x MIC (2 μg/mL); 1 x MIC (4 μg/mL); 2 x MIC (8 μg/mL); and 4 x MIC (16 μg/mL) over 10 hours. A reference kill-time curve was constructed with the interaction of the bacteria and antibiotic only. The viability of white blood cells is a technical limitation because it was not longer than 5 to 6 hours, so the impact of the addition of isolated white cells was only appreciated during the first five hours of the experiment. The synergistic activity of white cells and serum components as complement and specific antibodies was appreciated by a reduction of viable bacteria in the early times of the experiment respecting the results observed in the reference time kill-curve. This difference was remarkable at low tulathromycin concentrations as 2 μg/mL and 4 μg/mL, in which the numbers of viable bacteria decreased respecting the viable bacteria at time zero, while in the reference time-kill curve at the same concentrations, the counting of viable bacteria increases at 2 μg/mL or remain constant at 4 μg/mL. The results obtained in the present study, shown that *in vitro* models which incorporates factors of the immune response, could generate more precise information about the activity of several antibiotics on several sensible bacterial strains than the classical standardized *in vitro* models.

**621. (551) PERFIL FARMACOCINÉTICO DE CEFOXITINA ADMINISTRADA POR VÍA INTRAVENOSA, INTRAMUSCULAR Y SUBCUTÁNEA A GATOS DOMÉSTICOS.**

Albarellós G.<sup>1</sup>; Denamiel G.<sup>2</sup>; Montoya L.<sup>3</sup>; Quaine P.<sup>4</sup>; Lupi M.<sup>5</sup>; Landoni M.<sup>6</sup>

Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires<sup>1 3 4 5</sup>; Cátedra de Mi-

crobiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires<sup>2</sup>; Cátedra de Farmacología y Toxicología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata<sup>6</sup>  
albarell@fvvet.uba.ar

La cefoxitina (cfo) es una cefalosporina de segunda generación que incluye en su espectro a patógenos grampositivos y gramnegativos aerobios y anaerobios. Es un antibiótico de eficacia "tiempo dependiente", siendo el T>CIM=40-60% el indicador que se utiliza para predecir su eficacia clínica. Su uso se indica para la profilaxis quirúrgica de cirugías abdominales con vertido de contenido intestinal y para el tratamiento de infecciones mixtas graves. El propósito de este trabajo es describir el perfil farmacocinético de cfo después de su administración intravenosa (iv), intramuscular (im) y subcutánea (sc) a gatos bajo condiciones quirúrgicas y sugerir una posología adecuada. Para las administraciones iv, im y sc se utilizaron respectivamente 6, 6 y 5 gatos. Se administró en todos los casos una dosis única de cfo de 30 mg/kg. Se tomaron muestras sanguíneas en tiempos prefijados hasta 12 horas post-administración de cfo. Las concentraciones de cfo en plasma fueron determinadas por el método microbiológico. El límite de cuantificación fue de 3,125 mcg/ml. Se calcularon los principales parámetros farmacocinéticos por métodos convencionales. Se contrastaron estadísticamente los resultados considerando a las diferencias significativas si  $p \leq 0.05$ . Luego de la administración im y sc, las respectivas Cmax fueron: 76,11 y 48,18 mcg/ml y Tmax: 0,15 y 0,58 h. Las correspondientes vidas medias de eliminación fueron: 0,86, 1,23 y 1,44 h y los MRT: 1,15, 1,78 y 2,24 h para las vías iv, im y sc. Se encontraron diferencias significativas entre los Tmax, Cmax y las MRT. Las concentraciones plasmáticas de cfo permanecieron por encima de un valor de CIM de 4 mcg/ml durante 4, 6 y 7 h respectivamente para las vías iv, im y sc. A la dosis ensayada y según los resultados obtenidos se recomendaría la administración de cfo a gatos domésticos cada 8 h para la vía iv, y cada 12 h para las vías im o sc. Trabajo subsidiado por UBACyT, V002, 2008-2010.

## 622. (562) EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS RESIDUOS DE IVERMECTINA EN LA ELABORACIÓN DE YOGUR Y VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS.

lezzi S.<sup>1</sup>; Imperiale F.<sup>2</sup>; Lifschitz A.<sup>3</sup>; Bruschi J.<sup>4</sup>; Lanusse C.<sup>5</sup>

Laboratorio de Farmacología, Fac. de Veterinaria, UNCPBA<sup>1 2 3 5</sup>; Departamento de Tecnología y Calidad de los Alimentos, Área Leche, FCV-UNCPBA, Tandil, Argentina<sup>4</sup>.  
siezzi@vet.unicen.edu.ar

Ivermectina (IVM) es un antiparasitario ampliamente utilizado en animales de producción, incluso en bovinos lecheros, generando la presencia de residuos en leche. El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de diferentes concentraciones residuales de IVM en leche bovina sobre los procesos tecnológicos de elaboración de productos lácteos (yogur) y sobre la viabilidad de las bacterias lácticas. Muestras de leche bovina blanco fueron adicionadas con diferentes concentraciones de IVM (5 a 1000 ng/ml) y sometidas al test de inhibición del yogur para evaluar modificaciones en el desarrollo de las bacterias lácticas (mediciones de acidez). Muestras de yogur con diferentes concentraciones de IVM fueron sembradas en medio agar leche (45°C). Tras 48 hs. se procedió al recuento de bacterias lácticas totales y la observación de la integridad de las mismas por medio de un microscopio electrónico de barrido previo aislamiento y recolección de las colonias bacterianas. En el test de inhibición del yogur, el valor de incremento de acidez de las muestras adicionadas con IVM fue superior a la mitad del valor de incremento de acidez de las muestras control (sin droga) tomado como referencia (4.3°SH). Los resultados obtenidos indican que la presencia de IVM (5 a 1000 ng/ml) en leche bovina no afecta la normal actividad de las bacterias lácticas. El recuento de bacterias lácticas obtenido de yogures elaborados con residuos de IVM fue en promedio ( $\pm$  DS)  $82 \pm 7.13$  colonias y no presentó diferencias significativas con los yogures sin residuos (control). Las imágenes obtenidas de las

observaciones realizadas en el microscopio electrónico aún están siendo analizadas. A pesar de las elevadas concentraciones de IVM adicionadas en leche bovina no se afectan negativamente los procesos de industrialización de la misma basados en la fermentación láctica y el desarrollo bacteriano.

## 623. (70) EFECTO DE UN EXTRACTO DE LARREA DIVARICATA CAV. Y NDGA SOBRE LOS PARÁMETROS OXIDATIVOS EN GLÁNDULA SUBMANDIBULAR DE RATA NORMAL Y DIABÉTICA INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA.

Zettler G.<sup>1</sup>; Turner S.<sup>2</sup>; Filip R.<sup>3</sup>; Anesini C.<sup>4</sup>

IQUIMEFA UBA CONICET<sup>1 2 3 4</sup>

gabrielazettler@gmail.com

Se ha sugerido la participación del estrés oxidativo, a través de la producción de especies reactivas del oxígeno, en la patogénesis y la progresión de diversas enfermedades, como la diabetes. El óxido nítrico (NO) se relaciona con un status de inflamación y oxidación en los tejidos, su derivado el peroxinitrito está involucrado en la oxidación de proteínas y lípidos. *Larrea divaricata* presenta acción antiinflamatoria y antioxidante. Por lo tanto, se propuso estudiar el efecto del extracto acuoso de *L. divaricata* (LAE) (500  $\mu$ g/ml) y su compuesto mayoritario ácido nordihidroguayaretico (NDGA) (1,5  $\mu$ g/ml) sobre el nivel de NO, la peroxidación lipídica (LPX), y la oxidación de proteínas (PO) en glándula submandibular de animales diabéticos inducidos con estreptozotocina. El NO se determinó con el reactivo de Griess, LPx por la formación de MDA (malonaldehído) y PO por el método de la dinitrofenilhidrazina (DNPH). Los resultados se expresaron como la Media  $\pm$  ESM de tres experimentos realizados por duplicado \*\*  $p < 0,01$  diferencias significativas con respecto al control, #  $p < 0,01$  diferencias significativas con respecto a diabéticos, de acuerdo con la prueba t de Student. NO (mM / g glándula): C (control):  $0,45 \pm 0,03$ ; D (diabéticos):  $0,67 \pm 0,04$  \*\*; D + LAE (500 mg / ml):  $0,32 \pm 0,02$  #\*; NDGA (1,5 mg / ml) :  $0,50 \pm 0,02$  #\*. LPx (MDA mM / g glándula): C:  $0,0075 \pm 0,0003$ ; D:  $0,0458 \pm 0,0090$  \*\*; D + LAE:  $0,0020 \pm 0,0002$  #\*; D + NDGA:  $0,0070 \pm 0,0005$  #\*. PO: D: 50% ; D+ LAE: 10% ; D+ NDGA: 20%. Conclusiones: las glándulas submandibulares de los animales diabéticos presentaron estrés oxidativo relacionado con un aumento de NO, peroxidación lipídica y oxidación de proteínas. LAE disminuyó significativamente todos los parámetros oxidativos. El NDGA participaría de estos efectos pero otros compuestos podrían contribuir también a la actividad antioxidante del extracto.

## 624. (124) UTILIZACIÓN DE MEDICAMENTOS EN UN HOSPITAL GERIÁTRICO DE LA PROVINCIA DE SANTA FE. APLICACIÓN DE LOS CRITERIOS DE BEERS.

Marzi M.<sup>1</sup>; Diruscio V.<sup>2</sup>; Pires M.<sup>3</sup>; Nuñez M.<sup>4</sup>; Quaglia N.<sup>5</sup>

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.<sup>1</sup>

Área Farmacología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.<sup>2 3 5</sup>; Cátedra de Farmacología.

Facultad de Medicina.UBA<sup>4</sup>.

marzimarta58@gmail.com

Introducción: El 30% de las hospitalizaciones de ancianos podrían estar ligadas a efectos adversos de las drogas. Los criterios de Beers tienen como objetivo optimizar la prescripción en ancianos a fin de disminuir los eventos adversos de los fármacos y sus consecuencias. Objetivo: valorar la calidad de la prescripción médica realizada en los pacientes residentes del único Hospital Geriátrico Provincial de Rosario. Metodología: Se realizó un estudio descriptivo observacional de corte transversal y se relevaron todas las prescripciones médicas de los ancianos internos entre enero y marzo del año 2010. Para el análisis de las prescripciones se utilizaron los criterios de Beers. Los medicamentos que cumplían con estos criterios fueron clasificados como inapropiados. El análisis de resultados se llevó a cabo mediante el uso de los programas Excel 2005 y Statgraphics Plus 5.0. Resultados: La muestra quedó conformada por 179 residentes de 60 o más años, 81 varones y 98 mujeres con una edad de (media  $\pm$  SEM)  $76,7 \pm 0,6$  años. El número medio de medicamentos prescritos por persona para uso regular fue de (media  $\pm$  SEM)  $6,0 \pm 0,2$ . Drogas

de mayor prescripción (% de pacientes, IC95%): Enalapril: 50,3% (IC95%: 43,0-57,6), ranitidina: 45,8% (IC95%: 38,5-53,1) y ácido acetil-salicílico en dosis < 300mg/día 40,2% (IC95%: 33,0-47,4). Pacientes con al menos una prescripción de medicación inapropiada (MI): 62,5% (IC95%: 5,4-69,6). Los grupos de fármacos más frecuentemente prescritos dentro de la MI correspondieron a aquellos con efectos anticolinérgicos /antihistamínicos y a los benzodiazepínicos. **Conclusión:** El consumo de medicamentos de la población estudiada es similar en cantidad y calidad al encontrado en otras poblaciones de adultos mayores y que se hallan reportados en la literatura. Optimizar la utilización de medicamentos en ancianos requiere de trabajos mancomunados de los distintos actores del sistema de salud.

## 625. (252) SECRECIÓN DE AMILASA INDUCIDA POR CARBACOL EN LA GLÁNDULA PARÓTIDA DE RATAS CON PERIODONTITIS EXPERIMENTAL.

Miozza V.<sup>1</sup>; Sanchez G.<sup>2</sup>; Sterin-borda L.<sup>3</sup>; Busch L.<sup>4</sup>

Cátedra de Farmacología Facultad de Odontología UBA<sup>1</sup>  
2 3 4

valeriamiozza@gmail.com

**Introducción:** En la glándula parótida de ratas con periodontitis experimental se observó un aumento del contenido total y de la liberación basal de amilasa asociado a un aumento de la concentración de AMPc y de la producción de prostaglandinas. **Objetivo:** El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto secretor del carbacol en la glándula parótida de ratas con periodontitis experimental. **Diseño del estudio:** La periodontitis experimental se provocó colocando un hilo en los primeros molares inferiores de ratas macho. Los experimentos se realizaron a los 22 días de colocada la ligadura. Para los estudios de ligando se utilizaron los métodos estándar y para la determinación de amilasa se utilizó un método colorimétrico. **Resultados:** El carbacol provocó un aumento en la secreción de amilasa en ambos grupos. La CE<sub>50</sub> fue significativamente menor en el grupo con periodontitis (Log CE<sub>50</sub>: controles: -6.035 ± 0.25; periodontitis: -7.202 ± 0.18 p<0.01). En ambos grupos el efecto fue inhibido significativamente por el antagonista selectivo del receptor M<sub>3</sub>, 4-DAMP, un inhibidor de la fosfolipasa C, U-73122 y un inhibidor de la calmodulina, trifluoperazina. Los estudios de ligandos, utilizando [<sup>3</sup>H]-QNB, demostraron que no hubo cambios en el número máximo de sitios de unión ni en la Kd. La presencia de un inhibidor de la adenilato ciclasa, SQ 22536, revirtió el efecto de la periodontitis sobre la CE<sub>50</sub> del carbacol (p<0.01). **Conclusión:** La disminución de la CE<sub>50</sub> del carbacol no fue debido a cambios en el mecanismo involucrado ni a cambios en el número de sitios ni en la KD. El efecto fue revertido al inhibir la acumulación de AMPc. Bajas concentraciones de AMPc provocan un aumento en la formación de vesículas secretoras que se dirigen hacia la membrana celular para la exocitosis. Una CE<sub>50</sub> del carbacol en periodontitis igual a la de los controles en presencia de SQ 22536 indica que las vesículas preformadas por el AMPc aumentaron el efecto del carbacol disminuyendo su CE<sub>50</sub>.

## 626 (373) PERSISTENCIA DEL FENÓMENO DE RESISTENCIA ANTIHELMÍNTICA A PARTIR DE LA INFECCIÓN CRUZADA (Bovino/Ovino) DE UNA NUEVA CEPA DE *Fasciola hepatica* RESISTENTE A TRICLABENDAZOLE EN ARGENTINA

Scarcella S., \*Olaechea F., Alzola P., Alzola R., Solana H. Lab. Biol. Cel. y Mol. Dpto. Cs. Biológicas – FCV-UNCPBA (7000) Tandil-Bs. As. \*EEA INTA Bariloche. CC 277 (8400) Bariloche. Rio Negro. silvanas@vet.unicen.edu.ar

La fasciolosis, una zoonosis emergente, es producida por *Fasciola hepatica*, trematodo que parasita el hígado de animales herbívoros y el hombre. Ante una fasciolosis se usa triclabendazole (TCBZ) un benzimidazole halogenado que despolimeriza los microtúbulos del parásito provocando la pérdida de función y muerte. Su indiscriminado uso generó en varias regiones del planeta cepas de *F. hepatica* resistentes haciéndose necesario

ampliar los conocimientos referidos a su mecanismo de acción y eficacia farmacológica. A la fecha ya se presentó en Argentina el primer reporte de resistencia a Triclabendazole (TCBZ) en bovinos en la provincia de Neuquén (*Cepa FermINTA*). Para el caso de parásitos gastrointestinales (*Haemonchus spp*) es conocido el fenómeno de infección cruzada en donde la convivencia de bovinos y ovinos permite que el parásito repique de una especie a otra. Dicho fenómeno aún no ha sido confirmado para el caso de la *Cepa FermINTA* aislada recientemente en nuestro país. El objetivo del presente trabajo fue evaluar histológicamente la probable persistencia del fenómeno de resistencia antihelmíntica a partir de la infección cruzada de la cepa *FermINTA* aislada de bovinos e inoculada artificialmente en ovinos. Se colectaron caracoles *Limnaea viatrix* de potreros donde pastoreaban los bovinos que expresaron las fallas al tratamiento con TCBZ. Las cercarias obtenidas fueron fraccionadas en dosis de 200 metacercarias (mc) y conservadas hasta su uso. Se utilizaron 10 cercarias libres de parásitos los cuales fueron infestados vía ruminal con 200 mc cada uno. A los 79 días pos infestación (p.i) se les administró a 5 de ellos 12 mg/Kg.PV de TCBZ. A la necropsia (Día 109 p.i.) hubo un promedio de 28,9 fasciolas adultas recuperadas por individuo las que fueron procesadas para los estudios histológicos. Se procesaron cortes de 5 µm que fueron coloreados con técnicas de rutina (HyE). A la observación histológica los trematodos provenientes de corderos tratados no mostraron diferencias estructurales con respecto a los controles confirmando la persistencia del fenómeno de resistencia a TCBZ luego de una infección cruzada (de bovino a ovino), hecho que hasta el presente no se tenía registrado para esta cepa en Argentina. Estos resultados constituyen un aporte a la interpretación de la actividad fasciolicida de TCBZ siendo parte de un estudio general que se desarrolla en nuestros laboratorios referido al mecanismo de acción de los antihelmínticos benzimidazólicos

## 627. (444) COMPARACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALVEOLAR MÍNIMA DE ISOFLURANO ADMINISTRADA EN DOS HORARIOS DIFERENTES A CANINOS.

Tarragona L.<sup>1</sup>; Otero P.<sup>2</sup>; Ceballos M.<sup>3</sup>; Zaccagnini A.<sup>4</sup>; Ambros L.<sup>5</sup>; Rovati O.<sup>6</sup>; Rebuerto M.<sup>7</sup>

Farmacología, Anestesiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA<sup>1</sup>; Anestesiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA<sup>2 3 4 6</sup>; Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA<sup>5 7</sup>.

ltarragona@fvvet.uba.ar

**Introducción:** La ritmicidad biológica circadiana que presentan algunos procesos fisiológicos pueden afectar tanto la farmacocinética como la farmacodinamia de ciertas drogas. **Objetivos:** Determinar y comparar las concentraciones alveolares mínimas del isoflurano (CAM<sub>ISO</sub>) en caninos a las 9.00 (actividad) y a las 21.00 h (reposo). **Diseño del estudio:** CICUAL 2008/37. Cinco Beagle adultos (12 ± 1 kg) recibieron isoflurano a las 9.00 h y a las 21.00 h, con 7 días de intervalo. El isoflurano fue administrado mediante un vaporizador que empleó O<sub>2</sub> como gas diluyente. El ETCO<sub>2</sub> se mantuvo entre 35-43 mmHg. Se controló la temperatura corporal (37,5-38,5°C) y ambiental (25-27°C) durante el procedimiento. La primera determinación se realizó a una fracción espirada de isoflurano de 1,3 vol% (monitor Multigas 9100, BCI International), y se incremento o disminuyó ese valor en 0,1 vol% cuando la respuesta fue positiva o negativa, respectivamente. El estímulo supramaximal se realizó mediante una corriente eléctrica de 20 mA y 50 Hz aplicado sobre la piel del metatarso durante 1 min. El movimiento de la cabeza fue considerado como respuesta positiva. La CAM se calculó como el valor promedio de tres determinaciones consecutivas ubicado entre la concentración alveolar a la que se produjo y no se produjo respuesta al estímulo. Se empleó el test de Student pareado, a fin de identificar diferencias significativas entre ambos horarios de administración (pd<sup>o</sup> 0,05). **Resultados:** No se detectaron diferencias en la CAM<sub>ISO</sub> para el tratamiento diurno y nocturno. La CAM<sub>ISO</sub> promedio ± DE fue 1.33 ± 0.06 y 1.36 ± 0.07 a las 9.00 y 21.00 h, respectivamente. **Conclusiones:** La variabilidad circadiana en ciertos procesos fisiológicos puede causar diferencias en los efectos farmacológicos de las drogas,

según la hora del día durante la cual se administre el tratamiento. En este trabajo, no se encontraron diferencias entre las CAM<sub>ISO</sub> administrando el anestésico durante el día o la noche.

**628. (591) COMPARACIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LA ENROFLOXACINA EN CABRAS MEDIANTE DOS MÉTODOS DE DETECCIÓN.**

Ambros L.<sup>1</sup>; Tarragona L.<sup>2</sup>; Kreil V.<sup>3</sup>; Hallu R.<sup>4</sup>; San Andrés Larrea M.<sup>5</sup>; Rebuelto M.<sup>6</sup>  
Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>; Farmacología. Facultad de Veterinaria. UCM<sup>6</sup>.  
ambros@fvet.uba.ar

La enrofloxacinina es parcialmente metabolizada en hígado a ciprofloxacina, por lo cual la actividad antimicrobiana final es producto de ambos principios activos. El porcentaje de metabolización en la cabra es 22%. En estudios farmacocinéticos, la enrofloxacinina se puede cuantificar mediante ensayo biológico, que determina la actividad conjunta de ambas drogas y Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) que distingue a la droga madre del metabolito. El objetivo de este trabajo fue comparar los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de las curvas de disposición obtenidas mediante ambos métodos de cuantificación luego de la administración de enrofloxacinina por vía endovenosa a cabras. Se administró 7,5 mg/kg enrofloxacinina a cinco cabras, y las muestras de sangre se procesaron simultáneamente por ambos métodos. La actividad biológica de enrofloxacinina+ciprofloxacina se calculó por triplicado utilizando como microorganismo patrón *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10034. Las concentraciones de enrofloxacinina en plasma se determinaron mediante HPLC, utilizando metanol: acetoneitrilo:ácido acético:triletamina (74:20:4:1:1 v/v/v/v) como fase móvil, 278nm de longitud de onda y flujo de 1ml/min Para la comparación del área bajo la curva (ABC) y la concentración inicial se obtuvieron los logaritmos y se utilizó un test paramétrico para muestras pareadas. Vida media, clearance, tiempo medio de residencia y volumen de distribución se compararon mediante test no paramétrico. La curva de disposición mostró valores de actividad biológica de enrofloxacinina superiores a los obtenidos con HPLC. Las ABC fueron significativamente menores cuando se obtuvieron mediante HPLC (21,41±7.46 µg·h/ml) que las calculadas mediante método microbiológico (29,38±6,53 µg·h/ml). No se encontraron diferencias en el resto de los parámetros. Nuestros resultados demuestran que el método microbiológico sobrestimaría el valor del área bajo la curva en los estudios farmacocinéticos en cabras

**629. (758) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE Δ5-2-OXOPIPERAZINAS 1,4-DISUSTITUIDAS COMO INHIBIDORES DE LA BIOSÍNTESIS DE TESTOSTERONA Y SU ACCIÓN SOBRE EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS.**

Vecchione M.<sup>1</sup>; Eiras J.<sup>2</sup>; Pasciani G.<sup>3</sup>; Erlejman A.<sup>4</sup>; Bruttomesso A.<sup>5</sup>  
Dto. de Química Biológica, Lab. de Biología Celular y Molecular, Fcen, UBA<sup>1, 4</sup>; Dto. De Química Orgánica, Laboratorio de Diseño y Síntesis de Compuestos Esteroidales, Fitohormonales e Inmunomoduladores, FCEN, UBA.<sup>1, 2, 3, 5</sup>  
aachiocc@qo.fcen.uba.ar

**Introducción.** El cáncer de la próstata (CP) es actualmente la neoplasia maligna más frecuente en los hombres adultos mayores en todo el mundo<sup>1</sup>. Aproximadamente el 80% de los tumores de próstata humanos son dependientes de andrógenos. La inhibición de la CYP17 (P450-CYP17, 17alfa-hidroxilasa-C17,20-liasa) es una alternativa prometedora a la combinación de antiandrógeno y análogos de GnRH porque reduce la biosíntesis de andrógenos tanto a nivel testicular como suprarrenal. Esta enzima es clave en la biosíntesis de andrógenos y por lo tanto es un blanco que ha despertado mucho interés. En este trabajo se evaluaron una serie de Δ5-2-oxopiperazinas 1,4-disustituidas como inhibidores de CYP-17 y su acción sobre el receptor de andrógenos. **Resultados.** *Actividad inhibitoria sobre CYP-17:* La enzima Cyp-17 se purificó de ratas Sprague-Dawley según el método de *Sergejew and Hartmann*.<sup>2</sup> Las alícuotas obtenidas fueron almacenadas a -70

°C. Se determinó la actividad inhibitoria de los nuevos compuestos sintetizados en nuestro laboratorio siguiendo el protocolo detallado por *Sergejew and Hartmann*. [6]. Se determinó la conversión de progesterona por acción de CYP-17 cuantificando por HPLC, en ausencia y presencia de varias concentraciones de Inhibidores. Se utilizó ketoconazol como inhibidor patrón. *Actividad transcripcional de AR:* Células HEK 293T se cotransfectaron con el método de fosfato de calcio con distintas cantidades de plásmido pcDNA3-AR, pPSA-LUC (gen de reporte) y pRSV-β-galactosidasa (para normalizar la transfección). Las células se estimularon con dihidrotestosterona (DHT) El cociente de inducción de LUC/â-gal respecto del basal indicó cuál es la concentración de receptor óptima para el ensayo. Luego se ensayaron en paralelo células tratadas solo con DHT y células tratadas con las distintas oxopiperazinas. **Conclusiones.** En ausencia de una estructura cristalina para la enzima Cyp 17 es necesario sintetizar y evaluar una gran cantidad de compuestos con diferente patrón estructural en la búsqueda de un inhibidor potente y selectivo. Varios de los compuestos han presentado actividad comparable al inhibidor patrón. 1. Murray, T.; et al.. CA Cancer J. Clin. 2007, 57, 43. 2. *Sergejew and Hartmann*. J. Enzyme Inhibition. 1994, 8, 113.

**630. (812) INCIDENCIA DE EFECTOS COLATERALES TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES EN PEQUEÑOS ANIMALES.**

Montoya L.<sup>1</sup>; Albarellos G.<sup>2</sup>; Maldonado F.<sup>3</sup>; Monfrinotti A.<sup>4</sup>; Soraci A.<sup>5</sup>  
Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UBA<sup>1, 2, 4</sup>; Práctica Privada<sup>3</sup>; Toxicología. Facultad de Veterinaria. UNCPBA<sup>5</sup>  
lmontoya@fvet.uba.ar

Los antiinflamatorios no esteroides se hallan entre los grupos de drogas que presentan mayor probabilidad de producir efectos colaterales en medicina veterinaria. Varios autores creen que especies como los caninos y felinos, pueden ser más predispuestas debiéndose contraindicar en pacientes gerontes o con alteraciones renales. Se propuso en el siguiente estudio, analizar la incidencia de efectos adversos a partir de la evidencia aportada por historias clínicas de pacientes. A partir de una base de datos de animales atendidos entre el año 1994 y 2004 en una clínica localizada en la Capital Federal, se consideraron todos aquellos tratados con antiinflamatorios no esteroides. Se registraron en planillas de Excel los datos correspondientes a la reseña, patología existente, administración de drogas según la afección presente y realización de estudios complementarios. Se documentó de dichos animales, el antiinflamatorio administrado, posología, presencia de efectos colaterales, y sistema afectado. El 6% de los pacientes fue tratado con antiinflamatorios no esteroides, dentro de los cuales sólo el 4% correspondió a la especie felina. El 40% los recibió antes del ingreso a la clínica. De los pacientes tratados, el 23% fue dosificado además con glucocorticoides o bien ya había recibido alguna droga antiinflamatoria previamente. La presencia de efectos colaterales fue en el 19% de los pacientes tratados (la mayoría caninos), dentro de los cuales el 40% presentó alteraciones gastrointestinales, 50% renales, y 10% trastornos de coagulación. El 27% fue tratado con protectores digestivos durante la terapia antiinflamatoria. Es de fundamental importancia el monitoreo del uso de drogas antiinflamatorias no esteroides en la práctica médica actual ya que la incidencia de efectos colaterales adversos podría ser mayor a lo aportado por la bibliografía disponible. Dichos estudios colaboran con la implementación criteriosa de esquemas terapéuticos más seguros y eficaces.

## NEUROFARMACOLOGÍA 2

**631. (557) ACTIVATION OF CATALASE BY 3-NITROPROPIONIC ACID INCREASES VOLUNTARY ETHANOL INTAKE IN CONTROL RATS AS COMPARED TO PERINATALLY PB-EXPOSED ANIMALS.**

Mattalloni M.<sup>1</sup>; Cancela L.<sup>2</sup>; Virgolini M.<sup>3</sup>



IFEC-CONICET; Depto de Farmacología. Facultad de Ciencias Químicas, UNC<sup>1 2 3</sup>  
marsol214@hotmail.com

Catalase (CAT) is an antioxidant enzyme with a key role in brain ethanol (ET) metabolism. We have demonstrated that the chronic administration of a CAT inhibitor, 3-amino 1,2,4 triazole (AT) prevents the manifestation of the increased voluntary ET intake and blunted the elevated CAT activity in blood and several brain regions from Pb-exposed animals. In the present study we sought to determinate the effects of the over activation of CAT on ET intake in both, control and Pb-exposed rats. Thirty-five day-old male Wistar rats exposed to 220 ppm Pb during gestation and lactation were submitted to voluntary ET intake during 2 h/day for 28 days. Once stable 10% ET intake was achieved, a subset of animals was injected with vehicle (SAL) or 30 mg/kg of 3-nitropropionic acid (3-NPA), a neurotoxin that boosts CAT activity (days 25-28; groups: 63d-ET-SAL and 63d-ET-chronic3NPA, respectively) while another subset of animals was injected with a single dose of 3-NPA (day 28; group 63d-ET-acute3NPA). All rats were sacrificed on day 28 immediately after the last free-choice ET session, and brain regions harvested to measure brain CAT activity. Blood was collected to analyze CAT activity, Pb, and ET levels. The results demonstrated that chronic (but not acute) 3-NPA administration increased voluntary ET intake in control animals to levels comparable to those of the Pb-exposed group injected with SAL or 3-NPA. The failure of the CAT activator to further increase ET intake in the Pb-exposed rats may be due to a ceiling effect or to 3-NPA neurotoxic effects on striatal neurons. The increases in blood CAT activity in response to 3-NPA were similar in both groups while the NAc was the only brain region from the Pb-exposed group that did not show an increase in brain CAT activity in response to chronic 3-NPA administration. These results are discussed in terms of the putative role of CAT in the increased voluntary ET intake observed in Pb-exposed rats. Sources: SeCyT- CONICET- FONCYT

**632. (587) INTERACCIÓN ENTRE LA NEUROTENSINA Y LA NA/K-ATPASA NEURONAL. MODULACIÓN POR AGENTES ANTIPSICÓTICOS.**

Rosin C.<sup>1</sup>; López Ordieres M.<sup>2</sup>; Rodríguez De Lores Arnaiz G.<sup>3</sup>

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis", Fac. de Medicina, CONICET-UBA y Cátedra de Farmacología, Fac. de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>1 2 3</sup>  
carinarosin@hotmail.com

La interrelación entre los sistema neurotensinérgico y dopaminérgico ha sido establecida. La neurotensina (NT) es responsable, al menos en parte, de las acciones derivadas de la administración de drogas antipsicóticas. La NT disminuye la actividad de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa de membranas sinaptosomales, efecto bloqueado por el antagonista del receptor NTS1 (SR 48692). La administración del antipsicótico típico haloperidol (antagonista del receptor dopaminérgico D2), previene la acción inhibitoria de la NT sobre la enzima. Ensayos de fijación de [<sup>3</sup>H]-ouabaína de alta afinidad (para estudiar el sitio de K<sup>+</sup> de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa) mostraron inhibición por el agregado *in vitro* de NT, no bloqueada por el SR 48692. En este trabajo se realizaron distintos experimentos para conocer la interacción entre los receptores NTS1, dopaminérgico D2 y la actividad de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa neuronal. Se administró a ratas NT (3 - 30 µg, i.c.v.) y a los 60 min se diseccionaron las cortezas cerebrales. Se obtuvieron fracciones de membranas y se realizaron ensayos de fijación de [<sup>3</sup>H]-ouabaína. Se evidenció inhibición significativa con la dosis de 30 µg. Estos resultados indican que la NT *in vivo* también altera el sitio de K<sup>+</sup> de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa. Se administraron ratas con los antipsicóticos haloperidol (2 mg/kg, i.p.) y clozapina (3 - 30 mg/kg, i.p.). Luego de 18 h, se obtuvieron fracciones de membranas de corteza cerebral. Se ensayó la fijación de [<sup>3</sup>H]-ouabaína no encontrándose diferencias en los valores basales ni en la capacidad de la NT (10<sup>-5</sup> M) de inhibir la fijación del ligando. Ensayos de fijación de [<sup>3</sup>H]-NT a membranas de corteza cerebral de ratas tratadas con haloperidol (2 mg/kg, i.p.)

mostraron un incremento significativo (4-5 veces) en Kd y Bmax. Dado que la actividad de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa se modifica por las catecolaminas, para saber si el receptor NTS1 estaba involucrado en ese efecto, se realizaron ensayos en presencia de dopamina y/o SR 48692. Se confirmó que la dopamina 10<sup>-5</sup> M inhibía 32% la actividad enzimática de membranas sinaptosomales; ese efecto no era alterado por el SR 48692, sugiriendo independencia por el receptor NTS1. Se postula que los receptores dopaminérgicos D2 estarían involucrados en la unión de la NT a su receptor NTS1 pero no en la acción de la NT sobre el sitio de K<sup>+</sup> de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa.

**633. (655) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA CEREBRAL EN LOS CAMBIOS PLÁSTICOS INDUCIDOS POR ANFETAMINA EN ÁREAS INVOLUCRADAS EN EL CONTROL DE FUNCIONES CARDIOVASCULARES.**

Marchese N.<sup>1</sup>; Paz M.<sup>2</sup>; Cancela L.<sup>3</sup>; Bregonzio C.<sup>4</sup>  
IFEC- CONICET- UNC<sup>1 2 3 4</sup>  
natimarchese@hotmail.com

La exposición a psicoestimulantes desencadena procesos neuroadaptativos en los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico y noradrenérgico. Estas drogas, activan los mismos circuitos neuronales que la respuesta de estrés y éste aumenta las respuestas cardiovasculares a psicoestimulantes a través de la estimulación de receptores AT<sub>1</sub> de angiotensina II cerebrales. Se han descrito daños vasculares, hemorragias, ACV, vasculitis cerebral por exposición a psicoestimulantes. El sistema renina angiotensina (SRA) cerebral es de gran importancia en la regulación endócrina, autonómica y conductual al estrés. Objetivo: Evaluar el rol de los receptores AT<sub>1</sub> de Angiotensina II cerebral en la plasticidad neuronal inducida por una única exposición a anfetamina (ANF) en áreas relacionadas con las funciones cardiovasculares. Ratas macho Wistar (250- 300g) tratadas durante 5 días con bloqueante de receptores AT<sub>1</sub>, candesartán (3 mg/kg, intragástrico) o vehículo, el día 6 recibieron ANF (5 mg/kg i.p.) o salina. El día 21 se inyectaron con ANF (0,5 mg/kg) ó salina. Noventa minutos después se procesaron para inmunohistoquímica contra c-fos, marcador de activación neuronal, o c-fos y TH en núcleos noradrenérgicos. Otro grupo de animales administrado con ANF (5 mg/kg) o salina recibió 7 o 21 días después ANF (0,5 mg/kg) o salina. Una hora más tarde se procesaron para inmunomarcación de receptores AT<sub>1</sub> en Amígdala Central (CeAmy). Para el análisis se usó ANOVA-2 y test post hoc Bonferroni. Nuestros resultados indican que una única exposición a ANF facilita la activación neuronal en centros noradrenérgicos (LC y NTS) ante una nueva administración de la droga. Este efecto facilitatorio fue prevenido por candesartán. En CeAmy, otra área de control cardiovascular, ANF aumentó la inmunomarcación de receptores AT<sub>1</sub> hasta tres semanas después. La plasticidad neuronal inducida por ANF involucraría la activación del SRA en áreas de control cardiovascular. FONCYT, CONICET, SECYT

**634. (700) VULNERABILIDAD DIFERENCIAL DE DOS CEPAS MURINAS ENDOCRIDADAS GENÉTICAMENTE DIFERENTES A LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A RUIDO ELEVADO.**

Uran S.<sup>1</sup>; Pascuan C.<sup>2</sup>; Caceres L.<sup>3</sup>; Palumbo M.<sup>4</sup>; Wald M.<sup>5</sup>; Guelman L.<sup>6</sup>

Depto. de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA, CEFYBO-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
whooma@hotmail.com

Los seres vivos se encuentran expuestos a peligrosos niveles de ruido provenientes del entorno, que pueden afectar tanto órganos auditivos como extra-auditivos. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la exposición crónica a ruido elevado afecta la conducta en dos cepas de ratón diferencialmente vulnerables al estrés. Dado que el funcionamiento del hipocampo (hip) puede fallar ante un desbalance oxidativo, se evaluaron los niveles de ROS en hip de ratones expuestos. 7 Hembras adultas de las cepas C57BL/6 y BALB/c fueron expuestas a ruido blanco (95-97dB, 1h/día) durante 15 días. La memoria de habituación (MH) y las conductas

relacionadas a la ansiedad (CRA) se evaluaron en un open field en 2 sesiones (S), tanto luego del cese de la exposición (día 1 PE) como 7 días después (día 7 PE). Los niveles de ROS en hip se midieron el día 1 PE. Los resultados muestran en BALB/c una disminución del tiempo en el centro (% C: 30.5±12.6, p<0.01) y del tiempo de rearing (% C: 16.9±4.3, p<0.05) en la 1ª S (aumento de CRA) el día 1 PE, manteniéndose la disminución del tiempo en el centro hasta el día 7 PE (% del C: 31.8±10.2, p<0.01). No se observaron cambios en C57BL/6. Por otro lado, se observó una menor MH en ratones expuestos BALB/c el día 7 PE (C: 1ªS: 198,7±12,9; 2ªS: 146,5±19,7, p<0.05. R: 1ªS: 125,6±20,6; 2ªS: 100,3±11,9, NS), mientras que en C57BL/6, la MH no se encontró alterada luego de la exposición al ruido. Finalmente, no hubo cambios en los niveles de ROS en hip, aunque un leve aumento se observó en C57BL/6 (C: 0,30±0,02; R: 0,38±0,04, NS). Los resultados sugieren que la exposición crónica a ruido elevado afecta diferencialmente a C57BL/6 y BALB/c, siendo esta última más vulnerable al estrés por ruido. Finalmente, la falta de cambio de los niveles de ROS en el hip en BALB/c y el leve incremento en C57BL/6 sugieren que alteraciones tempranas en el estado oxidativo no estarían implicadas en los efectos conductuales deletéreos inducidos por el ruido.

**635. (743) A COMMON GLUTAMATERGIC MECHANISM IS IMPLIED IN THE EXPRESSION OF THE COCAINE AND STRESS-INDUCED REINSTATEMENT IN A CONDITIONED PLACE PREFERENCE PARADIGM.**

De Giovanni L.<sup>1</sup>; Virgolini M.<sup>2</sup>; Cancela L.<sup>3</sup>  
IFEC CONICET<sup>1 2 3</sup>  
luli\_deyo@yahoo.com.ar

Recent studies from our laboratory have demonstrated that the administration of the NMDA antagonist, MK-801, before a single immobilization-stress blocked the stress-induced reinstatement to cocaine in cocaine-conditioned animals. The goal of this study was to study whether the blocking effect of MK-801 on the development of stress-induced reinstatement, was also observed in the expression of this phenomenon. Male Wistar rats (220-300 g) were conditioned with daily cocaine injections (10-mg/kg ip), and confined to one of two compartments during four alternated drug/vehicle sessions, being the preference for each context later evaluated. Thereafter, the preference of the animals for a given context was extinguished with successive vehicle associations in both compartments. In the reinstatement day, the animals were separated in two groups: non-stress and stress (30 min immobilization). After finished the stress protocol, the animals were immediately placed back in their home cages, received MK-801 (0.1 mg/kg ip) or VEH, and tested 15 min later in the conditioned place preference paradigm (CPP). We observed that the MK-801 pre-administration blocked the expression of stress-induced reinstatement as we have previously described for the development of this phenomenon. In addition, the blockade of the two subsequent cocaine-induced reinstatement tests, observed either in the MK-non-stress or the MK-stress groups, indicates a long-lasting effect of MK-801. These results provide evidences that, glutamatergic mechanisms activated immediately after the end of the stress, are implied in the expression of the stress-induced reinstatement in the CPP. Finally, these findings further support the hypothesis of an interchangeability in the mechanisms underlying the stress and cocaine-induced reinstatement. Financial Support: FONCYT, SECyT, CONICET

**636. (799) LA FALTA DE LA SUBUNIDAD GABA(B1) DEL RECEPTOR GABAB MODIFICA EL COMPONENTE SOMÁTICO Y LA EXPRESIÓN DE FOS-LIR DURANTE EL SÍNDROME DE ABSTINENCIA A LA NICOTINA EN RATONES.**

Barboza A.<sup>1</sup>; Varani A.<sup>2</sup>; Moutinho L.<sup>3</sup>; Balerio G.<sup>4</sup>  
Instituto de Investigaciones Farmacológicas<sup>1 2 3</sup>; Instituto de Investigaciones Farmacológicas; Cátedra de Farmacología-Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA)<sup>4</sup>  
biobarboza@gmail.com

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el baclofen (BAC), agonista selectivo de los receptores GABA<sub>B</sub>, es capaz de prevenir la expresión somática del síndrome de abstinencia a la nicotina (NIC) y restablecer la expresión de Fos-LIR (inmunoreactividad similar Fos) modificada durante dicho síndrome, en ratones normales. Teniendo en cuenta estos antecedentes, los objetivos del presente trabajo fueron: 1) estudiar la expresión del síndrome de abstinencia a la NIC en ratones deficientes en la subunidad GABA<sub>(B1)</sub> del receptor GABA<sub>B</sub> (ratones GABA<sub>(B1)KO</sub>) y 2) evaluar la expresión de Fos-LIR en distintas áreas cerebrales durante dicho síndrome en ratones GABA<sub>(B1)KO</sub>. Para ello, se utilizaron ratones GABA<sub>(B1)KO</sub> y sus respectivos wild-type (WT), los que fueron implantados bajo una suave anestesia con minibombas osmóticas las que contenían solución salina (SAL) o NIC. Los animales recibieron NIC (25 mg/kg/día) o SAL durante 6 días. Al 7º día se precipitó el síndrome de abstinencia administrando el antagonista nicotínico mecamilamina (1 mg/kg, sc) y se evaluaron los signos de abstinencia durante 30 min. Inmediatamente después, los animales se anestesiaron, perfundieron con paraformaldehído, y se obtuvieron cortes cerebrales para determinar la expresión de Fos-LIR mediante inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos mostraron un incremento significativo de los signos somáticos del síndrome de abstinencia a la NIC en los ratones WT (p<0,001), mientras que en los ratones GABA<sub>(B1)KO</sub>, no se observaron signos de abstinencia. Por otro lado, la expresión de Fos-LIR disminuyó significativamente en el giro dentado del hipocampo (p<0.05) y en la amígdala basolateral (p<0,05) de ratones WT, durante el síndrome de abstinencia a la NIC, mientras que en los ratones GABA<sub>(B1)KO</sub>, no se observó dicha disminución. En conclusión, estos resultados sugieren que los receptores GABA<sub>B</sub> podrían estar modulando la expresión somática y los cambios bioquímicos del síndrome de abstinencia a la NIC.

**637. (122) PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DE UNA NUEVA COMBINACIÓN DE GLICISOFORMAS DE RHEPO (NEUROEPOETIN) CON ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA.**

Mattio M.<sup>1</sup>; Ceaglio N.<sup>2</sup>; Orozco G.<sup>3</sup>; Oggero M.<sup>4</sup>; Perotti N.<sup>5</sup>; Kratje R.<sup>6</sup>; Etcheverrigaray M.<sup>7</sup>  
Laboratorio de Cultivos Celulares FBCB UNL<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
mmattio@fcb.unl.edu.ar

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) no sólo es una hormona hematopoyética sino fundamentalmente una citoquina protectora de tejidos y, en particular, neuroprotectora. Por lo tanto, su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) es crucial para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso. Sin embargo, su aplicación en dichas patologías estaría limitada por su actividad eritropoyética, debido a la aparición de efectos colaterales. Por ello, en nuestro laboratorio hemos obtenido una nueva combinación de glicofomas con actividad eritropoyética *in vivo* muy reducida y con mayor actividad neuroprotectora, a la que denominamos Neuroepoetin (rhNEPO). El objetivo del presente trabajo fue estudiar los parámetros farmacocinéticos de esta variante en plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) en comparación con la rhEPO. Se inocularon ratas Wistar con una dosis única de cada variante (500 µg) por vía endovenosa (iv) e intraperitoneal (ip) y se extrajo LCR (mediante punción de la cisterna magna) y plasma (mediante punción del plexo venoso retroorbital) a distintos tiempos post-inyección. La concentración de las moléculas en las muestras fue determinada mediante técnica de ELISA. Los parámetros farmacocinéticos fueron calculados ajustando los valores a un modelo bicompartimental para plasma (vía iv) y no compartimental para plasma (vía ip) y para LCR (vías iv e ip). Por ambas vías, la rhNEPO demostró una mayor velocidad de depuración sanguínea que la rhEPO (vía iv: 31,6 y 3,3 ml.min<sup>-1</sup>; vía ip: 70,5 y 3,9 ml.min<sup>-1</sup>). No obstante, la rhNEPO atravesó la BHE más rápidamente que la rhEPO, detectándose en LCR a los 5 min post-inyección iv, mientras que la rhEPO no se encontró en LCR hasta los 30 min. Por vía ip, la máxima concentración de rhNEPO y rhEPO en LCR se alcanzó a las 4h y 8h, respectivamente. La capacidad de la rhNEPO de atravesar

rápidamente la BHE plantea el interés de su empleo para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

**638. (201) NUEVOS HALLAZGOS SOBRE LA ACCIÓN DE LA HESPERIDINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. A) ADMINISTRACIÓN AGUDA.**

Loscalzo L.<sup>1</sup>; Wasowski C.<sup>2</sup>; Marder M.<sup>3</sup>

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas IQUIFIB UBA CONICET<sup>1 2 3</sup>  
leoloscalzo@hotmail.com

**Introducción:** Nosotros hemos demostrado que la hesperidina (HN), un flavonoide glicosilado presente en raíces y rizomas de *Valeriana wallichii*, *Valeriana officinalis* y en frutos de Citrus, administrado en forma aguda e intraperitoneal (i.p.) en ratones, posee efectos antinociceptivos, sedativos e inductores del sueño y que los receptores opioides estarían involucrados en dichas acciones. **Objetivos:** Evaluar los efectos de la HN por administración oral aguda y completar su perfil farmacológico por administración i.p. en ratones. **Diseño del estudio:** Se utilizaron ratones Swiss macho de 2 meses y medio de edad administrados con: a) una única inyección i.p. de vehículo o solución de HN (30 min antes de realizar los ensayos); b) una única inyección oral (p.o.) del vehículo o solución de HN (1 y 4 h antes de realizar los ensayos) a ratones ayunados por 15 h. Los efectos de la HN fueron evaluados en los ensayos de: campo abierto con agujeros ("hole-board"), actividad locomotora, malla invertida ("inverted screen"), pérdida del reflejo postural normal inducido por tiopental sódico, contorsiones inducidas por ácido acético ("writhing"), latigazo por la cola ("tail-flick") y plato caliente ("hot-plate"). **Resultados:** HN 10 y 30 mg/kg i.p. produjo efectos antinociceptivos (bloqueados por naltrexona, antagonista opioide no selectivo) en el ensayo de hot-plate sin provocar incoordinación motora. Se utilizó morfina 6 mg/kg como control positivo. HN 1, 10 y 30 mg/kg i.p. no induce efectos en el ensayo de tail-flick. HN 100 y 300 mg/kg p.o. no produjo diferencias significativas con respecto a los vehículos en los parámetros evaluados en los ensayos de hole-board, actividad locomotora, writhing o pérdida del reflejo postural normal. **Conclusiones:** La administración i.p. de HN produjo efectos antinociceptivos centrales en ratones mediados por los receptores opioides. La administración por vía oral de HN en las dosis ensayadas es inactiva.

**639. (207) NUEVOS HALLAZGOS SOBRE LA ACCIÓN DE LA HESPERIDINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. B) INGESTA CRÓNICA**

Wasowski C.<sup>1</sup>; Higgs J.<sup>2</sup>; Marder M.<sup>3</sup>

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas IQUIFIB UBA CONICET<sup>1 2 3</sup>  
criswasowski@yahoo.com.ar

**Introducción:** Nosotros hemos demostrado que la hesperidina (HN), un flavonoide glicosilado presente en raíces y rizomas de *Valeriana wallichii*, *Valeriana officinalis* y en frutos de Citrus, administrado en forma aguda intraperitoneal en ratones, posee efectos antinociceptivos, sedativos e inductores del sueño y que los receptores opioides estarían involucrados en dichas acciones. **Objetivos:** Determinar los efectos de la ingestión crónica de un líquido que contiene HN en ratones. **Diseño del estudio:** Se utilizaron ratones Swiss macho de 2 meses y medio de edad tratados en paralelo con agua, carboximetilcelulosa (CMC) 0.05% (vehículo) y una mezcla de CMC 0.05% y HN (100, 250 y 500 mg/l), como única fuente de bebida, durante 15 días consecutivos. El volumen de líquido consumido y la cantidad de comida ingerida fueron medidos diariamente (la ganancia de peso corporal semanalmente) no observándose diferencias significativas entre los grupos. Considerando un volumen de líquido ingerido promedio de 6 ml/ratón, las dosis diarias de HN fueron de 20, 50 y 100 mg/kg. Los efectos sobre el SNC fueron evaluados en los ensayos de laberinto en cruz elevado (plus-maze), campo abierto con agujeros (hole-board), actividad locomotora, malla invertida, pérdida del reflejo postural normal inducido por tiopental sódico y plato caliente. **Resultados:** HN 100 mg/kg diarios indujo aumentos

significativos en el % de entradas en las ramas abiertas y en el % tiempo que permanecen en ellas en el ensayo de plus-maze. HN 50 y 100 mg/kg diarios provocaron incrementos significativos en el número de "rearings" evaluados en el ensayo de hole-board. La ingestión de HN, en las dosis ensayadas, no produce incoordinación motora, no causa efectos depresores del SNC y no induce efectos antinociceptivos. No se observaron diferencias entre los ratones que tomaron agua y aquellos que tomaron CMC 0.05%. **Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que la ingestión crónica de HN induce efectos ansiolíticos en ratones.

**640. (302) HIPPOCAMPAL ALPHA7 NICOTINIC RECEPTORS MODULATE MEMORY RECONSOLIDATION OF AN INHIBITORY AVOIDANCE TASK IN MICE.**

Krawczyk M.<sup>1</sup>; Boccia M.<sup>2</sup>; Blake M.<sup>3</sup>; Baratti C.<sup>4</sup>

Cátedra de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica - UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
teki\_mari@hotmail.com

CF-1 male mice were trained in an inhibitory avoidance task using either a mild or a high footshock (0.8 or 1.2 mA, 50 Hz, 1s). A retention test was given 48 hours later. Immediately after the retention test, mice were given intra-dorsal hippocampus infusions of either choline (Ch, an  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor agonist, 0.08–1.30 mg/hippocampus), or methyllycaconitine (MLA, an  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor antagonist, 1.0–30.0 mg/hippocampus). Memory retention was tested again 24 h later. Methyllycaconitine impaired retention performance regardless of footshock intensity and its effects were long lasting. Ch impaired retention performance only in those mice trained with a high footshock. On the contrary, Ch enhanced retention performance when mice were trained with a mild footshock. These effects were long lasting and dose- and time-dependent. Retention performance was not affected in drug-treated mice that were not subjected to memory reactivation, suggesting that the performance effects could not be attributable to non-specific effects of the drugs. Methyllycaconitine effects were dose-dependently reversed by choline, suggesting that MLA and Ch interact at the  $\alpha 7$ nAChR. Altogether, results suggest that hippocampal  $\alpha 7$ nAChRs play a critical role in reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice, and may also have important implications for dynamic memory processes. This is the first presentation, to our knowledge, indicating that a specific receptor ( $\alpha 7$ nAChR) is able to modulate consolidated memories after retrieval.

**641. (368) EL ESTRÉS CRÓNICO POR INMOVILIZACIÓN AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CANABINOIDE TIPO 1 (CB1) E IL-6 EN AMÍGDALA E HIPOCAMPO.**

Burdet B.<sup>1</sup>; De Laurentis A.<sup>2</sup>; Mohn C.<sup>3</sup>; Maur D.<sup>4</sup>; Burdet J.<sup>5</sup>; Rettori V.<sup>6</sup>; Zorrilla Zubilete M.<sup>7</sup>

Primera Cátedra de Farmacología UBA Facultad de Medicina CEFYBO CONICET<sup>1 4 5 7</sup>; UBA Facultad de Medicina CEFYBO CONICET UBA<sup>2 3 6</sup>  
burburdet@hotmail.com

El estrés crónico activa el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) y produce cambios en algunos parámetros asociados con la ansiedad en las áreas límbicas. Por otra parte, el sistema endocannabinoide modula la respuesta neuroendocrina al estrés. El objetivo de este estudio fue evaluar si el estrés crónico por inmovilización podría modificar la expresión del ARN mensajero de los receptores cannabinoides, así como de la IL-1 $\beta$  e IL-6 en la amígdala e hipocampo. Ratas macho Sprague-Dawley adultas fueron divididos en 4 grupos: control (C) y estresadas por inmovilización por dos horas diarias durante 7, 14 o 21 días (n= 6-8 ratas por grupo). Los resultados mostraron que aumentaron los niveles plasmáticos de corticosterona (p <0,05), así como el peso de la glándula suprarrenal (p <0,05) en todos los grupos sometidos a estrés por inmovilización. La ocitocina (OXT) en plasma sólo aumentó significativamente a los 7d (p <0,01) y 21d (p <0,05). La expresión de ARNm de CB1 en hipocampo por qPCR mostró un aumento en todos los grupos estresados, y de la IL-6 solo a los 7d y 21d (p <0,001). En cuanto a la cantidad proteica

evaluada por western blot de CB1 no se encontraron diferencias significativas en los grupos estresados respecto a los controles. Los ARNm de la IL-6 y de IL-1 $\beta$  en la amígdala fueron significativamente superiores sólo a los 14d ( $p < 0,05$ ) de estrés evaluado por RT-PCR. Por otro lado, los animales estresados mostraron una reducción de la habituación en la prueba de campo abierto ( $p < 0,05$ ). En conclusión, el estrés crónico aumentó la IL-6 e IL-1 $\alpha$  en la amígdala. Así mismo el sistema endocanabinoide del hipocampo participaría en este paradigma de estrés. (BID PICT 06-0258; CONICET- PIP 02546).

**642. (381) LA HIPONUTRICIÓN PERINATAL FACILITA EL INCREMENTO DE LOS NIVELES DE P-ERK2 EN NÚCLEO ACCUMBENS LUEGO DE UN TRATAMIENTO REPETIDO CON UNA DOSIS BAJA DE COCAÍNA.**

Velazquez E.<sup>1</sup>; Maldonado N.<sup>2</sup>; Valdomero A.<sup>3</sup>; Orsingher O.<sup>4</sup>; Cuadra G.<sup>5</sup>

Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, UNC, IFEC CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>  
edvelazquez@fcq.unc.edu.ar

Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la hiponutrición temprana facilita el desarrollo de la sensibilización motora a cocaína y morfina. Por otra parte, es ampliamente conocida la participación de la quinasa regulada por la señal extracelular (Erk) en dicho fenómeno. Se ha descrito que los niveles de Erk activado (p-Erk) aumentan en núcleo accumbens (NAc) durante la abstinencia a cocaína, produciendo un incremento significativo a los 7 días que retorna a valores basales el día 21. Se cree que este aumento, dependiente del tiempo, podría ser parte de la plasticidad neuronal que subyace a los cambios conductuales que se observan a largo plazo como el deseo compulsivo por la droga. Así, nos propusimos estudiar si la hiponutrición perinatal afecta la activación de Erk2, isoenzima implicada en los procesos adictivos, durante la abstinencia luego de un tratamiento repetido con una dosis baja de cocaína. A tal fin, ratas adultas sometidas a un esquema de privación proteica en edad perinatal (D) y animales controles (C) recibieron una inyección diaria de cocaína (5 mg/kg; i.p.) o salina (1ml/kg) durante 7 días. Para determinar el desarrollo de sensibilización, la actividad motora fue evaluada los días 1 y 7 de tratamiento, luego las ratas permanecieron libres de droga durante 7 días. Este día, los animales fueron sacrificados y se determinaron los niveles de pErk2 en NAc "core" mediante western blot. En coincidencia con estudios previos, solo las ratas D mostraron sensibilización motora a cocaína y dicho fenómeno fue acompañado por un aumento de los niveles de p-Erk2 en NAc "core", con respecto al grupo tratado con salina. Estos resultados sugieren que la hiponutrición temprana facilitaría los cambios adaptativos que ocurren durante la abstinencia a cocaína, los cuales participan en alteraciones duraderas como deseo compulsivo por el consumo.

**643. (520) INHIBITING ACTIN CYCLING IN THE NUCLEUS ACCUMBENS PREVENTS STRESS CROSS-SENSITIZATION WITH COCAINE AND STRESS-INDUCED ELEVATION IN GLUR1.**

Esparza A.<sup>1</sup>; García Keller C.<sup>2</sup>; Virgolini M.<sup>3</sup>; Cancela L.<sup>4</sup>  
IFEC-CONCET Facultad de Ciencias Químicas<sup>1 2 3 4</sup>  
alejandraesparza@hotmail.com

Drug addiction is associated with long-term changes in the synaptic function, including the actin cytoskeleton. There is evidence about the proactive influence of stress on drug addiction. The present study investigated whether the neurobiological mechanisms that modulate repeated cocaine administration also occur in a stress-induced cocaine sensitization model. These experiments evaluated whether repeated stress induces alterations in actin rearrangement and AMPA receptors (AMPA) expression in the Nucleus Accumbens (NAc). Male Wistar rats were restrained daily for 2 hours for 7 days. Three weeks after the last stress, animals were decapitated 45 min after saline or cocaine (30 mg/kg i.p.), and the Nac dissected. After subcellular fractionation, the immunoreactivity of the actin and actin binding proteins (ABPs) were

determined by Western blot. For motor activity, animals receive latrunculin A or DMSO microinjections, which were followed by cocaine (15 mg/kg, i.p.) or saline, and behavior recorded for 120 min. For AMPAR expression, three weeks after chronic stress, rats were injected i.p. with saline, or cocaine 30 mg/kg and sacrificed 45 min later. In another experiment, the animals were injected with Latrunculin A or vehicle intra-NAc 5 min before cocaine 30 mg/kg i.p., and sacrificed 45 min later to determine the expression of AMPAR. Our experiments revealed that stress induced changes in protein levels involved in synaptic plasticity, such as actin and ABPs that regulate actin cytoskeleton in NAc. The stress-induced sensitization to cocaine was prevented by intra-NAc latrunculin A (0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Interestingly, latrunculin A in the NAc also reversed the stress-induced increase in GluR1, indicating a potential role for actin cycling in the increased AMPAR accompanying cocaine cross-sensitization. This is the first evidence that the remodeling of the actin cytoskeleton contributes to the cross-sensitization between stress and cocaine. Grants: FONCyT, SECyT, CONICET.

**644. (535) EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A ESTRÉS CRÓNICO MODERADO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HIPOCAMPO DE RATONES BALB/C Y C57BL/6. PAPEL DE LA ACTIVIDAD DE NNOS.**

Palumbo M.<sup>1</sup>; Zorrilla-zubilete M.<sup>2</sup>; Genaro A.<sup>3</sup>  
CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1 2 3</sup>  
molecula\_21@yahoo.com.ar

El estrés ha sido implicado en desórdenes psiquiátricos. Tanto el estrés oxidativo como la producción de óxido nítrico (NO) han sido involucrados en varios procesos patofisiológicos en el cerebro incluyendo la respuesta hipocampal al estrés. En trabajos previos observamos que el modelo de estrés crónico moderado (CMS) indujo una menor capacidad de aprendizaje y memoria en los ratones BALB/c pero no en los C57BL/6. En el presente trabajo investigamos el efecto del CMS sobre el estrés oxidativo en hipocampo (un área límbica involucrada en el aprendizaje y la memoria), de ratones BALB/c y C57BL/6. Observamos en homogenatos de hipocampus provenientes de ratones BALB/c CMS un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) tanto basal como estimulada con NMDA ( $10^{-4}$  M) ( $X \pm ES$  (pmol/mg/30min), control (N): basal =  $4,9 \pm 0,1$  y NMDA =  $7,4 \pm 0,3$ ; CMS: basal =  $6,3 \pm 0,2$  y NMDA =  $13,1 \pm 0,7$ ;  $n=6$ ). Por el contrario, en ratones C57BL/6 estresados no se encontraron diferencias en los niveles de ROS basal ni estimulado con NMDA respecto a su control. En cuanto a las defensas antioxidantes, no se observaron diferencias significativas en los niveles de catalasa y superóxido dismutasa ni en la producción de glutatión para ratones de ambas cepas sometidos a CMS. Por otra parte, la producción de NO disminuyó con el estrés en ratones BALB/c y no se observaron cambios en los C57BL/6, respecto a sus controles ( $X \pm ES$  [ $^{14}\text{C}$ ]L-citrulina (pmoles/g de tej./30 min) BALB/c:  $N = 320 \pm 16$ , CMS =  $110 \pm 8$ ; C57BL/6:  $N = 543 \pm 41$ , CMS =  $580 \pm 29$ ). Además, el tratamiento de homogenatos de hipocampo con un inhibidor específico de la isoforma neuronal de NOS (nNOS) produjo un aumento en los niveles de ROS tanto basal como estimulados con NMDA en ambas cepas de ratón. Estos resultados sugieren un papel importante para la nNOS que estaría regulando los niveles de ROS, cuyo aumento conlleva al déficit cognitivo observado en los ratones expuestos a estrés crónico moderado.

**645. (536) A LONG TERM STRESS-INDUCED SENSITIZATION TO COCAINE IS ASSOCIATED WITH OPPOSITE CHANGES IN AMPA RECEPTORS AND COCAINE-INDUCED GLUTAMATE RELEASE IN NUCLEUS ACCUMBENS.**

García Keller C.<sup>1</sup>; Martínez S.<sup>2</sup>; Esparza A.<sup>3</sup>; Cancela L.<sup>4</sup>  
IFEC-CONICET. Facultad de Ciencias Químicas, UNC<sup>1 2 3 4</sup>  
cgarciakeller@gmail.com

Cocaine induces behavioural and molecular sensitization in both, the dopaminergic (DA) and glutamatergic (Glu) mesocortico-limbic systems. It has been shown that glutamatergic mechanisms are involved in the development of stress-induced sensitization

to behavioural and neurochemical effects of psychostimulants (Pacchioni et al., 2007). The aim of this work was to study the cocaine-induced DA and Glu release as well as the AMPA receptor (AMPA) surface expression in Nucleus Accumbens Core and Shell (NAc and NAs), from pre-stressed animals. Male Wistar rats (250-350 g) were restrained for 2 h while control animals were left undisturbed in their cages. Twenty-one days after stress, all animals were assigned to one of the following experiments: I) Microdialysis: DA and Glu levels were determined by HPLC in NAc and NAs in response to saline and cocaine (15mg/kg ip). II) AMPAR expression in NA after saline or cocaine (15 mg/kg i.p.). The animals were decapitated 45 min after the injections, the NA was dissected and the surface fraction was subjected to quantitative immunoblotting for AMPAR using anti-GluR1, as primary antibody. Our results demonstrate that in NAc from pre-stressed animals, the cocaine-induced DA release was clearly augmented meanwhile the drug-induced Glu release was decreased as regard to the values observed in the non-stress group. Since the AMPAR surface expression was increased in NA from pre-stressed animals, it is conceivable to think that an homeostatic compensatory mechanism opposes to the decrease in Glu release. It should be noted that, the mechanism implied in the increase of AMPAR following withdrawal of a cocaine sensitization regime, is yet unknown. These findings are discussed in the framework that relevant plastic changes are common between the stress and drug-induced sensitization whereas another seem to be differently triggered for each one of these factors. \*Equal Contribution. Financial support: FONCyT, CECyT, CONICET.

**646. (539) COCAINE-INDUCED INCREASE IN MET-ENKEPHALIN AND PROENKEPHALIN MRNA LEVELS IN MESOCORTICOLIMBIC BRAIN AREAS IS REVERSED BY MK-801: AN INFLUENCE ON THE LYMPHOPROLIFERATIVE RESPONSE.**

*Renna M.\*<sup>1</sup>; Assis M.\*<sup>2</sup>; Mongi Bragato B.\*<sup>3</sup>; Cancela L.\*<sup>4</sup> IFEC-CONICET- Facultad de Ciencias Químicas.-UNC<sup>1 2 3 4</sup>*

*solrenna@yahoo.com.ar*

Drugs of abuse clearly disrupt immune and central functions. We have previously shown that amphetamine influences simultaneously the enkephalinergic system in brain and immune organs, and that met-enkephalin (ENK) would be mediating functional consequences at both levels. The main goal of this study was to determine the influence of an acute cocaine treatment on ENK and proenkephalin (proENK) mRNA levels in mesocorticolimbic brain areas, as well as on a functional parameter of the immune system, the lymphoproliferative response of T-cell populations. The participation of glutamatergic mechanisms in the effects of cocaine at central and immune levels was also studied. Male Wistar rats were injected with an acute dose of cocaine (30mg/Kg ip) or vehicle (VEH), and 4 days after animals were killed. Brain areas and immune organs were obtained and properly processed to measure ENK levels by RIA. Splenic T-cell proliferative response was measured by a mitogenic assay using ConA. In another set of experiments, animals were pre-treated with MK-801 (0.1 mg/kg, i.p.) or VEH, 15 min before cocaine or VEH, and 3 h after the animals were killed and the brain areas and spleen were removed to measure proENK mRNA levels by RT-PCR. Our results demonstrate that cocaine increased ENK and proENK mRNA levels in CNS structures related to drug addiction, such as nucleus accumbens (NAc), striatum (ST) and prefrontal cortex. MK-801 abrogated cocaine-induced effects on proENK mRNA levels in NAc and ST, similarly to that previously observed following amphetamine. Interestingly, the cocaine-induced decrease in the lymphoproliferative response was found simultaneously to the cocaine-induced changes in brain ENK, as was shown after amphetamine on ENK from either brain or immune organs. These findings are discussed in the framework of the role that ENK could be playing in drug addiction and immunosuppression like a biochemical bridge that participate at both, central and immune system.

**647. (808) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA GABAÉRGICO EN EL EFECTO ANTINOCICEPTIVO DE LA MORFINA EN RATONES DE AMBOS SEXOS.**

*Pedron V.\*<sup>1</sup>; Varani A.\*<sup>2</sup>; Balerio G.\*<sup>3</sup>*

*Instituto de Investigaciones Farmacológicas<sup>1 2</sup>; Instituto de Investigaciones Farmacológicas; Cátedra de Farmacología - Fac. de Farmacia y Bioquímica (UBA)<sup>3</sup> vtpedron@gmail*

Tanto el baclofen (BAC), agonista selectivo de los receptores GABA<sub>B</sub>, como la morfina (MOR), agonista selectivo de receptores opioides, producen un efecto analgésico dosis dependiente. Nuestros estudios previos evidenciaron una interacción entre los sistemas GABAérgico y opioide involucrado en el efecto analgésico del BAC. Por otro lado, se sabe que existen diferencias sexuales con respecto a diversas respuestas farmacológicas de la MOR. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la posible participación del sistema GABAérgico en el efecto antinociceptivo de la MOR en ratones de ambos sexos. Se utilizaron ratones Swiss Webster albino prepúberes, machos y hembras. Se determinaron los efectos antinociceptivos (%MIP: % de la máxima inhibición posible) de MOR (1, 3 y 9 mg/kg; sc), en animales pretratados con salina, con BAC (2 mg/kg, ip), y con el antagonista selectivo GABA<sub>B</sub> 2-OH-saclofen (SAC) (0.3 mg/kg, intracisternamagna). Los %MIP se obtuvieron utilizando dos modelos experimentales de nocicepción: a) placa caliente (PC) y b) inmersión de la cola (IC). Los resultados obtenidos mostraron que en los machos, el BAC potenció el efecto antinociceptivo de MOR en un 70% y 100% (p<0,01) en IC y en PC respectivamente. En las hembras, el BAC potenció el efecto antinociceptivo de MOR en un 24% en IC (p<0.05) y en un 38% en PC (p<0,01). Por otro lado, en machos, el SAC atenuó el efecto antinociceptivo de MOR en un 67% y 51% (p<0,01) en IC y PC respectivamente. En las hembras, el SAC atenuó el efecto antinociceptivo de MOR en un 48% y 49% (p<0,01) en IC y PC respectivamente. Estos resultados sugieren, que los receptores GABA<sub>B</sub> podrían tener una participación en la analgesia inducida por morfina tanto en machos como en hembras. El hecho de que la potenciación del efecto antinociceptivo de la MOR ejercida por el BAC, sea más marcada en machos que en hembras puede estar relacionada con las diferencias sexuales documentadas para la respuesta analgésica de la MOR.

## ONCOLOGIA 10

**648. (76) DIAGNOSIS AND FOLLOW UP OF NMSC WITH 99mTc-MIBI IN AN ANIMAL MODEL.**

*Salgueiro M.\*<sup>1</sup>; Tesán F.\*<sup>2</sup>; Palmieri M.\*<sup>3</sup>; Durán H.\*<sup>4</sup>; Medina V.\*<sup>5</sup>; Leonardi N.\*<sup>6</sup>; Goldman C.\*<sup>7</sup>; Boccio J.\*<sup>8</sup>; Zubillaga M.\*<sup>9</sup> Laboratorio de Radioisotopos Cátedra de Física Ffyt Uba<sup>1 5 7 9</sup>; Cátedra de Física Ffyt UBA<sup>2 8</sup>; FCEN UBA<sup>3</sup>; CONICET; UNSAM; CNEA<sup>4</sup>; Laboratorios Bacon SAIC<sup>6</sup>. jsalgueiro@ffyt.uba.ar*

INTRODUCTION: 99mTc-MIBI has been used as a tumor seeking tracer. Non Melanoma Skin Cancer (NMSC) is known to be resistant to apoptosis perhaps due to the over expression of bcl-2 that diminish the uptake of 99mTc-MIBI in tumors. Previous studies demonstrated that 99mTc-MIBI uptake may be useful for the diagnosis of NMSC in animal models taking into consideration the route of administration and the biodistribution time. OBJECTIVE: The aim of the work was to evaluate the usefulness of 99mTc-MIBI as a tracer for the tumor diagnosis and progression of NMSC in a chemically induced model in mice. STUDY DESIGN: Sencar mice were submitted to the complete carcinogenesis model. After 18 or 22 weeks of tumor induction, animals were divided in two groups (G1, n=20 and G2, n=18, respectively) and each animal was injected i.v. with 1 mCi of 99mTc-MIBI. After 30 minutes of biodistribution, animals were sacrificed and samples of tumor and healthy skin were dissected, weighed and measured in a solid scintillation counter. Results were expressed as percentage of injected activity per tissue mass (%Ai/g). Additionally, tumors and

healthy skin were prepared for histological analysis. RESULTS: Histological analysis demonstrated that G1 developed a 36% of papilomas and a 64% of carcinomas, while in G2 there were a 100% of carcinomas. 99mTc-MIBI uptake in G1 was  $0.53 \pm 0.29\% \text{Ai/g}$  for healthy skin,  $0.44 \pm 0.09\% \text{Ai/g}$  for papilomas and  $0.38 \pm 0.19\% \text{Ai/g}$  for carcinomas. Although these results do not differ statistically among them, it can be observed a tendency to have a low-grade uptake in the order previously mentioned. However in G2, with 22 weeks of tumor evolution, it can be observed a statistically difference in 99mTc-MIBI uptake between healthy skin ( $0.80 \pm 0.06\% \text{Ai/g}$ ) and squamous cell carcinoma ( $0.55 \pm 0.06\% \text{Ai/g}$ ). CONCLUSION: Results showed that, as tumor progresses, the uptake of 99mTc-MIBI is significantly diminished in relation with healthy skin, probably due to the alteration in the apoptotic program that characterizes the NMSC.

**649. (110) EFECTO FOTOTÉRMICO EN CULTIVO CELULAR Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD IN VITRO E IN VIVO DE NANOPARTÍCULAS DE POLIANILINA.**

Yslas E.<sup>1</sup>; Ibarra L.<sup>2</sup>; Molina M.<sup>3</sup>; Rivarola C.<sup>4</sup>; Barbero C.<sup>5</sup>; Bertuzzi M.<sup>6</sup>; Rivarola V.<sup>7</sup>

Dpto. Biología Molecular; Dpto. Química; Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>1</sup>; Dpto. Biología Molecular; Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>2,6</sup>; Dpto. Química; Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>3,4,5,7</sup>  
eyslas@exa.unrc.edu.ar

La terapia fototérmica (TFT) en combinación con la nanotecnología se basa en la aplicación localizada de nanomateriales y energía a longitud de onda entre 800-1100 nm para producir daño en las células tumorales, con nulo o escaso efecto en el tejido sano. Se logra una máxima penetración en el tejido tumoral en la cual los tejidos sanos son virtualmente transparentes. Objetivos: Síntesis de nanopartículas de polianilina (PANI). Evaluación de la toxicidad *in vitro* e *in vivo* y del efecto fototérmico en cultivo celular. *Materiales y Métodos*: Las nanopartículas de PANI son sintetizadas a través de polimerización y nucleación, utilizando como estabilizador polivinilpirrolidona (PVPD). Para el test de toxicidad se utilizaron larvas (*Rhinella arenarum*) en el estadio 25. Para estudiar el efecto fototérmico se utilizaron células LM2, las que fueron irradiadas con un laser NIR (780 nm, 100 mW). *Resultados*: Las nanopartículas sintetizadas presentan un tamaño de 200 nm. En los estudios *in vitro* a concentraciones  $\leq 1,04 \text{ mg/L}$  no se observaron cambios en la supervivencia y morfología celular comparados con los controles. Por otra parte se observó que la cinética de incorporación en la línea celular LM2 a diferentes concentraciones y tiempo de incubación alcanzó un plateau a las 3 hs. La células tratadas con nanopartículas de PANI y luz NIR mostraron un claro efecto fototérmico, desencadenándose muerte celular por apoptosis (Hó). Los estudios de toxicidad en larvas nos indican que a concentraciones  $\Delta 280 \text{ mg/L}$  no se observan daños letales. Además se observaron diferencias en cuanto a la coloración de la materia fecal de larvas incubadas con nanopartículas con respecto a larvas controles (alimento de peces), indicando su tránsito por el aparato digestivo. *Conclusión*: Las nanopartículas de PANI son un prometedor nanomaterial para su aplicación en TFT, debido a que no son tóxicas en condiciones de oscuridad y desencadenan muerte celular por apoptosis en condiciones de irradiación.

**650. (204) ALIMENTO ELABORADO A BASE DE HARINA DE AMARANTO DISMINUYE LA FORMACIÓN DE TUMORES DE COLON INDUCIDOS CON AZOXIMETANO EN RATONES CB1.**

Barrio D.<sup>1</sup>; Chiosso C.<sup>2</sup>; Añón M.<sup>3</sup>

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos Cidca; Cátedra de Química Biológica UNRN<sup>1</sup>; Centro de Biología y Toxicología Aplicada de Viedma, Río Negro<sup>2</sup>; Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos CIDCA<sup>3</sup>  
drbarrio@gmail.com

Los hábitos alimentarios tienen un papel preponderante en el desarrollo de ciertas enfermedades como el cáncer. Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo sugieren que las proteínas de amaranto poseen actividad antitumoral *in vitro*. Con el objetivo de estudiar el potencial efecto antitumoral *in vivo* de un alimento formulado a base de amaranto evaluamos su acción sobre un modelo de cáncer de colon. Se utilizaron 32 ratones de la cepa CB1 del Centro de Biología y Toxicología Aplicada de Viedma, Río Negro, de 2 meses de edad, con un peso promedio de 25 g. Los mismos fueron alojados en 16 jaulas en ambiente controlado y mantenidos con agua y dieta *ad-libitum*. El modelo experimental de cáncer de colon fue inducido mediante 1 inyección i.p. semanal de azoximetano (AZM) durante 4 semanas en dosis de 7,5 mg/kg. Los ratones fueron separados al azar en cuatro grupos (controles sin AZM y dieta control -grupo A- o dieta con amaranto -grupo B-) y (con AZM y dieta control -grupo C- o dieta con amaranto -grupo D-). Los animales se sacrificaron a los 6 meses. El colon extraído de los ratones se abrió longitudinalmente, se fijó con formol en PBS al 10 % y se coloreó con azul de metileno. Con una lupa binocular (40x) se determinó el número de focos con criptas aberrantes (FCA). Además, se realizaron cortes histológicos y se colorearon con H&E y por inmunohistoquímica con anti-beta catenina. En los grupos controles (A y B) no se detectaron FCA y los cortes histológicos no mostraron evidencia de tumores. Los ratones tratados con AZM desarrollaron FCA y tumores de origen glandular detectados por histología. El número promedio de FCA en los animales alimentados con amaranto (grupo D) fue significativamente menor que los alimentados con la dieta control (grupo C)  $5 \pm 1,4$  vs  $36 \pm 3,2$  ( $p < 0,05$ ). Los resultados muestran que la dieta a base de amaranto inhibe la formación de FCA, sugiriendo un potencial efecto protector de procesos malignos en la carcinogénesis de colon

**651. (657) PAPEL DE AKT1 EN LA MODULACIÓN DE LA VIABILIDAD, LA MIGRACIÓN Y LA ORGANIZACIÓN DEL CITOESQUELETO DE CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS MURINAS QUE REEXPRESAN GLIPICANO-3 (GPC3).**

Romero S.<sup>1</sup>; Lago Huvelle M.<sup>2</sup>; Peluffo G.<sup>3</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>4</sup>; Peters M.<sup>5</sup>

Instituto de Oncología Angel H. Roffo<sup>1,2,3,4,5</sup>  
silvina2002@hotmail.com

Previamente demostramos que la reexpresión de GPC3 en células del adenocarcinoma mamario murino LM3 induce una inhibición de la capacidad metastásica *in vivo*, asociada a una reversión parcial de la transición epitelio-mesenquimática. Establecimos también que las células LM3-GPC3 presentan una menor actividad de la vía Akt. Las quinasas Akt 1, 2 y 3 tienen un rol crítico en la regulación de la supervivencia, metabolismo y otras actividades celulares. Su papel en la migración y la metástasis es menos claro. El objetivo de este trabajo fue estudiar los roles de Akt 1 sobre la viabilidad y la migración de las células LM3. Empleamos 2 clones expresando GPC3 (LM3-GPC3) y 2 clones transfectados con el vector vacío (LM3-vector). Establecimos por WB que todos los clones expresan niveles similares de Akt total. Sin embargo, mientras que las células LM3-vector presentan una mayor proporción de Akt2 (Akt1/Akt2=0,75), la reexpresión de GPC3 induce la inversión de esta relación (Akt1/Akt2=1,45). Para discernir el rol de Akt1, una variante constitutivamente activa de dicha isoforma (Akt1 CA) fue introducida en células LM3-GPC3 mediante infección viral. Corroboramos que la reexpresión de GPC3 aumenta 40-60% la susceptibilidad a la muerte inducida por privación de suero (ANOVA Bonferroni  $p < 0,001$ ). Sin embargo, Akt1 CA no afecta la viabilidad de las células LM3-GPC3 (ANOVA, ns). Aunque no se detectaron cambios en el citoesqueleto de actina, establecimos mediante ensayos de cicatrización de heridas que las células LM3-GPC3 Akt1 CA muestran una reducción de su capacidad de migrar (Cobertura de la herida: LM3-GPC3 vector=46% vs LM3-GPC3 Akt1 CA=31,2%. ANOVA Bonferroni  $p < 0,001$ ). Estos resultados sugieren mecanismos isoforma-específicos para Akt. Akt1 estaría inhibiendo la migración de las células LM3-GPC3, mientras que

no tendría efectos sobre la viabilidad y el citoesqueleto. Paradójicamente, la hiperactivación del oncogen Akt1 estaría previniendo el comportamiento invasivo/metastásico.

**652. (227) GLIPICANO-3 (GPC3) MODULA LAS PROPIEDADES TUMORALES ADQUIRIDAS POR CÉLULAS MAMARIAS MURINAS MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA CANÓNICA DE WNT.**

Lago Huvelle M.<sup>1</sup>; Buchanan C.<sup>2</sup>; Romero S.<sup>3</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>4</sup>; Peters M.<sup>5</sup>  
*Instituto de Oncología Angel H. Roffo*<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 mariamparo86@gmail.com

La vía Wnt está involucrada en la regulación de la proliferación y la diferenciación. La alteración de esta vía fue identificada como un evento clave en el desarrollo neoplásico. Previamente demostramos que la reexpresión de GPC3 en células del adenocarcinoma mamario murino LM3 induce una inhibición de la vía Wnt canónica. Determinamos también que los clones que reexpresan GPC3 son menos metastásicos *in vivo*, y que esto se asocia a una reducción en su capacidad de migrar, a una disminución de las fibras de estrés de actina, a un aumento en la adhesión homotípica y a una mayor susceptibilidad a la senescencia y a la muerte *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue estudiar si los efectos de GPC3 sobre dichos parámetros celulares eran dependientes de su acción inhibitoria sobre la vía Wnt canónica. Como estrategia, dos clones LM3-GPC3 y dos clones LM3-vector fueron tratados con LiCl (activador de la vía Wnt canónica) o con NaCl como control. Determinamos que el tratamiento con LiCl fue capaz de revertir parcialmente la senescencia de las células LM3-GPC3 (células senescentes X-Gal positivas: LM3-GPC3 +NaCl=85% vs +LiCl=65%. ANOVA Scheffé  $p<0,05$ ). En contraste, no se observaron cambios sobre la susceptibilidad a la muerte celular (ANOVA, ns). Aunque no se detectaron efectos sobre la organización del citoesqueleto de actina establecimos, mediante ensayos de cicatrización de heridas, que las células LM3-GPC3 tratadas con LiCl recuperan su capacidad de migrar (cobertura de herida: LM3-GPC3 +NaCl=15% vs +LiCl=75%. ANOVA Scheffé  $p<0,05$ ). Resultó interesante observar que LiCl redujo alrededor de 2 veces la adhesión homotípica de las células LM3-GPC3 (ANOVA Scheffé  $p<0,05$ ). Estos resultados sugieren que la inhibición de la vía Wnt canónica inducida por GPC3 mediaría los efectos de este glipicano sobre la senescencia, la migración y la agregación celular, mientras que la supervivencia y la organización del citoesqueleto de actina serían moduladas a través de otras vías.

**653. (334) INHIBICIÓN INTERFERÓN- $\alpha$ 2B (IFN) DEPENDIENTE DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA/TCF: PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS) Y DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN FOXO3A.**

Parody J.<sup>1</sup>; Alvarez M.<sup>2</sup>; Ceballos M.<sup>3</sup>; Frances D.<sup>4</sup>; Carnovale C.<sup>5</sup>; Carrillo M.<sup>6</sup>  
*Instituto de Fisiología Experimental*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 parody@ifise-conicet.gov.ar

Previamente demostramos la activación *in vivo* de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina/TCF en un modelo de preneoplasia hepática en rata. Además, informamos que el tratamiento con IFN produce: 1) reducción del número y volumen de focos preneoplásicos por un proceso apoptótico mediado por ROS y 2) atenuación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina/TCF. Decidimos estudiar la participación del factor de transcripción Foxo3a en la modulación de la vía en estudio y su relación con ROS. Los grupos experimentales fueron: C, control; C+IFN, control con tratamiento de IFN; IP, animales con preneoplasia hepática; IP+IFN, animales IP con tratamiento de IFN e IP+IFN+A, animales IP+IFN que recibieron ácido ascórbico (ASC) durante el tratamiento. Los niveles de peroxidación lipídica y estrés oxidativo medidos por TBARS aumentaron sólo en el grupo IP+IFN (+32%). La liberación de citocromo c al citosol fue más elevada en el grupo IP+IFN (+450%). Por inmunoblotting encontramos aumento de Foxo3a en fracción nuclear en el grupo IP+IFN (+460%). Mediante estudios de coimmunoprecipitación demostramos asociación de  $\beta$ -catenina/TCF en IP y de  $\beta$ -catenina/Foxo3a

en IP+IFN. Por inmunoprecipitación de cromatina encontramos activación transcripcional de TCF en IP y de Foxo3a en IP+IFN. Finalmente, por inmunoblotting observamos sobreexpresión del receptor Frizzled-7 (blanco de  $\beta$ -catenina/TCF) en el grupo IP. Estos valores se restauraron parcialmente con el tratamiento con IFN y se mantuvieron elevados cuando se co-administró ASC (IP:+470%; IP+IFN:+230%; IP+IFN+A:+530%). (\* $p<0,05$  vs. C). Los datos sugieren que ROS generadas a partir del tratamiento *in vivo* con IFN, estimulan la localización nuclear de Foxo3a y su actividad transcripcional. La presencia de ROS favorecería la unión de  $\beta$ -catenina a Foxo3a en lugar de a TCF, atenuando así la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina/TCF y transcribiendo genes blanco de Foxo3a que participan en el proceso apoptótico.

**654. (482) CARACTERÍSTICAS CELULARES DE LOS TUMORES PRIMARIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA Y RESPUESTA A LA TERAPIA**

Rico M.<sup>1</sup>; Rozados V.<sup>2</sup>; Alasino C.<sup>3</sup>; Roggero E.<sup>4</sup>; Scharovsky O.<sup>5</sup>  
*Instituto de Genética Experimental, Fc.cs Médicas UNR*<sup>1 2</sup>  
<sup>4 5</sup>; *Instituto de Oncología*<sup>3</sup>; *C.I.U.N.R. Rosario*<sup>4 5</sup>  
 majorico@gmail.com

El cáncer de mama es una de las neoplasias más comunes entre las mujeres, representando 1 de cada 3 cánceres diagnosticados. Las células T reguladoras (Tregs) son células CD4<sup>+</sup> que inhiben la respuesta inmune *in vivo*. La angiogénesis tiene un rol importante en la progresión del cáncer de mama, proveyendo nutrientes para el crecimiento y la proliferación de la célula tumoral. Se ha observado que distintas características de los tumores, como el grado de infiltrado inflamatorio, el número de células Tregs y la densidad de vasos sanguíneos podrían ser útiles para anticipar la respuesta a la terapia. El objetivo de este trabajo fue analizar distintas características celulares de los tumores primarios de pacientes con cáncer de mama y relacionarlas con la respuesta al tratamiento terapéutico. Se analizaron muestras de archivo de tumores de mama ductal estadio I y II (n=11). Se determinó por inmunohistoquímica con Ac. monoclonales la presencia de Foxp3 y CD34, marcadores de Tregs y células endoteliales, respectivamente. También se realizó una tinción con hematoxilina-eosina para evaluar semicuantitativamente (0 a 3+). Los infiltrados linfocitarios, peri (A) e intratumorales (B). En todos los preparados analizados se observaron infiltrados linfocitarios de distinto grado, predominando los de 2+ (n=7) y 3+ (n=3), y la única paciente en progresión presentó 1+(A) y 0(B). La presencia de células Foxp3+ en (A) y (B) (confirmadas por microscopía confocal) fue variable, desde 0 hasta ++++. La marcación de células CD34 fue positiva en todos los casos, pero variable en densidad. De las 11 pacientes, 9 se encuentran libres de enfermedad y 2 recaídas, 1 en tratamiento con respuesta parcial y 1 fallecida por progresión luego de una línea de tratamiento por su cáncer avanzado. Podemos concluir que el menor infiltrado tumoral se correspondió con progresión de la enfermedad, mientras que no se encontró relación entre el grado de positividad para Foxp3 y CD34 y la respuesta al tratamiento.

**655. (512) EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE GOLPE DE CALOR HSP27 Y HSP70 EN BIOPSIAS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA TRATADAS CON MONOQUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE CON ANTRACLINAS.**

Nadin S.<sup>1</sup>; Montt M.<sup>2</sup>; Daguerre P.<sup>3</sup>; Leuzzi M.<sup>4</sup>; Gago F.<sup>5</sup>; Ibarra J.<sup>6</sup>; Lazzaro M.<sup>7</sup>; Ciocca D.<sup>8</sup>; Vargas Roig L.<sup>9</sup>  
*Laboratorio de Biología Tumoral, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, CCT Mendoza-CONICET*<sup>1 2</sup>  
<sup>7 9</sup>; *Hospital Lagomaggiore Mendoza*<sup>3 4 6</sup>; *Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo*<sup>5</sup>; *Laboratorio de Oncología, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, CCT Mendoza-CONICET*<sup>8</sup>  
 snadin@lab.cricyt.edu.ar

*Introducción:* Las proteínas de golpe de calor (Hsps) se pueden expresar en tumores humanos siendo útiles en algunos casos como marcadores pronóstico. Existe evidencia *in vitro* de que

algunas Hsps pueden estar involucradas en la resistencia a doxorubicina (DOXO). Objetivo: Determinar si la expresión de Hsp27 y Hsp70 es un marcador predictivo/pronóstico en pacientes con cáncer de mama tratadas con monoquimioterapia neoadyuvante con DOXO o su derivado epirubicina (EPI). Pacientes y métodos: Ingresaron 60 pacientes con tumores de mama localmente avanzados que recibieron 75 mg/m<sup>2</sup> de DOXO o 120 mg/m<sup>2</sup> de EPI durante 4 ciclos antes de la cirugía. Post-cirugía recibieron 6 ciclos de ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo. La respuesta clínica fue considerada: completa (desaparición de signos clínicos), parcial (disminución del tumor mayor 50%), estable (disminución del tumor <50%), progresión tumoral (aumento ≥25% del tamaño tumoral). La respuesta patológica fue considerada completa (ausencia de cáncer invasor), enfermedad microscópica residual (<1 mm de carcinoma invasor) y enfermedad macroscópica residual (≥1 mm de carcinoma invasor). La media de evolución de las pacientes fue de 60 meses (14 a 142 meses). La expresión de Hsp27 y Hsp70 se evaluó por inmunohistoquímica antes y después de la administración de DOXO o EPI (biopsia diagnóstica y pieza quirúrgica). Resultados: La expresión nuclear de Hsp27 y Hsp70 en las células invasoras aumentó luego de la administración de DOXO o EPI (p<0,05). No existió correlación entre la expresión nuclear y/o citoplásmica de las Hsps con la respuesta clínica ni la respuesta patológica. La expresión de las Hsps no correlacionó con la sobrevida libre de enfermedad ni la sobrevida global de las pacientes. Conclusión: La expresión de Hsp27 y Hsp70: a) no es útil para predecir respuesta a DOXO o EPI y b) no es un marcador pronóstico en pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas.

**656. (766) LA INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE GOLPE DE CALOR DISMINUYE EL ESTRÉS OXIDATIVO PRODUCIDO POR DOXORRUBICINA EN CÉLULAS MDA-MB-231.**

Montt Guevara M.<sup>1</sup>; Vargas Roig L.<sup>2</sup>  
IMBECU-CCT-Mendoza<sup>1 2</sup>  
mmmontt@mendoza-conicet.gov.ar

**Introducción:** Las proteínas de golpe de calor (Hsps) aumentan la resistencia celular a distintos tipos de estrés como el oxidativo. Existe evidencia de que Hsp27 y Hsp70 participan en la resistencia a drogas antineoplásicas como doxorubicina (DOXO). Uno de los mecanismos de acción de DOXO es la formación de radicales libres, especialmente anión superóxido. La hipótesis del presente trabajo es que un mecanismo de resistencia a DOXO en células tumorales humanas de mama es la disminución del estrés oxidativo producido por Hsps. **Materiales y Métodos:** Se utilizó la línea celular de adenocarcinoma MDA-MB-231. En el grupo experimental se indujo la expresión de Hsps mediante un golpe de calor de 30 minutos a 43°C. Para evaluar la inducción de las Hsp27, Hsp70 y Hsp90 se realizó western blot. Cuatro horas después del golpe de calor se incubaron las células con distintas concentraciones de DOXO durante 24 hs. Las células se cosecharon para realizar ensayos de viabilidad (con azul tripán y MTT) y medición de especies reactivas de oxígeno (EROs) mediante fluorometría utilizando la sonda dehidroetidina (DhE). **Resultados:** Luego del golpe de calor, la expresión de Hsp27 aumentó 72 veces, la de Hsp70 aumentó 22 veces y la de Hsp90 aumentó 2 veces. La formación de EROs producida por 0,5 uM de DOXO disminuyó cuando las células fueron sometidas 4 horas antes al golpe de calor (p<0,05), no se observaron cambios estadísticamente significativos en la viabilidad celular al incubarse con DOXO con o sin golpe de calor. **Conclusión:** La inducción de Hsps disminuyó la formación de EROs producidas por DOXO pero no es un mecanismo de resistencia a la administración de la droga en nuestro modelo experimental.

**657. (818) EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE C-FOS EN PROGRESIÓN TUMORAL DE GLÁNDULA MAMARIA DE RATAS DIABÉTICAS**

Gutiérrez Stok A.<sup>1</sup>; Sambuco L.<sup>2</sup>; Croci M.<sup>3</sup>; Cricco G.<sup>4</sup>; Rivera E.<sup>5</sup>; Bergoc R.<sup>6</sup>; Martín G.<sup>7</sup>; Randi A.<sup>8</sup>

Laboratorio de Radioisótopos Fac. de Farmacia y Bioquímica<sup>1 2 3 4 5 7</sup>; Fund. Barceló, IUCS<sup>6</sup>; Dpto de Bioquímica Fac de Medicina UBA<sup>8</sup>  
aligut\_biomu@yahoo.com.ar

c-Fos es un oncogen que forma el complejo AP-1 implicado en proliferación y transformación celular. También se expresa en citoplasma, pero la razón de la diferente localización celular no está clara aún. Hemos desarrollado un Modelo Experimental de Cáncer Mamario y Diabetes en rata, induciendo el desarrollo de tumores malignos con 3 inyecciones ip de NMU (50 mg/kg), y Diabetes con una inyección ip de estreptozotocina (90 mg/kg) al 2° día de vida. Los animales con Diabetes y Cáncer de mama desarrollan tumores más diferenciados, con mayor período de latencia y menor velocidad de crecimiento, que los no diabéticos. **Objetivo:** Estudiar la expresión y localización de la proteína Fos en relación a marcadores de proliferación (PCNA, ciclina D1) y diferenciación (PPAR $\gamma$ ), en tejido mamario de los grupos: 1) controles, 2) controles-NMU, 3) diabéticas y 4) diabéticas-NMU; así como en tumores desarrollados en 5) NMU y 6) diabéticas-NMU. Las mamas fueron procesadas a los 60, 90, 120, 150 y 180 días, y éstas y los tumores analizados por IHQ y WB. **Resultados:** La expresión citoplásmica (C) de Fos predomina sobre la nuclear (N), C:80-100%, N:5-15%, p<0,05, en los Grupos 1 y 2 antes y en los 3 y 4 a partir de 120 días. En el Grupo 2 la expresión citoplásmica baja a partir de 120 días, C:40-60%. En tumores del grupo 5 la expresión nuclear predomina sobre la citoplásmica C:10-20%, N:50-70%, p<0,05 pero en el Grupo 6 C:50-60%, N:10-20%, p<0,05. La expresión de PCNA y ciclina D1, tanto en glándula mamaria de los distintos grupos como en tumores de ambos lotes es similar a la nuclear de Fos. La expresión de PPAR $\gamma$  es alta (70-90%) en mamas de todos los grupos, hasta los 150 días, produciéndose una disminución en grupos 2 y 4 a ese tiempo. En tumores del grupo 5 no se detectó expresión y fue muy baja (10%) en los del grupo 6. **Conclusión:** Se sugiere una posible relación entre la localización de la proteína Fos y el grado de diferenciación del tejido mamario en relación a la proliferación y malignidad

**658. (821) EFECTO DEL ACIDO HIALURÓNICO SOBRE UN MODELO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE LINFOCITOS B MADUROS.**

Modenutti C.<sup>1</sup>; Mascaro M.<sup>2</sup>; Ernst G.<sup>3</sup>; Lombardía S.<sup>4</sup>; Simovich T.<sup>5</sup>; Cordo Russo R.<sup>6</sup>; Alvarez E.<sup>7</sup>; Hajos S.<sup>8</sup>  
Laboratorio de Inmunología Tumoral, Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica. IDEHU, UBA-CONICET.<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
cpmode@gmail.com

El Acido Hialurónico (AH) es un componente ubicuo de la matriz extracelular. Interactúa con varios receptores de la superficie celular, entre ellos CD44, uno de los principales implicados en procesos neoplásicos, siendo capaz de modular la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular. Las células leucémicas de una proporción significativa de casos de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) pueden expresar mayor o menor proporción de CD44 en comparación con las células B progenitoras normales. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del AH sobre la proliferación celular en un modelo LLA de Células B Maduras (CBM) y si el mismo se encuentra mediado por CD44. Para ello se empleó la línea celular Karpas 231 (K231). Se determinó el índice de proliferación por incorporación de <sup>3</sup>H-T a 24, 48 y 72 hs en presencia de AH (100-400mg/ml), PMA (10-2,5mg/ml) y sus combinaciones. Los resultados indican que el tratamiento con 200mg/ml AH por 48hs indujo un incremento del 55 ±12% (p<0,05) y que el PMA en las dosis evaluadas ocasionó una disminución del 20 ±5% (p<0,01) de la proliferación. La combinación de ambos compuestos no tuvo efecto distinto al tratamiento con AH 200mg/ml. El análisis de expresión por RT-PCR arrojó diferencias significativas entre el índice de expresión basal y los tratamientos de AH 200mg/ml y PMA10mg/ml (1, 0,33 y 1,45 respectivamente)



( $p \leq 0.001$ ). Además, se evidenció la expresión de CD44 por Western Blot en extractos proteicos totales. Por Citometría de Flujo se demostró que su localización en superficie es escasa ( $2,8 \pm 0.2\%$ ), que el tratamiento con AH 200mg/ml ocasiona una disminución en su expresión del 31% y que el PMA 10mg/ml origina un incremento del 17% del CD44 presente en superficie ( $p \leq 0.05$ ). Estos resultados podrían estar indicando que el AH 200mg/ml promueve un incremento significativo en la proliferación por un mecanismo independiente de CD44.

### GASTROENTEROLOGÍA 3

#### 659. (34) PROBIOTICO BIOFLORA EN LA PREVENCIÓN DE LA PERITONITIS AGUDA EXPERIMENTAL, EN RATAS.

Laudanno O.<sup>1</sup>; Cesolari J.<sup>2</sup>; Rocaspana A.<sup>3</sup>; Godoy A.<sup>4</sup>; Sambrano S.<sup>5</sup>; Bedini O.<sup>6</sup>; San Miguel P.<sup>7</sup>

Gastroenterología Experimental Hospital Centenario Facultad de Ciencias Médicas UNR<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
laudanno@hotmail.com

Estudiar el efecto antiinflamatorio del probiótico Bioflora (Bio) en peritonitis aguda inducida por Carragenina (Ca). Grupos aleatorios de ratas hembras Wistar (n=7 c/grupo), 200g, en ayunas 24 hs agua ad libitum, se realizaron: I. Fisiol. 1.5 ml. OG, se espero 3 y 24 hs. II. Ca 1,5ml 1% IP (Testigo). III. Bio. 2ml OG (1,6 x 10,6 bacterias vivas) 60 min; Ca 24 hs. Todas las ratas fueron sacrificadas con sobredosis de éter, a las 3 y 24 hs. en c/grupo, se realizo toracolaparotomía, punción cardíaca y sangre para Neutrofilos (N) y Monocitos (M), se midió el exudado peritoneal y se obtuvo biopsias de peritoneo para MPO (cuantificación de N), se calculo la t Student y el ANOVA. En sangre se halló: I. Fisiol. 3 hs.: N  $850 \pm 130$ , M.  $180 \pm 70$ . II. Ca. 3 hs. N  $3160 \pm 710$ , M.  $1150 \pm 230$ . Ca 24 hs. N.  $2160 \pm 210$ , M.  $480 \pm 75$ . III. BioCa 3 hs: N  $2560 \pm 310$  ( $p < 0.01$ ), M.  $2240 \pm 180$  ( $< 0.01$ ), 24 hs.: N  $1650 \pm 115$  ( $< 0.01$ ), M.  $990 \pm 250$  ( $< 0.01$ ). Exudado P: I. 0ml. II. 3 hs 1.5 - 2 ml. N.  $25000 \pm 1200$ . M.  $16.000 \pm 900$  ( $< 0.01$ ). III. 3 hs. 0.1 - 0.5 ml. N.  $11.000 \pm 700$  ( $< 0.01$ ). M.  $16.000 \pm 850$  ( $< 0.01$ ). MPO (U/100 g. proteína): I. 3 hs  $45 \pm 6$ ; 24 hs:  $33 \pm 4$ . II 3 hs:  $470 \pm 25, 24$  hs:  $380 \pm 35$  III. 3 hs:  $140 \pm 20$  ( $< 0.01$ ) y 24 hs:  $85 \pm 8$  ( $< 0.01$ ). Conclusiones: El Probiótico Bioflora mostro efecto antiinflamatorio en Peritonitis Aguda inducida por Carragenina, con disminución de Neutrofilos y aumento de Monocitos, tanto en la sangre como en el exudado peritoneal y en el infiltrado de neutrofilos en el peritoneo.

#### 660. (83) LA BILIRRUBINA NO CONJUGADA (BNC) PREVIENE LA INJURIA OXIDATIVA HEPATOCELULAR.

Basiglio C.<sup>1</sup>; Toledo F.<sup>2</sup>; Sánchez Pozzi E.<sup>3</sup>; Mottino A.<sup>4</sup>; Roma M.<sup>5</sup>

Instituto de Fisiología Experimental Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR<sup>1 2 3 4 5</sup>  
basiglio@ifise-conicet.gov.ar

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que el estrés oxidativo (EO) provoca colestasis por internalización endocítica de transportadores canaliculares de sales biliares (Bsep) y glutatión (Mrp2), responsables de la formación de bilis; este hecho estaría involucrado en la patogénesis y progresión de hepatopatías colestásicas. La bilirrubina es un potencial antioxidante endógeno cuyos niveles plasmáticos aumentan en hepatopatías, pero su papel citoprotector en estas condiciones es incierto. En este trabajo se evaluó la capacidad de BNC para limitar la injuria oxidativa hepatocelular y las alteraciones de localización y función de transportadores canaliculares asociada a la misma, usando el *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH) como pro-oxidante modelo. Hepatocitos aislados de rata se pre-trataron con BNC a concentraciones fisiológicas (1,7-17,1  $\mu$ M) y luego con *t*-BOOH (500  $\mu$ M). BNC previno en aprox. un 40% ( $p < 0,05$ ; n=4) la lipoperoxidación de membranas inducida por *t*-BOOH, evaluada por la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). *t*-BOOH (25-125  $\mu$ M) disminuyó progresivamente la capacidad de duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) para secretar

apicalmente los sustratos de Bsep y Mrp2, colil-lisil-fluoresceína y glutatión-metil-fluoresceína (generado intracelularmente a partir de diacetato de cloro-metil-fluoresceína), respectivamente. BNC (17,1  $\mu$ M) previno esta falla secretora en aprox. un 70% ( $p < 0,05$ ; n=4), independientemente del sustrato analizado. Técnicas de inmunomarcado seguido de microscopía confocal revelaron que *t*-BOOH (125  $\mu$ M) indujo marcada internalización de Bsep y Mrp2, y que el pretratamiento con BNC (17,1  $\mu$ M) previno significativamente estas alteraciones. Concluimos que la bilirrubina contrarresta la internalización endocítica y la subsecuente falla funcional de transportadores canaliculares relevantes para la secreción biliar. Esto sugiere un rol citoprotector funcional del pigmento en hepatopatías con EO asociado.

#### 661. (86) LA ENFERMEDAD GRASA DEL HIGADO SE ASOCIA CON UNA SOBREEXPRESIÓN HEPÁTICA DEL RXRA INDEPENDIENTEMENTE DE LA INSULINO RESISTENCIA.

Rosselli M.<sup>1</sup>; Burgueño A.<sup>2</sup>; Gonzales Mansilla N.<sup>3</sup>; Pirola C.<sup>4</sup>; Sookoian S.<sup>5</sup>

Laboratorio de Hepatología Clínica y Molecular Instituto de Investigaciones Médicas IDIM CONICET<sup>1 5</sup>; Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas Instituto de Investigaciones Médicas IDIM CONICET<sup>2 3 4</sup>.  
solero@s@yahoo.com.ar

Varios mecanismos fisiopatológicos se han asociado con la enfermedad grasa del hígado de etiología no alcohólica (NAFLD), pero un desequilibrio en la regulación de los receptores nucleares (RN) solo es conocido para los PPARs. Formando heterodímeros con otros RN, el receptor de retinoides X alfa (RXRA) regula varias rutas metabólicas (glucosa, ácidos grasos y colesterol). Además, es sabido que la insulino resistencia (IR) juega un papel central en el desarrollo y progresión de la NAFLD, postulándose que es la responsable de la mayoría de los eventos moleculares que ocurren en la NAFLD. Para contrastar la hipótesis de que la NAFLD se asocia con un desequilibrio en la expresión hepática de los RN independientemente de la IR, utilizamos la cepa SHR (spontaneously hypertensive rat), la cual desarrolla IR (mediada por CD36), y los respectivos controles normotensos-sin IR (Wistar-Kyoto, WKY); 14 machos de ambas cepas (7 SHR/ 7 WKY) fueron sometidos a dieta grasa la cual indujo exitosamente NAFLD, y otros 13 fueron alimentados con dieta estándar. Se evaluó la expresión hepática (medición del mRNA mediante PCR en tiempo real con mRNA TBP como referencia) de: RXRA, PPARa, PPARg, HNF4a, NR1D1 (Rev-erb-a), SREBF1c y C/EBP-beta. Resultados: el índice de IR (HOMA) fue significativamente mayor en la cepa SHR independientemente de la dieta. La NAFLD se asocio con un aumento significativo de la expresión hepática del RXRA (RXRA/TBP:  $11.71 \pm 1.11$  vs  $6.48 \pm 1.15$ ,  $p = 0.008$ ), independientemente de la cepa en estudio y del HOMA (ANCOVA). La expresión del RXRA-mRNA correlacionó significativamente con PPARa (Spearman R=0.60,  $p = 0.0008$ ) y C/EBP-beta (R=0.58,  $p = 0.001$ ). En resumen, el RXRA parecería jugar un papel importante en el desarrollo de la esteatosis hepática mediante su interacción con otros RN, independientemente de la presencia de IR y representa un potencial blanco de intervención farmacológica.

#### 662. (89) EVALUACIÓN DE LA RELACIÓN UDCA / LCA EN LA COLESTASIS INTRAHEPÁTICA DEL EMBARAZO.

Contín M.<sup>1</sup>; Martinefski M.<sup>2</sup>; Di Carlo M.<sup>3</sup>; Lucangioli S.<sup>4</sup>; Tripodi V.<sup>5</sup>

Cátedra de Química Analítica Facultad De Farmacia Y Bioquímica UBA<sup>1 2</sup>; Cátedra de Análisis Clínicos II, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>3</sup>; Cátedra de Control de Calidad de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA; CONICET<sup>4</sup>; Cátedra de Química Analítica Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA; CONICET<sup>5</sup>  
mariodc260@hotmail.com

La colestasis intrahepática del embarazo (CIE) es una patología hepática que se presenta en el segundo o tercer trimestre del embarazo y desaparece espontáneamente luego del parto. La

CIE se caracteriza por la presencia de prurito generalizado y funcionalidad hepática alterada y está asociada a un incremento del distress fetal, partos prematuros y morbi-mortalidad perinatal. Por lo tanto, un diagnóstico precoz y diferencial resulta imprescindible. Usualmente el diagnóstico de CIE esta basado en la presencia de prurito con elevación de transaminasas y ácidos biliares séricos totales aunque tanto el prurito como ambas determinaciones de laboratorio pueden estar también alteradas en otras condiciones patológicas o normales del embarazo. Es por ello que resulta indispensable determinar marcadores bioquímicos que resulten adecuados para realizar un diagnóstico de certeza de la CIE. En trabajos anteriores hemos demostrado cómo la determinación del perfil de los 15 ácidos biliares séricos más importantes resulta más útil que su valoración total para la evaluación de la CIE. El objetivo de este trabajo consiste en establecer si la determinación de la relación de los dos ácidos biliares más importantes (ursodesoxicólico, UDCA y litocólico, LCA) resultan aún más precisos para la evaluar la CIE. Utilizando la metodología desarrollada previamente por nuestro grupo de trabajo, se evaluó la relación UDCA/LCA en mujeres embarazadas controles, embarazadas con hipercolanemia del embarazo, pacientes con CIE incipientes sin tratamiento, pacientes con CIE severa antes y después del tratamiento. Concluimos que la relación UDCA/LCA discrimina de manera indudable cada uno de los grupos estudiados convirtiéndose en una determinación importante para diferenciar la CIE de otras condiciones y evaluar su severidad y su evolución post tratamiento.

**663. (91) INFLUENCIA DE LAS HORMONAS SEXUALES EN EL EFECTO DEL CADMIO (CD) SOBRE LA ABSORCIÓN DE CALCIO (CA) EN INTESTINO DELGADO DE LA RATA.**

Orihuela D.<sup>1</sup>;

Laboratorio de Investigaciones Fisiológicas Experimentales, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral<sup>1</sup>

danorihuela@yahoo.com.ar

Para investigar si 17 $\alpha$ -estradiol (E2) y testosterona (T) influyen el efecto inhibitorio de Cd sobre los mecanismos de transporte intestinal de Ca, grupos de ratas Wistar adultas de ambos sexos fueron castradas y tratadas del siguiente modo: Hembras (H): 0, 25, 50, 100 y 200 ug/kg/día valerianato de E2, s.c. Machos (M): 0, 0.5, 1, 2, y 4 mg/kg/día enantato de T, s.c. Al cabo de 15 días se midieron *in vitro* en presencia de 0.01 M de Cl<sub>2</sub>Cd, los flujos de Ca mucoso-seroso (JCams) en segmentos intestinales evertidos y parámetros cinéticos de captación de Ca (CaUPTmax y Km) en enterocitos aislados, usando 45-Ca como marcador de flujo. Los niveles séricos de E2 en H y T en M se cuantificaron por radioinmunoensayo. Resultados: en H, el JCams en ausencia de Cd correlacionó positivamente con nivel sérico de E2 (r=0.526, P<0.05), mientras que en presencia de Cd esta correlación fue inversa (r=-0.652, P<0.05). En M, el JCams no mostró correlación con los niveles séricos de T, tanto en presencia (r=0.125, P>0.05) como en ausencia (r=0.147, P>0.05) de Cd. En ambos sexos, el Cd redujo significativamente la CaUPTmax en enterocitos aislados en ratas castradas sin tratamiento hormonal respecto de los controles sin Cd: M: 5.68 $\pm$ 0.54 vs. 4.03 $\pm$ 0.26 nmol Ca/mg proteínas (P<0.05). H: 6.37 $\pm$ 0.72 vs. 4.65 $\pm$ 0.35 nmol Ca/mg proteínas (P<0.05). La administración de 200 ug/kg/día E2 a H ovariectomizadas produjo además una reducción significativa del Km en presencia de Cd (0.94 $\pm$ 0.21 vs. 0.67 $\pm$ 0.08 mM, P<0.05). Conclusión: el efecto inhibitorio del Cd sobre el transporte intestinal de Ca presentaría diferencias de género en la rata, siendo más marcado en H, y estaría relacionado con los niveles circulantes de E2. En M, tal efecto sería independiente de los niveles de T.

**664. (109) ESTUDIO DE LA EXPRESION DE AQUOPORINA 8 (AQP8) Y SU RELACIÓN CON EL CONTENIDO DE AGUA EN SUSPENSIONES DE HEPATOCITOS DE RATA (H) SOMETIDOS A PRESERVACION Y POSTERIOR REOXIGENACION**

Miszczuk G.<sup>1</sup>; Mediavilla M.<sup>2</sup>; Pizarro M.<sup>3</sup>; Rodríguez J.<sup>4</sup>; Bellarosa C.<sup>5</sup>; Tiribelli C.<sup>6</sup>; Mamprin M.<sup>7</sup>

Centro Binacional de Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC)<sup>2 3 4 7</sup>; Centro Studi Fegato, University of Trieste, Italy<sup>5 6</sup>; Farmacología Facultad de Ciencias Bioq y Farm. UNR<sup>7</sup> giselmis@hotmail.com

La solución BGS (Bes-Gluconato-Sucrosa, Osm= 366 $\pm$ 16) desarrollada por nuestro grupo de trabajo permite mantener viables y funcionales H, para ser utilizados en hígado bioartificial o trasplante celular. El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos que el almacenamiento a 0°C en solución BGS y UW (Osm= 375 $\pm$ 11) puede causar en el contenido de agua de H y su posible relación con el transportador de agua AQP8. Los H se preservaron por 72h a 0°C, N<sub>2</sub> en UW y BGS. Luego se reoxigenaron a 37°C, 95%CO<sub>2</sub>/5%O<sub>2</sub>, en sol Krebs Henseleit 120 min. En ambos casos se analizó la Lib de LDH(%), el contenido de agua, los niveles del mRNA (RT-PCR) y la localización (inmunocitoquímica de fluorescencia) de AQP8. El contenido de agua (como estimación del volumen celular) se determinó secando las muestras a 90 °C, la evolución del mismo fue expresada como V/Vc, siendo V el contenido de agua en las diferentes condiciones experimentales y Vc el contenido de agua de los H controles (recién aislados) a 37°C. Luego de 72h no se observaron cambios significativos en la lib de LDH (UW 2,46 $\pm$ 0,06 vs BGS 2,28 $\pm$ 0,2, n=5), en los niveles de mRNA para AQP8 ni en su distribución que permanezca intracelular. En cambio se encontró una disminución en el contenido de agua (UW: 0,62 $\pm$ 0,25; BGS: 0,76 $\pm$ 0,26 vs control: 1,00, n=7) p<0,05. Durante la reoxigenación los H mostraron contenidos de agua similares a los controles (Control: 0,92 $\pm$ 0,13; UW: 1,21 $\pm$ 0,28, BGS: 1,06 $\pm$ 0,22, n=7). Los niveles de mRNA para AQP8 no arrojaron cambios significativos ni tampoco se observó exposición de AQP8 en membrana citoplasmática. Concluimos que durante la preservación de H tanto en UW como en BGS se produce una disminución en el contenido de agua total que no se correlaciona con cambios en la expresión o localización subcelular de AQP8; por lo que dicho fenómeno podría deberse a alta osmolaridad de la solución de preservación. Durante la reoxigenación los H recuperan el contenido de agua con valores similares a los controles.

**665. (135) EFECTO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO EN EL CONTAJE NEURONAL EN YEYUNO Y COLON DE RATAS INYECTADAS CON ALOXANO.**

Novelli F.<sup>1</sup>; Feltrer A.<sup>2</sup>; Hisano N.<sup>3</sup>;

Cátedra de Histología y Embriología, FCM, UNR<sup>1 2 3</sup> franconovelli1@hotmail.com

El ácido ascórbico (AA) (es una vitamina antioxidante que tiene un efecto protector de la acción de los radicales libres). En esta comunicación se estudió los efectos del mismo en ratas inyectadas con aloxano en el posdeste sobre el contaje neuronal del yeyuno y colon. Ratas macho "m" de 23 días de edad fueron inyectadas con 1.- aloxano (A) (24mg/100gPC) (n=4), 2.- grupo control (C) fue inyectado con agua destilada (1cc/100gPC) (n=4), 3.- ratas inyectadas con aloxano que recibieron como bebida agua corriente ad-libitum más ácido ascórbico (2g/L) (A+AA) (n=4). A los 7 días fueron sacrificadas con sobredosis de éter, el intestino delgado y colon fueron disecados. Un segmento de yeyuno, colon proximal y distal fueron fijados en paraformaldehído 4 % en PBS y procesados con la técnica de NADPH, los preparados fueron fotografiados (30 campos con un aumento de 10x) con una cámara digital y las neuronas fueron contadas con un procesador de imágenes. El contaje neuronal fue expresado como neuronas/mm<sup>2</sup>. Los resultados fueron: Peso corporal: (A) 47.50  $\pm$  1.65g. (p>0.05), (C) 104.25  $\pm$  1.65g., (A+AA) 95.20  $\pm$  1.77g.; Glicemia: (A) 279.5  $\pm$  25.28mg/dl, (C) 101  $\pm$  2.48 mg/dl (p<0.05), (A+AA) 330.25  $\pm$  58.47 mg/dl; Recuento neuronal yeyuno: (A) 44.26  $\pm$  1.07 neuronas/mm<sup>2</sup> (p<0.05), (C) 51.81 $\pm$ 1.20 neuronas/mm<sup>2</sup>, (A+AA) 53.61  $\pm$  2.05 neuronas/mm<sup>2</sup>, Recuento neuronal colon proximal: (A) 31.52  $\pm$  4.34 neuronas/mm<sup>2</sup>(p<0.05), (C) 70.80  $\pm$  1.77 neuronas/mm<sup>2</sup>, (A+AA) 71.84  $\pm$  4.93 neuronas/mm<sup>2</sup>, Recuento neuronal colon distal: (A) 68.74  $\pm$  15.96 neuronas/mm<sup>2</sup>(n. s.), (C) 102.98  $\pm$  10.88 neuronas/mm<sup>2</sup>, (A+AA) 118.25  $\pm$  11.64 neuronas/mm<sup>2</sup>. En la dosis empleada el AA fue capaz de revertir

los efectos del aloxano sobre el recuento neuronal del yeyuno y colon proximal. El recuento neuronal de los animales tratados con A+AA no difirió del grupo control indicando un efecto antioxidante protector del ácido ascórbico sobre el efecto tóxico del aloxano en las neuronas NADPH+.

**666. (161) EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS á (ER-á) MEDIA LA INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 3 (MRP3/MRP3) HEPÁTICA POR ETINILESTRADIOL (EE).**

Ruiz M.<sup>1</sup>; Rigalli J.<sup>2</sup>; Arias A.<sup>3</sup>; Villanueva S.<sup>4</sup>; Mottino A.<sup>5</sup>; Catania V.<sup>6</sup>  
 IFISE<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 ruiz@ifise-conicet.gov.ar

MRP3 es una proteína de localización basolateral en epitelios polarizados que transporta aniones orgánicos conjugados hacia la sangre. En trabajos previos demostramos que la inducción de Mrp3 hepática producida por EE es independiente del efecto colestásico que causa este estrógeno sintético en ratas. Objetivo: evaluar la participación de ER-á en la modulación de la expresión de MRP3 por EE. Se utilizaron cultivos primarios de hepatocitos de ratas incubados con EE (10 µM por 4 hs, concentración y tiempo a los cuales previamente observamos inducción de Mrp3). Algunas placas se pre-incubaron por 30 min con ICI 182/780 (1 µM), inhibidor del ER. Posteriormente se cuantificaron los niveles de ARNm de Mrp3 por real time PCR. Resultados: (% respecto del control): Control: 100±39, ICI182/780: 79±56, EE: 491±188\*, EE+ICI182/780: 60±34 (\*significativamente diferente de los demás grupos; n=3, p<0,05). Los datos indican que el antagonista del ER previene el aumento de Mrp3 por EE. Por otro lado se incubaron células HepG2, línea celular de origen humano que expresa ER-á en muy bajos niveles, por 24 y 48 hs con distintas concentraciones de EE (1, 10 y 50 µM). Se cuantificó la expresión de MRP3 por *western blotting*. No se encontraron cambios a los tiempos y concentraciones estudiadas por lo que se decidió transfectar las células con el plásmido de expresión de ER-α: pCMV5-hER-α. Se confirmó su expresión por *western blotting* y su actividad co-transfectando con el plásmido reportero indicador de respuesta a estrógenos 4xERE-tk-luc. Las células transfectadas se incubaron con EE (1, 10 y 50 µM). Se observó una inducción de MRP3 tanto a nivel proteico (+170%) como de ARNm (+100%) a la concentración de 50 µM de EE por 48 hs. Este incremento no se observó en células HepG2 transfectadas con el vector vacío (pCMV5). Con estos resultados podemos concluir que es necesaria la presencia del ER-á para observar el efecto inductor de EE sobre MRP3 tanto de origen humano como de rata.

**667. (164) LA ADHESIÓN Y POLARIZACIÓN DE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR INDUCIDAS POR GALECTINA-1 SON DOS PROCESOS RELACIONADOS.**

Bacigalupo M.<sup>1</sup>; Manzi M.<sup>2</sup>; Carabias P.<sup>3</sup>; Elola M.<sup>4</sup>; Muñoz M.<sup>5</sup>; Dominici F.<sup>6</sup>; Rabinovich G.<sup>7</sup>; Wolfenstein De Todel C.<sup>8</sup>; Espelt M.<sup>9</sup>; Troncoso M.<sup>10</sup>  
 IQUIFIB<sup>1 2 3 4 5 6</sup>; IBYME<sup>7</sup>; IQUIFIB<sup>8 9 10</sup>  
 lore\_baci@yahoo.com.ar

Resultados previos indican que Galectina-1 (Gal-1), una proteína con afinidad por β-galactósidos, promueve la adhesión y polarización de células de carcinoma hepatocelular, HepG2. Para evaluar si estos efectos son específicos de Gal-1, se investigó el efecto de otra galectina: Gal-3 aumentó el porcentaje de células adheridas (142±10%) pero no tuvo efecto sobre la polarización (determinada como canalículos biliares teñidos con faloídina-TRITC/100 células). Mediante Western blot, se demostró que Gal-1 induce la fosforilación de ERK pero no de Akt mientras que no afecta los niveles de expresión de las proteínas marcadoras de membrana apical, MDR1 y MRP2. Para evaluar si la polarización inducida por Gal-1 es un efecto secundario al aumento de la adhesión o, si por el contrario, los mismos son dos efectos independientes, se permitió la adhesión de las células sobre cubreobjetos durante 4 h y luego a) se agregó Gal-1 recombinante (rGal-1) (7 µM) o b) se transfectó con el siRNA específico (80 nM).

Al agregar rGal-1 a las células ya adheridas no se observaron diferencias significativas (134±3%) con respecto al control (en ausencia de rGal-1; 94±15%). Entonces, la presencia de rGal-1 al momento de plaquar las células es necesaria para promover un aumento en la polarización (156±5%). Mediante Western blot, se determinó que los niveles de expresión de Gal-1 disminuyeron significativamente con respecto a los niveles de b-actina (65,70±2,22% y 52,68±6,26%) luego de 48 y 72h respectivamente. El siRNA control no tuvo efecto sobre la expresión de Gal-1. El silenciamiento de Gal-1, 4h después de la adhesión, no produjo diferencias significativas en la polarización (90±5%) respecto a las células transfectadas con el siRNA control (104±15%). En conclusión, nuestros resultados indican que los efectos de Gal-1 sobre la polarización son específicos, secundarios a los efectos sobre la adhesión, involucran la vía de transducción de señales de ERK sin afectar la expresión de MDR1 y MRP2.

**668. (200) EN LA COLESTASIS POR ESTRADIOL-17á-D-GLUCURÓNIDO (E17G) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR) LA PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENO (RE) ES POSTERIOR A LA ACTIVACIÓN DE PKCá (PKC).**

Barosso I.<sup>1</sup>; Zucchetti A.<sup>2</sup>; Taborda D.<sup>3</sup>; Crocenzi F.<sup>4</sup>; Sánchez Pozzi E.<sup>5</sup>  
 Instituto de Fisiología Experimental IFISE<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 barosso@ifise-conicet.gov.ar

La activación del RE es necesaria para ciertos efectos del estradiol tales como la activación de quinasas de señalización: PKC y PI3K. Previamente demostramos que ambas quinasas participan en la colestasis por E17G, su derivado glucuronizado, por lo que se evaluó el rol del RE en esta patología. La activación del RE se manifiesta por su fosforilación en ser118 y puede ser bloqueada por ICI182,780 (ICI). *Métodos*: Estudios funcionales: DAHR fueron tratadas con dosis crecientes de E17G (25-800 µM) en presencia de ICI (1µM) y luego expuestas a clorometilfluoresceína diacetato un compuesto lipofílico captado por difusión pasiva y convertido en glutation metilfluoresceína (GSMF), sustrato de Mrp2. Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon GSMF en la vacuola canalicular. Se evaluó además el efecto conjunto de ICI y G66976 (1µM), inhibidor de sobre el efecto de E17G (100µM) en la acumulación vacuolar de GSMF, PKC. *Resultados* (n=3): Las curvas dosis-respuestas mostraron que ICI aumentó CE50 de E17G (86±4µM vs 317±24µM, p<0.05). ICI y G66976 protegieron sin sumar sus efectos (E17G:66±6%, E17G+ICI:87±4%, E17G+G6:89±2%, E17G+ICI+G6:84±7%, p<0.05) sugiriendo que comparten una misma vía de señalización. Para establecer un orden de activación se evaluó la activación del RE inducida por E17G (100µM) en presencia de G66976 (estimada por Western blot [WB] del RE fosforilado relativizado al RE total) y la activación de PKC por E17G (100µM) en presencia de ICI (evaluado por translocación de PKC a membrana estimada por WB). Se observó que ICI no previno la activación de PKC inducida por E17G, en cambio, G66976 previno la activación de RE inducida por E17G (%Control=E17G:176±3%, E17G+G6:88±12%, p<0.05, n=3). *Conclusiones*: El bloque de la activación del RE previene la alteración funcional del transportador Mrp2 producida por E17G. El RE compartiría la vía de señalización con PKC, siendo la activación de la quinasas previa a la activación de RE.

**669. (197) EL KNOCKDOWN DE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINA-8 INDUCE DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y PÉRDIDA DE VIABILIDAD EN CÉLULAS HEPG2.**

Marchissio M.<sup>1</sup>; Francés D.<sup>2</sup>; Carnovale C.<sup>3</sup>; Marinelli R.<sup>4</sup>  
 IFISE-CONICET-UNR<sup>1 2 3 4</sup>  
 mjuliam17@yahoo.com

La aquaporina-8 (AQP8) se expresa en la membrana interna mitocondrial del hepatocito. Recientemente se demostró que la AQP8 de origen humano posee una propiedad única entre las AQPs de mamífero: facilita la difusión transmembrana de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sobre esta base hipotetizamos

que una expresión defectiva de AQP8 mitocondrial afectaría la normal liberación de  $H_2O_2$  causando disfunción mitocondrial por daño oxidativo y pérdida de viabilidad celular. Usando ARNs de interferencia (ARNi) específicos para AQP8 humana, o controles correspondientes, generamos células HepG2 (derivadas de hepatoma humano) con niveles de expresión proteica de AQP8 mitocondrial significativamente disminuidos a las 72 h post-transfección (-60%,  $P < 0,05$ ). A las 24 y 48 h no se observaron cambios en AQP8 mitocondrial. Los niveles de  $H_2O_2$  se evaluaron en fracciones subcelulares de HepG2 enriquecidas en mitocondrias o en citosol, mediante la sonda fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). A las 72 h post-transfección con los ARNi se observó aumento de  $H_2O_2$  en mitocondrias (+32%,  $P < 0,05$ ) y disminución en citosol (-35%,  $P < 0,05$ ), no observándose diferencias a 24 o 48 h. El potencial de membrana mitocondrial, medido con la sonda fluorescente tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) y utilizando microscopía de fluorescencia, mostró una marcada disminución en las HepG2 tratadas con los ARNi por 72 h, no habiendo cambios a 24 o 48 h. En acuerdo con estos datos, recién a las 72 h se observó pérdida de viabilidad celular determinada por una reducida actividad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa (ensayo MTT; -55%,  $P < 0,05$ ) o por la incrementada liberación al medio de cultivo de la enzima lactato deshidrogenasa (+54%,  $P < 0,05$ ). Nuestros resultados sugieren que el knockdown de AQP8 mitocondrial en células HepG2 induce disfunción mitocondrial por acumulación de  $H_2O_2$  y la consecuente pérdida de viabilidad celular.

**670. (226) PAPEL DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENO (MAPKS) EN LA ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN SECRETORA CANALICULAR INDUCIDA TERT-BUTILHIDROPERÓXIDO (TBOOH) EN DUPLAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHRs).**

Toledo F.<sup>1</sup>; Basiglio C.<sup>2</sup>; Boaglio A.<sup>3</sup>; Sanchez Pozzi E.<sup>4</sup>; Roma M.<sup>5</sup>

Instituto de Fisiología Experimental -IFISE<sup>1 2 3 4 5</sup>  
toledo\_fla@hotmail.com

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que el agente pro-oxidante modelo tBOOH induce alteraciones en la función secretora hepatocanalicular de DAHRs vía activación de isoformas de proteína quinasa C dependientes de  $Ca^{2+}$ . Estas quinasas median la desorganización del citoesqueleto de actina con la consecuente disrupción de las uniones estrechas intercelulares y la internalización endocítica de transportadores canaliculares responsables de la formación de bilis Bsep y Mrp2. Dado que las MAPKs podrían actuar como efectores cascada abajo de cPKC, en este estudio indagamos la participación de vías de señalización de las isoformas de MAPKs de tipo ERK, JNK y p38<sup>MAPK</sup> en los efectos deletéreos funcionales del tBOOH en DAHRs. tBOOH (125  $\mu$ M) disminuyó la capacidad de las DAHRs para secretar apicalmente el sustrato de Bsep colil-lisil-fluoresceína (-50±4%,  $p < 0,005$ ). Los inhibidores selectivos de MAPKs de tipo ERK 1/2 (PD098059, 50 mM), de tipo JNK (SP600125, 10  $\mu$ M) y de tipo p38<sup>MAPK</sup> (SB203580, 1  $\mu$ M) previnieron parcialmente esta alteración (PD098059: +28±5; SP600125: +34±5; SB203580: +29±4;  $n=6$ ,  $p < 0,05$ ). Con el sustrato de Mrp2 glutation-metil-fluoresceína los resultados fueron similares: tBOOH (125  $\mu$ M) disminuyó la secreción apical del sustrato en DAHRs (-52±4%,  $p < 0,005$ ) y los inhibidores selectivos de MAPKs previnieron parcialmente esta alteración (PD098059: +28±3; SP600125: +31±2; SB203580: +31±3,  $n=5$ ,  $p < 0,05$ ). Técnicas de inmunomarcado seguido de microscopía confocal revelaron que tBOOH (125  $\mu$ M) indujo marcada internalización de Bsep y Mrp2, y que el pretratamiento con los diferentes inhibidores de MAPKs previnieron parcial pero significativamente estas alteraciones. Concluimos que las MAPKs de tipo p38<sup>MAPK</sup>, ERK y JNK participan parcialmente en las alteraciones funcionales inducidas por tBOOH sobre la capacidad de DAHRs para secretar sales biliares al canalículo biliar promoviendo la internalización endocítica de transportadores canaliculares.

**671. (233) LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DE LA ENZIMA SCD1 (STEAROYL-COA DESATURASE 1) SE ENCUENTRA**

**DISMINUIDA EN DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES DE ESTEATOSIS HEPÁTICA.**

Rosselli M.<sup>1</sup>; Burgueño A.<sup>2</sup>; Gonzales Mansilla N.<sup>3</sup>; Pirola C.<sup>4</sup>; Sookoian S.<sup>5</sup>

Laboratorio de Hepatología Clínica y Molecular Instituto de Investigaciones Médicas IDIM CONICET<sup>1 5</sup>; Departamento de Genética y Biología Molecular de Enfermedades Complejas Instituto de Investigaciones Médicas IDIM CONICET<sup>2 3 4</sup>.  
soleros@yahoo.com.ar

SCD1 es una enzima limitante en la biosíntesis de ácidos grasos moninsaturados. Su papel en la fisiopatología de la enfermedad grasa del hígado no alcohólica (NAFLD) es controvertido, ya que aunque animales SCD1<sup>-/-</sup> desarrollan un fenotipo con aumento del gasto energético, insulino sensibilidad y son delgados, tienen altos niveles circulantes de VLDL y colesterol. El propósito de este estudio fue evaluar la expresión hepática de SCD1 en diferentes modelos de NAFLD y su relación con la de varios genes lipogénicos y gluconeogénicos. **Métodos:** se usaron dos modelos de NAFLD: 1-Ratas Sprague-Dawley macho (SD) sometidas a dieta grasa (n=6) la cual indujo exitosamente NAFLD y alimentadas con dieta estándar (n=6); 2-Cepa SHR (spontaneously hypertensive rat), la cual desarrolla insulino resistencia (IR), y los respectivos controles normotensos-sin IR (Wistar-Kyoto, WKY); 7 machos de cada cepa fueron sometidos a dieta grasa la cual también indujo NAFLD, y otros 13 fueron alimentados con dieta estándar. Se evaluó la expresión hepática (medición del mRNA mediante PCR en tiempo real con mRNA TBP como referencia) de: SCD1, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , HNF4a, PGC1a, PEPCK, SIRT1, FOXO1, CPT1 y SREBF1c. **Resultados:** en ambos modelos experimentales se observó una marcada disminución de la expresión hepática de SCD1 en el grupo que desarrolló esteatosis: 1-ratas SD (SCD1/TBP: grupo control 235±195 vs dieta grasa 4.5±2.9,  $p=0.0003$ ); 2-ratas SHR: control 111±16 vs NAFLD 15±15,  $p=0.00002$ , independientemente de la cepa y la presencia de IR (ANCOVA corregido por HOMA). La expresión hepática de SCD1 correlacionó significativamente y en forma inversa con el score de esteatosis hepática: Spearman R=-0.67,  $p=0.0001$  y con la expresión de: PPAR $\gamma$  (R=-0.043,  $p=0.023$ ), SIRT1 (R=-0.42,  $p=0.02$ ) y HNF4a (R=-0.42,  $p=0.02$ ). Conclusión: la NAFLD se asocia con una severa disminución en la expresión hepática de SCD1, en la cual SIRT1 y otros factores nucleares podrían jugar un papel importante nunca antes descrito.

**672. (433) SISTEMA ENDOTELINÉRGICO EN LA GLÁNDULA SUBMAXILAR DE RATA.**

Ventimiglia M.<sup>1</sup>; Rodriguez M.<sup>2</sup>; Morales V.<sup>3</sup>; Castañeda M.<sup>4</sup>; Perazzo J.<sup>5</sup>; Vatta M.<sup>6</sup>; Bianciotti L.<sup>7</sup>  
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 5 6 7</sup>; Universidad Austral<sup>4</sup>.  
lbianc@ffyba.uba.ar

En trabajos previos mostramos que las endotelinas (ETs) no son agonistas sialogogos *per se* pero ET-1 (10nM) administrada intraglandularmente a través de receptores ET<sub>A</sub> potencia la secreción salival inducida por estímulo adrenérgico y colinérgico en la glándula submaxilar (GSM), mientras que la ET-3 por la misma vía no tiene efecto. Profundizamos estos estudios a fin de determinar los mecanismos involucrados en la respuesta de ET-1 e investigamos la expresión de ETs y sus receptores en la glándula. La ET-1 (10 nM) incrementó la hidrólisis de fosfoinosítidos (% control) (\*: $p < 0,05$  vs control) (100±3.6 vs 201.4±6.4\*) mientras que la ET-3 (10nM) la disminuyó (100±3.6 vs. 75.6±8.5\*). La respuesta de ambas ETs fue inhibida en presencia de BQ-610 (antagonista selectivo de receptores ET<sub>A</sub>) (\*: $p < 0,05$  vs. ET-1 o ET-3) (BQ-610: 94± 8.1; BQ-610+ET-1: 99.2±10.6\*; BQ-610+ET-3: 102.3±9.6\*). Estudios de RT-PCR revelaron que la ET-1 y ET-3 se expresan en la GSM así como también sus receptores (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>). Estudios de inmunohistoquímica mostraron que el receptor ETA se localiza en la región peritubular de ductos interacinarios coincidente con la localización de las células mioepiteliales mientras que ETB se limita a pequeños vasos y capilares. Estos resultados sugieren

que ET-1 y ET-3 se sintetizan en la GSM y actuarían de manera parácrina y/o autocrina regulando su funcionalidad. La ET-1 a través del receptor ET<sub>A</sub> acoplado a la activación de fosfolipasa C favorecería la contracción de células mioepiteliales lo que explicaría la potenciación de la secreción salival estimulada por agonistas colinérgicos y adrenérgicos. La ET-3 participaría en la regulación de otras funciones no relacionadas con la respuesta secretora.

**673. (447) ESTUDIO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS DE INFLAMACIÓN: PROTEÍNA C REACTIVA, PROTEÍNA ASOCIADA A LA PANCREATITIS Y MIELOPEROXIDASA EN PACIENTES CON PATOLOGÍA PANCREÁTICA.**

Serra C.<sup>1</sup>; López Mingorance F.<sup>2</sup>; Bustos M.<sup>3</sup>; Yapur V.<sup>4</sup>; Sorda J.<sup>5</sup>; Negri G.<sup>6</sup>; Dicarlo M.<sup>7</sup>

Departamento de Bioquímica Clínica Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; Servicio de Gastroenterología Hospital de Clínicas UBA<sup>5</sup>  
candyser@gmail.com

La compleja fisiopatología de las pancreatitis aguda (PA) o crónica (PC), de múltiples etiologías, permanece en estudio. PA, enfermedad autodigestiva con activación prematura y retención de enzimas en células acinares. PC, proceso que conduce a fibrosis y a una pérdida progresiva e irreversible de funciones exócrina y endocrina. El daño pancreático y peripancreático es muy variable, orienta al pronóstico y tratamiento. Los marcadores bioquímicos para su evaluación: Amilasa (Ami), lipasa (Lip), glucemia (Glu) e insulinemia (Ins) permiten un estudio global del páncreas. Posibles marcadores de inflamación son: Proteína-C-reactiva (PCRus), de fase aguda y síntesis hepática; Proteína asociada a la pancreatitis (PAP), sobreexpresada ante injuria y actúa como antiinflamatorio; y Mieloperoxidasa (MPO), hemoenzima de neutrófilos, monocitos y macrófagos, productora de oxidantes potentes. *Objetivo:* Analizar: Ami, Lip, Glu, Ins, PCR, PAP y MPO en suero de pacientes con PA y PC. Se estudiaron 42 pacientes: controles (C-n=11, 58±12 años, 3H/8M); PA (n=15, biliar, 24-48hs. evolución; 69±17 años, 5H/10M) y PC (n=16; 51±11 años, 9H/7M). Consentimiento informado: Comité Ética-FFyB-UBA. Se determinó: Ami, Lip, Glu, PCRus (métodos automatizados); Ins y PAP (Enzimoimmunoensayos) y MPO (Método Cinético modificado). *Resultados:* media ± desvío estándar:

	C	PA	PC
Ami (UI/L)	84±39	389±318	76±35
Lip (UI/L)	67±34	1408±1309	57±28
Glu (mg/dl)	83±13	92±28	97±17
Ins (mUI/ml)	8,5±4,4	12,2±8,7	10,5±4,9
PAP (ng/ml)	10,2±2,2	94,7±58,4	11,1±6,0
PCRus (mg/l)	0,8±0,6	28,6±11,5	2,0±1,6
MPO (UI/L)	34,9±10,9	59,8±17,0	30,7±8,2

*Conclusiones:* -Aumentos significativos (P<0,001) en PA en relación a C y PC; y sin diferencias significativas entre PC y C, en los marcadores de rutina: Ami y Lip y de inflamación: PCR, PAP y MPO; indicando relación sólo con proceso agudo. -Asociaciones positivas significativas (P<0,001): PCR/PAP; PAP/MPO y PCR/MPO, demostrando comportamiento similar. -Aumentos no significativos: Glu e Ins en PA y PC, asociado al probable compromiso del páncreas endocrino ante alteración exócrina.

**674. (702) S100A10 AUMENTA LA RESISTENCIA DE LAS CÉLULAS TUMORALES PANCREÁTICAS AL TRATAMIENTO CON GEMCITABINA MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR VMP1.**

Pardo R.<sup>1</sup>; Ropolo A.<sup>2</sup>; Grasso D.<sup>3</sup>; Molejón M.<sup>4</sup>; Iovanna J.<sup>5</sup>; Vaccaro M.<sup>6</sup>

Laboratorio de Fisiopatología Molecular, Cátedra de Fisiopatología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
alejandro.ropolo@gmail.com

La autofagia es un proceso de degradación de constituyentes celulares citoplasmáticos. VMP1 (Vacuole-Membrane-Protein-1) es

una proteína inducida durante la pancreatitis que gatilla la autofagia en células de mamífero. Las células tumorales pancreáticas son altamente resistentes al tratamiento. Recientemente, demostramos que la gemcitabina, el agente quimioterapéutico estándar para el cáncer de páncreas, es capaz de inducir la expresión de VMP1 en células tumorales pancreáticas llevando a la autofagia y posterior muerte por apoptosis. Con el objetivo de profundizar los eventos moleculares implicados en la resistencia de las células tumorales pancreáticas, buscamos interactores de VMP1 utilizando la estrategia de doble híbrido. Encontramos que VMP1 interactúa con S100A10, un miembro de la familia de proteínas S100, que aumenta su expresión en el cáncer de páncreas. Confirmamos la interacción VMP1-S100A10 mediante el ensayo de pull-down. Mediante Real Time RT-PCR mostramos que la expresión del S100A10-RNA es mayor en células MIAPaCa-2 que en células HeLa. Utilizando el reagrupamiento de LC3 como marcador de autofagia, analizamos el efecto de la sobreexpresión de S100A10 sobre la autofagia mediada por VMP1. Demostramos que S100A10 reduce la formación de autofagosomas inducida por el tratamiento con gemcitabina y por la sobreexpresión de VMP1. Asimismo, la sobreexpresión de S100A10 modificó la localización subcelular de VMP1, cambiando de un patrón agrupado a una distribución reticular, similar al retículo endoplásmico. Mediante citometría de flujo de células marcadas con Annexina V y 7-AAD y ensayo de actividad de caspasa-3, determinamos que la inhibición de la expresión de S100A10 utilizando un shRNA específico incrementó la apoptosis en las células tratadas con gemcitabina. Concluimos que la expresión de S100A10 reduce la autofagia mediada por VMP1 e incrementa la resistencia de las células tumorales pancreáticas al tratamiento con gemcitabina.

**675. (814) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN EL EFECTO COLERÉTICO DE LAS ENDOTELINAS (ETS).**

Rodríguez M.<sup>1</sup>; Nabhen S.<sup>2</sup>; Vatta M.<sup>3</sup>; Bianciotti L.<sup>4</sup>

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires<sup>1 2 3 4</sup>  
lbianciotti@hotmail.com

En estudios previos demostramos que las ETs inducen colerisis en la rata a través de receptores ET<sub>B</sub> acoplados a la formación de óxido nítrico incrementando la fracción ácido biliar dependiente e independiente y que la vagotomía troncular inhibe la respuesta. El objetivo del presente trabajo fue profundizar los estudios para conocer los mecanismos subyacentes. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley (230-250 g) a las que se canuló el conducto hepático común para la recolección de muestras de bilis a distintos tiempos (30, 60, 90 y 120 min) y vena yugular para infusión de solución fisiológica (control (C)) o ET-1 (1 ng/kg/min) o ET-3 (5 ng/kg/h) o atropina (A). El tratamiento con A bloqueó la colerisis inducida por ETs al igual que la aplicación perivagal de capsaicina (CP) (permite evaluar la participación de aferencias vagales). Se muestran solo datos de ET-1 a 30 min (µl/min/100g peso) (\*: p<0.05 vs C o ET-1). C: 5.0±0.4; ET-1: 7.2±0.3\*; A: 4.75±0.4; A+ET-1: 3.9±0.5\*; CP: 4.5±0.3; CP+ET-1: 4.0±0.4\*. Se determinó por RT-PCR y western blot que los receptores de ETs (ETA y ETB) se expresan no solo en hígado sino también en nervios vagos. Por PCR en tiempo real se observó en hígados de animales infundidos con ETs (120 min) que ambos péptidos incrementaron la expresión de los principales transportadores de sales biliares y de acuaporina-8. La ET-3 incrementó más que ET-1 la expresión del transportador sinusoidal Ntcp (\*p<0.05 vs C) (C: 0.99±0.07; ET-1: 5.25±1.4\*; ET-3: 7.8±0.86\*). Sin embargo ET-1 produjo un mayor incremento que ET-3 en la expresión del transportador canalicular Bsep (C: 1.3±0.27; ET-1: 7.4±0.9\*; ET-3: 5.1±0.4\*). Los resultados sugieren que la colerisis inducida por ETs involucra la participación de reflejos vago-vagales. Las ETs activarían receptores ET<sub>B</sub> no solo en hígado sino también en terminaciones vagales. El incremento en el ARNm de los transportadores involucrados en la génesis de la secreción biliar sugiere que las ETs estimulan su síntesis.

**676. (62) EVALUACIÓN DEL ROL DE LA AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL HEPÁTICA EN EL TRANSPORTE DE AMONÍACO Y LA SÍNTESIS DE UREA**

Soria L.<sup>1</sup>; Carreras F.<sup>2</sup>; Lehmann G.<sup>3</sup>; Taborda D.<sup>4</sup>; Larocca M.<sup>5</sup>; Marinelli R.<sup>6</sup>  
*Instituto de Fisiología Experimental*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 ele0ese@hotmail.com

La destoxicación del amoníaco ocurre en el hígado, principalmente a nivel mitocondrial por ureagénesis, este proceso se encuentra disminuido en disfunción hepática asociada a sepsis. Estudios previos sugieren que la AQP8 facilita el transporte difusivo del amoníaco al interior mitocondrial. **Objetivo:** Evaluar si una alteración en la expresión de AQP8 mitocondrial hepática se encuentra asociada a una falla en la síntesis de urea. **Metodología:** A ratas Wistar macho adultas se les administró una dosis única no letal endovenosa (4 mg/kg p.c.) de LPS de *Salmonella Typhimurium*. El contenido de AQP8 mitocondrial se determinó por inmunoblotting y posterior densitometría, utilizando anticuerpos comerciales. En las mitocondrias de ratas tratadas 16 h con LPS, observamos que la expresión de AQP8 mostró una disminución de un 80% ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ). Se evaluó el transporte de amoníaco en vesículas de membrana mitocondrial interna utilizando [<sup>14</sup>C]metilamina y la técnica de filtración rápida. Las vesículas provenientes de las ratas tratadas con LPS mostraron una disminución de aproximadamente un 35% ( $p < 0,05$ ;  $n=4$ ) en la captación de [<sup>14</sup>C]metilamina respecto al grupo control. Utilizando ARN de interferencia en cultivo primario de hepatocitos aislados de rata, generamos células con disminución en la expresión de AQP8 mitocondrial (AQP8-), que fue corroborada por inmunoblotting (-80%). Además evaluamos la expresión de las enzimas mitocondriales del ciclo de la urea: CPS1 y OTC donde no observamos cambios entre los grupos en estudio. Células controles y AQP8- fueron testeadas en su capacidad de sintetizar urea en condiciones de estímulo, exponiéndolas a la hormona glucagon (1  $\mu$ M) durante 4 h. La disminución en la expresión de AQP8 inhibió significativamente la producción de urea (-75%,  $p < 0,05$ ;  $n=4$ ). **Conclusión:** Nuestros datos sugieren que la AQP8 mitocondrial participa en el proceso de ureagénesis hepática facilitando el transporte mitocondrial de amoníaco.

#### CARDIOVASCULAR 4

**677. (56) ANIÓN SUPERÓXIDO EN CORAZÓN DE RATAS TRATADAS CON L-NAME: EFECTO DE (-)-EPICATEQUINA.**  
 Calabró V.<sup>1</sup>; Galleano M.<sup>2</sup>; Fraga C.<sup>3</sup>; Piotrkowski B.<sup>4</sup>  
*Fisicoquímica-pralib, Facultad de Farmacia y Bioquímica UBA, CONICET*<sup>1 2 3 4</sup>; *Department of Nutrition UC Davis*<sup>5</sup>  
 valecalabro@gmail.com

Modificar la dieta sería una posible estrategia para prevenir la hipertensión (HT) y sus efectos secundarios. El objetivo de este trabajo fue evaluar los factores que contribuyen al desarrollo del estrés oxidativo en miocardio en los estadios tempranos de la HT inducida por L-NAME y su modulación por (-)-epicatequina (E). Estudios previos del laboratorio mostraron que el tratamiento con el L-NAME por 4 días incrementó la presión arterial, y la E previno dicho aumento (Galleano M y col., SAIC 2009). Ratas SD se dividieron en 3 grupos: Control (C), L-NAME (L:360mg/L), L-NAME+Epicatequina (L+E:360mg/L+0.4mg/g dieta). L y E fueron co-administradas por 4 días en el agua de bebida y en la dieta sólida, respectivamente. Los animales se sacrificaron y se extrajo el corazón. La relación peso de corazón/peso total fue similar en los 3 grupos y no hubo diferencias significativas en la actividad de la metaloproteasa de matriz tipo 2, determinada por zimografía. Se determinó la actividad de NADPH oxidasa (NOX), por quimioluminiscencia inducida por lucigenina, y se observó un aumento significativo en L con respecto a C, y E revirtió el aumento (C:1.0 $\pm$ 0.1; L:1.42 $\pm$ 0.11; E:0.87 $\pm$ 0.07 cpm/mg proteína) ( $p < 0.05$  L vs C y E). Este incremento no estaría asociado a un aumento en la expresión ya que la determinación por Western Blot de p47 fue similar en los 3 grupos. La actividad de SOD total no fue afectada por los tratamientos, mientras que la de MnSOD en L fue significativamente menor que en C y E (C:1.97 $\pm$ 0.20; L:1.47 $\pm$ 0.17; E:2.28 $\pm$ 0.26 mU SOD/mg proteína) ( $p < 0.05$  L vs C

y E). Los resultados indican que en estadios tempranos de la HT, se evidencia un aumento en los niveles de anión superóxido en tejido cardíaco, que podría estar asociado a la activación de NOX y/o a la inhibición de la actividad de MnSOD. La administración dietaria de E suprimió este incremento y estudios posteriores serán necesarios para establecer el mecanismo responsable de dicho efecto. *Subsidios: UBACyT 801 y 802.*

**678. (125) EL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO REDUCE EL TAMAÑO DE INFARTO A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES- $\alpha$ 1 ADRENÉRGICOS.**

Siachoque N.<sup>1</sup>; Buchholz B.<sup>2</sup>; D'annunzio V.<sup>3</sup>; Quiroga A.<sup>4</sup>; Donato M.<sup>5</sup>; Gelpi R.<sup>6</sup>  
*Instituto de Fisiología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 nadezda\_ann@yahoo.com

Existe evidencia experimental que demuestra la participación de los receptores  $\alpha$  adrenérgicos en el mecanismo del preconditionamiento isquémico (PC). Sin embargo, no existen trabajos que hayan estudiado el rol de estos receptores en el poscondicionamiento isquémico (Poscon). El objetivo fue evaluar si el efecto protector del Poscon es mediado por la activación de los receptores  $\alpha$ 1 adrenérgicos y su relación con la peroxidación lipídica. Se utilizaron corazones aislados de ratas Wistar, perfundidos según la técnica de Langendorff. En G1 ( $n=5$ ) se realizó una isquemia global de 30 min seguidos por 2 hs de reperfusión. En G2 ( $n=9$ ), luego de la isquemia global de 30 min se realizaron 6 ciclos de reperfusión/isquemia de 10 seg cada uno (Poscon), seguidos por 2 hs de reperfusión. En G3 ( $n=3$ ), se repitió el protocolo de G2, pero durante el protocolo de Poscon se administró prazosín (bloqueante selectivo  $\alpha$ 1 adrenérgico; 1 $\mu$ M). Se evaluó la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) y el tamaño de infarto (TI%). En muestras de VI se evaluó la peroxidación lipídica a través de la técnica de las Sustancias Reactivas al Acido Tiobarbitúrico (TBARS). \*:  $p < 0.05$  vs. Basal, #:  $p < 0.05$  vs. G1, X  $\pm$  ESM.

	BASAL	5' REP	30' REP	TI (%)
G1; PDVI (mmHg)	100,96 $\pm$ 3,93	11,75 $\pm$ 4,25 *	13,35 $\pm$ 2,46 *	
G1; PDFVI (mmHg)	9,24 $\pm$ 0,40	120,89 $\pm$ 4,09 *	102,71 $\pm$ 5,01 *	55,20 $\pm$ 5,03
G1; TBARS (nM/mg)	0,31 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,06 *	0,64 $\pm$ 0,09 *	
G2; PDVI (mmHg)	110,34 $\pm$ 4,91	7,61 $\pm$ 1,46 *	11,80 $\pm$ 1,90 *	
G2; PDFVI (mmHg)	7,89 $\pm$ 0,42	126,07 $\pm$ 3,88*	107,60 $\pm$ 4,77*	40,13 $\pm$ 3,41 *
G2; TBARS (nM/mg)	0,31 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,01 #	0,33 $\pm$ 0,08 #	
G3; PDVI (mmHg)	105,43 $\pm$ 5,22	5,82 $\pm$ 0,91 *	11,08 $\pm$ 3,09 *	
G3; PDFVI (mmHg)	7,24 $\pm$ 0,52	122,77 $\pm$ 7,28 *	102,46 $\pm$ 11,07 *	55,2 $\pm$ 5,03
G3; TBARS (nM/mg)	0,31 $\pm$ 0,02	0,51 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,04	

El poscondicionamiento isquémico reduce el tamaño de infarto y atenúa la peroxidación lipídica, a través de la activación de los receptores  $\alpha$ 1 adrenérgicos, sin modificar la recuperación de la función ventricular postisquémica.

**679. (148) EFECTO DEL TRATAMIENTO DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA (LC) EN RATAS WISTAR CON DIETA HIPERCOLESTEROLÉMICA SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL PLASMÁTICO Y LA VISCOSIDAD SANGUÍNEA.**

Dominighini A.<sup>1</sup>; González J.<sup>2</sup>; Crosetti D.<sup>3</sup>; Urli L.<sup>4</sup>; Ronco M.<sup>5</sup>; Monti J.<sup>6</sup>; Wagner M.<sup>7</sup>; Carnovale C.<sup>8</sup>; Luquita A.<sup>9</sup>  
*Cátedra de Biofísica, Fac. Ciencias Médicas-UNR.*<sup>1 2 3 4</sup>; *Cát. Fisiología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas-UNR; CONICET*<sup>5 6 8</sup>; *Farmacobotánica - Farmacia y Bioquímica-UBA*<sup>7</sup>; *Cátedra de Biofísica, Fac. Ciencias Médicas-CIURN-UNR.*<sup>9</sup>  
 adominighini@arnet.com.ar

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

(PLc).Objetivo: analizar el efecto del tratamiento de PLc sobre la concentración plasmática de Co y la viscosidad sanguínea. Métodos: Ratas Wistar macho adultas endocriadas (n=24), de 70 días de edad, fueron alimentadas durante 28 días con "dieta estándar" adicionada con Co (97% de pureza) 0,8g/100g de dieta y aceite de maíz 28% (peso/peso de dieta). Se utilizaron ratas como Controles (C) (n=12) inyectadas i.p. con solución fisiológica y Tratadas (T) (n=12) inyectadas i.p. con PLc 3 mg /100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 días. Al cuarto día las ratas se anestesiaron, obteniéndose sangre por punción cardíaca. Se determinaron en plasma: Co (por método enzimático de esterasa-oxidasa) y CoLDL. En sangre: viscosidad sanguínea y plasmática con viscosímetro rotacional Wells- Brookfield LVT- a una velocidad de cizallamiento de 230 s<sup>-1</sup>, a 37 °C. La viscosidad sanguínea relativa estandarizada a un hematocrito (VSrs) del 45%, se calculó como= (Viscosidad sanguínea/Viscosidad plasmática)45/ Hto. Resultados: (media ± ES). Co plasmático (mg %) : C : 89,66 ± 2,29, T: 61,18 ± 3,30\* ; CoLDL : C:29,92 ± 2,27 ;T:16,13 ± 1,33\*(p<0,05) VSrs: C:5,54±0,41,T: 4,92±0,27 (no significativo vs. C). Conclusión: El tratamiento con PLc (dosis 3 mg%) produce un descenso de Co plasmático, CoLDL, sin modificar la viscosidad sanguínea ni plasmática en ratas alimentadas con dieta hipercolesterolémica. La importancia de estos resultados radica en haber obtenido una fracción del extracto crudo de Lc, que desciende el Co total y el CoLDL en plasma sin alterar la fluidez de la sangre.

**680. (162) PARTICIPACIÓN DE LA KINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK) EN LOS EFECTOS DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) SOBRE LA TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL FLUJO CERO - REPERFUSIÓN.**

Torresin M.<sup>1</sup>; Vélez D.<sup>2</sup>; Hermann R.<sup>3</sup>; Savino E.<sup>4</sup>; Varela A.<sup>5</sup>; Marina Prendes M.<sup>6</sup>

*Cátedra de Fisiología, FFYB, UBA. IQUIMEFA-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*

*gmarina@ffyb.uba.ar*

Trabajos anteriores mostraron que el PC mejora la recuperación funcional y disminuye la necrosis en corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a isquemia global-flujo cero (I) (25min) - reperfusión (RP) (30 min). El compuesto C (CC), inhibidor de la AMPK revierte estos efectos beneficiosos. El objetivo fue evaluar si los efectos observados se acompañan de cambios paralelos en la sensibilidad a la apertura de poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPM) frente a concentraciones crecientes de calcio. El PC consistió en 6 ciclos de RP(10 seg)-I(10 seg) al finalizar la isquemia sostenida. El CC (10 µM) fue administrado en el medio de perfusión durante los primeros 5 minutos luego de la isquemia sostenida tanto en corazones controles como poscondicionados. Las mitocondrias fueron aisladas al finalizar la RP sostenida 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<sup>2+</sup>. Se empleó ciclosporina A, 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<sup>2+</sup> empleada. La estadística se hizo con ANOVA (n=8). Resultados (expresados como porcentaje de caída de la Abs inicial a λ 540 nm):

	Ca <sup>2+</sup> 100µM	Ca <sup>2+</sup> 150µM	Ca <sup>2+</sup> 200µM	Ca <sup>2+</sup> 300µM	Ca <sup>2+</sup> 400µM	Ca <sup>2+</sup> 500µM
Control	1,30 ± 0,2	1,65 ± 0,3	1,97 ± 0,1	2,40 ± 0,1*	2,42 ± 0,2	2,40 ± ,1
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
Control+CC	0,68 ± 0,10	0,59 ± 0,10	0,79 ± 0,12	1,91 ± 0,4*	1,77 ± 0,3	1,72 ± 0,3
PC+CC	1,09 ± 0,3	0,82 ± 0,20	1,29 ± 0,3	2,60 ± 0,3*	2,80 ± 0,2	2,83 ± 0,4

\*p < 0.05 vs porcentaje de caída de Abs en respuesta a todas las concentraciones menores de Ca<sup>2+</sup> en el mismo grupo.

Los resultados sugieren la participación de la AMPK en los efectos beneficiosos del PC sobre la preservación de la permeabilidad mitocondrial.

**681 (169) PAPEL DE LA KINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK) EN LOS EFECTOS FUNCIONALES Y BIOQUÍMICOS PROTECTORES DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PC) EN CORAZONES DE RATA SOMETIDOS A ISQUEMIA - REPERFUSIÓN.**

Hermann R.<sup>1</sup>; Jaitovich M.<sup>2</sup>; García Allevi M.<sup>3</sup>; Rivera T.<sup>4</sup>; Torresin M.<sup>5</sup>; Marina Prendes M.<sup>6</sup>; Varela A.<sup>7</sup>

*Cátedra de Fisiología, FFYB, UBA.IQUIMEFA-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*

*avarela@ffyb.uba.ar*

Trabajos anteriores demostraron que el PC mejora la recuperación funcional en corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a isquemia global flujo cero (I) (25 min) - reperfusión (RP) (30 min), preserva la permeabilidad del sarcolema, disminuye el daño oxidativo, aumenta la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) y estimula el consumo de glucógeno. El objetivo fue explorar si el compuesto C (CC), inhibidor de la AMPK revierte estos efectos beneficiosos. El PC consistió en 6 ciclos de RP (10 seg) - I (10 seg) al finalizar la isquemia sostenida. El CC (10 µM) fue administrado en el medio de perfusión durante los primeros 5 minutos de RP tanto en corazones controles como poscondicionados. Se midió la recuperación contráctil [Presión sistólica pico x Frecuencia (PxF), velocidad de contracción y de relajación (±dP/dt)], liberación de creatina kinasa (CK), relación GSH/GSSG, daño oxidativo mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y el consumo de glucógeno. La estadística se hizo con ANOVA (n=8). El CC no alteró la recuperación funcional en corazones controles, pero revirtió los efectos del PC (PC vs PC+CC, 25 min RP: PxF 57,88±2,50 vs 33,94±3,00 p<0,01; +dP/dt 64,63±6,05 vs 41,00±6,35 p<0,01; -dP/dt 82,18±10,87 vs 57,31±9,34 p<0,01). No modificó ninguno de los parámetros bioquímicos medidos en los corazones controles. Revirtió parcialmente el efecto del PC sobre el consumo de glucógeno (30 min RP PC vs PC+CC: 10,33±3,39 vs 42,25±6.12 µg/100 mg peso seco, p<0,05). También revirtió el efecto protector sobre la preservación de GSH/GSSG (PC vs PC+CC: 17.69±4.64 vs 10.39±1.23 p<0,05), sobre el daño oxidativo (TBARS: PC vs PC+CC: 12.12±2.51 vs 20.71±3.80 nmol/g húmedo p<0,05) y la liberación de CK (PC vs PC+CC: 70,09±6,90 vs 162,17±4,46 UI/g húmedo p<0,05) Los resultados sugieren que la AMPK estaría involucrada en los efectos beneficiosos del PC explorados en el presente trabajo.

**682 (522) EFECTO ANTIHIPERTENSIVO DE LA EPICATEQUINA (EC) EN RATAS TRATADAS CON L-NAME: PARTICIPACIÓN DE LA NADPH OXIDASA (NOX).**

Litterio C.<sup>1</sup> Adamo A.<sup>2</sup>; Prince P.<sup>3</sup>; Oteiza P.<sup>4</sup>; Galleano M.<sup>5</sup>; Fraga C.<sup>6</sup>

*Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET<sup>1 3 5 6</sup>; Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, CONICET<sup>2</sup>; Department of Nutrition, University of California, Davis, USA<sup>4 6</sup>.*

*mclitterio@ffyb.uba.ar*

La biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), dependiente de su velocidad de producción y degradación (por reacción con anión superóxido) sería un factor determinante en la regulación de la presión arterial (PA). Estudios previos del laboratorio demostraron que la administración dietaria del flavonoide (-)-epicatequina (EC) redujo el incremento de PA inducido por L-NAME en ratas, asociado con el restablecimiento de los niveles de NO (Galleano M y col., SAIC 2009). El objetivo de este trabajo fue evaluar el papel de NOX (fuente de anión superóxido) y eNOS en aorta en este modelo experimental. Ratas macho Sprague-Dawley se dividieron en 3 grupos: Control (C), L-NAME (L), L-NAME+EC

(LEC) y se mantuvieron bajo tratamiento durante 4 días. L-NAME fue administrado en el agua de bebida (360mg/l) y EC fue co-administrada en la dieta sólida (4 mg/g dieta). Los animales fueron sacrificados al quinto día, las aortas fueron aisladas, se obtuvieron anillos (fijados para realizar ensayos inmunohistoquímicos) y el resto se almacenó a -80°C. La actividad de NOX en tejido aórtico, medida por quimioluminiscencia con lucigenina, mostró un aumento significativo en el grupo L, observándose una reversión de este efecto en presencia de EC en la dieta (C: 5150±595; L: 16528±2601; LEC: 3555±1118 cpm/mg proteína) ( $p < 0,05$  L vs C y LEC). La expresión y localización de p47<sup>phox</sup> (subunidad de NOX) en anillos de aorta fue analizada mediante inmunohistoquímica, mostrando un incremento significativo (40±5% en la capa media) en el grupo L respecto de C. La co-administración de EC evitó dicho incremento. La expresión de eNOS en aorta fue determinada por western blot, sin observarse diferencias significativas entre los tres grupos experimentales (C: 79±15; L: 92±9; LEC: 96±9 UA). Los resultados sugieren que la disminución de PA por EC, previamente informada en este modelo, estaría asociada a una reducción en la expresión y/o actividad de NOX como determinante del aumento de la biodisponibilidad de NO. Subsidios: UBACyT (801 y 802) y ANPCyT 00994.

### 683 (756) VALORACIÓN ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C SOBRE LA MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN ATEROGENESIS.

Llorens M.<sup>1</sup>; Balceda A.<sup>2</sup>; Baez M.<sup>3</sup>; Taran M.<sup>4</sup>; Scribano M.<sup>5</sup>; Campana V.<sup>6</sup>; Moya M.<sup>7</sup>

*Cátedra de Física Biomédica Facultades de Ciencias Médicas UNC; Ilicshum Universidad Nacional de La Rioja<sup>1,3</sup>; Cátedra de Física Biomédica Facultades de Ciencias Médicas UNC<sup>2,4,5</sup>; Cátedra de Física Biomédica Facultades de Ciencias Médicas Unc; Universidad Nacional de La Rioja<sup>6,7</sup>*  
cande\_llorens@hotmail.com

En aterosclerosis (AT) inducida por hiperfibrinogenemia (HF) la relación positiva de los radicales libres frente a los sistemas antioxidantes genera estrés oxidativo (EO), la vitamina C (vitC) proporcionaría una línea de defensa antioxidante. El objetivo fue valorar el efecto de vitC para estabilizar el estrés oxidativo en AT. Se estudió en ratas Wistar: A) control B) vitamina C x 90 días C) HF x 90 días y D) HF + vitC x 90 días. HF se indujo por inyección subcutánea de adrenalina (0.1 mg/rata/día) por 90 días. La dosis de vitC fue de 2,14 mg/día/rata. La actividad de superóxido dismutasa (SOD) (U/ml), concentración de óxido nítrico (NO) (µM) y actividad de los complejos mitocondriales (CM) (I, II, III, IV) se determinó por espectrofotometría. Se analizaron cortes de aorta torácica por microscopía electrónica. Estadística: MANOVA y Chi Cuadrado ( $p < 0,05$ ). No hubo diferencia significativa entre (A) (22,80 ± 4,43) y (B) (21,09 ± 5,76) en NO y SOD (A) (139,44 ± 14,24) y (B) (186,77 ± 5,77), ni en la morfología y función mitocondrial. NO disminuyó en (C) (13,73 ± 1,76) con respecto a (A) y (B). En (D) (22,41 ± 7,21) NO incrementó con respecto a (C) ( $p < 0,001$ ) y no presentó diferencias significativas con respecto a (A) y (B). SOD incrementó en (C) (245,42 ± 10,43) con respecto a (A) y (B) ( $p < 0,001$ ). En (D) (337,78 ± 21,08) SOD incrementó con respecto a (A), (B) y (C) ( $p < 0,001$ ). En (C) disminuyó significativamente el número total y medio de mitocondrias y crestas mitocondriales e incrementó la matriz intermembrana y tumefacción turbia respecto a (A) y (B) ( $p < 0,01$ ). La actividad de CM (I a IV) en (C) disminuyó con respecto a (A) y (B) ( $p < 0,001$ ). En (D) se reorganizó la morfología mitocondrial, con recuperación del área mitocondrial, tamaño y organización de crestas, pero no se normalizó ( $p < 0,001$ ). El funcionamiento de los CM no se recuperó en (D) ( $p < 0,01$ ). La VitC revirtió el proceso inflamatorio y oxidativo, pero no fue suficiente para la regresión de las lesiones ateroscleróticas mitocondriales inducidas por EO.

### 684 (769) ROL DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LA PROLIFERACIÓN DEL ENDOTELIO VASCULAR.

Rasante R.<sup>1</sup>; Egitto P.<sup>2</sup>; Oberkersch R.<sup>3</sup>; Calabrese G.<sup>4</sup>  
*Cátedra de Biología Celular y Molecular - FFYB - UBA<sup>1,2,3,4</sup>*  
yani0010@hotmail.com

La decorina y biglicano organizan la matriz extracelular vascular, y controlan los mecanismos de proliferación y migración celular, interactuando específicamente con citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento a través de sus esqueletos proteicos y de sus cadenas de glicosaminoglicanos, particularmente dermatán sulfato (DS). Frente a la injuria endotelial, la actividad de las metaloproteasas secretadas al microambiente, degrada los esqueletos proteicos, provocando la liberación del DS. Éste podría modular los eventos tempranos de la angiogénesis, como la proliferación endotelial. Células de endotelio cardíaco murino (H5V) monoconfluentes fueron cultivadas durante 24 hs, frente a concentraciones crecientes (5-100 µg/ml) de DS de bajo peso molecular (5 kDa). El rol del DS sobre la proliferación celular se estudió por: 1) recuento celular, 2) viabilidad celular con azul tripán y MTT; y 3) estudio de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por inmunofluorescencia. El recuento y la viabilidad celular determinada por el método del azul tripán (funcionabilidad de la membrana plasmática) frente a concentraciones crecientes de DS, no registraron diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo, la funcionalidad mitocondrial (método MTT) frente a 25 µg/ml de DS mostró un incremento significativo con respecto al control ( $P < 0,01$ ). El control evidenció una distribución homogénea de PCNA entre el núcleo y el citosol. A partir de la incorporación de 10 µg/ml de DS se observó una concentración nuclear y aumento en el número de figuras mitóticas. A concentraciones mayores a 75 µg/ml sólo se detectó localización nuclear sin figuras mitóticas. Los resultados obtenidos sugieren que la incorporación de DS al medio de cultivo modifica la proliferación endotelial. Consecuentemente, el DS liberado al microambiente celular frente a la injuria endotelial regularía, directa o indirectamente, uno de los eventos tempranos de la angiogénesis.

### 685 (773) EL PROTEOGLICANO DECORINA PARTICIPA EN LA MIGRACIÓN DE LAS CELULAS ENDOTELIALES VASCULARES.

Calabrese G.<sup>1</sup>; Gazzaniga S.<sup>2</sup>; Wainstok R.<sup>3</sup>

*Cátedra de Biología Celular y Molecular-ffyb-uba<sup>1</sup>; Depto de Química Biológica-FCEN-UBA<sup>2,3</sup>*  
gcalabe@ffyb.uba.ar

El pequeño proteoglicano decorina organiza la matriz extracelular vascular modulando la colageno-fibrinogénesis. Sin embargo son controversiales los reportes acerca de su capacidad pro o anti-angiogénica. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la participación del proteoglicano decorina en una de las etapas iniciales del proceso angiogénico: la migración endotelial; y su expresión frente a la activación con el lipopolisacárido bacteriano (LPS). La producción de decorina fue estudiada sobre la línea del endotelio cardíaco murino H5V cultivada en condiciones basales y activada con diferentes dosis de LPS (1.5 y 5 µg/ml). La producción del proteoglicano se analizó, por Western-blot, sobre la fracción subcelular correspondiente a las membranas biológicas obtenidas por centrifugación diferencial. En los estudios de migración endotelial por quimiotaxis sobre membranas pre-tratadas o no con colágeno de tipo I, se utilizaron células cultivadas en condiciones basales, activadas con LPS o silenciadas con siRNA para decorina. La producción de decorina de las células activadas con 5 µg de LPS mostró una disminución tanto en el proteoglicano (100 kDa) como en su esqueleto proteico (50kDa) comparada con las condiciones basales. Los estudios de migración endotelial por quimiotaxis en cámara de Boyden muestran una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) cuando las células activadas con 5 µg de LPS se hicieron migrar sobre membranas pre-tratadas con colágeno tipo I. El silenciamiento de la producción de decorina con siRNA produjo una reducción del 80% en la movilidad endotelial, con respecto a los controles. Los resultados obtenidos sugieren que la menor producción del proteoglicano decorina -ya sea por el silenciamiento con siRNA o producto de la activación con LPS- por parte de las células de la línea endotelial H5V se asociaría a una menor capacidad para remodelar la matriz extracelular, que resulta ser clave para producir la migración celular.



## FE DE ERRATAS

Este resumen corresponde a la Mesa ENDOCRINOLOGÍA 3 (pág. 152)

**335b (137) CAMBIOS MORFOMÉTRICOS EN LA POBLACIÓN LACTOTROPA INDUCIDOS POR TERAPIA GÉNICA NEONATAL CON EL VECTOR RAD-FTS EN RATONES NUDE.**Martines E.<sup>1,2</sup>; Reggiani P.<sup>1,3</sup>; Bracamonte M.<sup>3</sup>; Luna G.<sup>4</sup>; Goya R.<sup>3</sup>; Cónsole G.<sup>2,4</sup>*Universidad Adventista del Plata<sup>1</sup>; Cátedra B de Histología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP<sup>2</sup>; Cátedra B de Histología. Facultad de Ciencias Médicas. UNLP; INIBIOLP-CONICET<sup>3</sup>; Comisión de Investigaciones Científicas: CICPBA<sup>4</sup>*

&lt;evmartines@hotmail.com&gt;

**Introducción:** Existen alteraciones endocrinas en la timectomía neonatal, la inmunoneutralización de la timulina sérica y la ausencia congénita de timo. Se ha demostrado una comunicación bidireccional en el eje timo-pituitario, hallándose receptores de PRL en las células epiteliales tímicas. **Objetivo:** Implementar una terapia génica mediante el vector adenoviral RAdmet-FTS en ratones inmunodeficientes con el fin de prevenir cambios en la población lactotropa. **Material y métodos:** Se utilizaron ratones nude hembras-machos homocigotos y heterocigotos. El día 1 postnatal recibieron una única inyección bilateral i.m. de  $10^8$  unidades formadoras de placa de RAd-FTS, un vector adenoviral que expresa el gen de la timulina, o de un vector control (RAd-GFP). El día 71 postnatal los animales fueron sacrificados y se extrajeron las pituitarias bajo lupa. Se midió timulina sérica

por bioensayo. La inmunomarcación se realizó con un sistema anti-PRL-EnVision. Los parámetros morfológicos se registraron mediante un analizador de imágenes. **Resultados:** Hubo ascenso significativo ( $p < 0.01$ ) en los niveles séricos de timulina (fg/ml) en ratones nude RAd-FTS vs controles: M:  $278 \pm 26$  vs  $38 \pm 7$  y H  $279 \pm 43$  vs  $37 \pm 2$ . Se registró aumento significativo de TC y DV ( $p < 0.01$ ) en nu/nuRAd-FTS vs nu/nuRAd-GFP en hembras y machos, con dimorfismo según sexo.

	nu/+ RAd-GFP	nu/nu RAd-GFP	nu/nu RAd-FTS
<b>Machos</b>			
TC ( $\mu\text{m}^2$ )	$51,4 \pm 4$	$45,1 \pm 3$	$53,5 \pm 5^*$
DC ( $\times 10^{-4}$ )	$25,2 \pm 3$	$23,7 \pm 2$	$25,1 \pm 3$
DV ( $\times 10^{-2}$ )	$16,3 \pm 2$	$14,4 \pm 2$	$18,8 \pm 3^*$
<b>Hembras</b>			
TC ( $\mu\text{m}^2$ )	$68,7 \pm 5$	$52,1 \pm 4$	$65,4 \pm 6^*$
DC ( $\times 10^{-4}$ )	$36,0 \pm 2$	$30,2 \pm 3$	$35,3 \pm 4$
DV ( $\times 10^{-2}$ )	$21,1 \pm 2$	$13,8 \pm 1$	$23,6 \pm 3^*$

**Conclusión:** Nuestros hallazgos sugieren dimorfismo según sexo y un efecto modulador en el TC inducido por la terapia génica neonatal con timulina sobre la población lactotropa, constituyendo una estrategia eficaz para prevenir las deficiencias detectadas en el eje timo-pituitario de animales atímicos.