

## RESÚMENES DE LAS COMUNICACIONES

### PREMIO LEON CHERNY

#### 001. (129) DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENCEFALOMIOPATÍAS MITOCONDRIALES: EVALUACIÓN DE UNA PLATAFORMA DE PIROSECUENCIACIÓN MASIVA

Kauffman M.<sup>1</sup>; Gonzalez Moron D.<sup>2</sup>; Consalvo D.<sup>3</sup>; Westergaard G.<sup>4</sup>; Vazquez M.<sup>5</sup>; Mancini E.<sup>6</sup>; Taratuto A.<sup>7</sup>; Rey R.<sup>8</sup>; Kochen S.<sup>9</sup>

*Consultorio de Neurogenética. Centro Universitario de Neurología "José María Ramos Mejía" y División Neurología Hospital JM Ramos Mejía. Facultad de Medicina. UBA. IBCN "Eduardo De Robertis". Facultad de Medicina. UBA-CONICET<sup>1</sup>; Consultorio de Neurogenética. Centro Universitario de Neurología "José María Ramos Mejía" y División Neurología Hospital JM Ramos Mejía. Facultad de Medicina. UBA.<sup>2</sup>; IBCN "Eduardo De Robertis". Facultad de Medicina. UBA-CONICET<sup>3</sup>; INDEAR<sup>4,5,6</sup>; FLENI<sup>7</sup>; Consultorio de Neurogenética. Centro Universitario de Neurología "José María Ramos Mejía" y División Neurología Hospital JM Ramos Mejía. Facultad de Medicina. UBA.<sup>8</sup>; IBCN "Eduardo De Robertis". Facultad de Medicina. UBA-CONICET<sup>9</sup> marcelokauffman@gmail.com*

**Introducción y Objetivos:** Los trastornos mitocondriales son un grupo frecuente de trastornos neurogenéticos de difícil diagnóstico en la práctica asistencial en el que los avances de la genética han impactado su caracterización, clasificación y diagnóstico. Estos avances incluyen nuevas metodologías de secuenciación genómica que permiten obtener vastos volúmenes de información a un menor costo. Nuestro objetivo fue evaluar la utilidad de una plataforma genómica en el diagnóstico molecular de las Encefalomiopatías mitocondriales (EM). **Materiales y Métodos:** Se analizó la secuencia completa del genoma mitocondrial (ADNmt) de 2 pacientes con EM mediante la utilización de Long range PCR y pirosecuenciación masiva en sistema GS-FLX 454. **Procesamiento bioinformático** que incluyó herramientas gsMapper, Tablet, SIFT, MITOMAP y PHYLOTREE. **Resultados:** Se obtuvieron 227.469 fragmentos de aproximadamente 330 bases cada uno, equivalentes a 75.000.000 de nucleótidos, que permitieron identificar 2 mutaciones patogénicas diagnósticas en el ADNmt: 3243A>G y 8344A>G. Se reconocieron 9 variantes heteroplásmicas fisiológicas en ambos ADNmt. Se identificaron 74 polimorfismos que permitieron caracterizar los haplogrupos a alta resolución de ambos ADNmt. Se validaron técnicamente los hallazgos mediante secuenciación por electroforesis capilar. **Conclusiones:** A través del presente estudio pudimos mostrar la utilidad cierta de esta plataforma genómica en el diagnóstico preciso de los trastornos mitocondriales y vislumbrar la posibilidad de un diagnóstico molecular y exhaustivo de la patología neurogenética en nuestro país con recursos humanos y tecnológicos locales.

#### 002.(148) LA UNIÓN DE GALECTINA-1 A LA INTEGRINA $\alpha$ IIb $\beta$ 3 PROMUEVE LA ACTIVACIÓN PLAQUETARIA Y MODULA LA HEMOSTASIA PRIMARIA IN VIVO

Romaniuk A.<sup>1</sup>; Croci D.<sup>2</sup>; Laponi M.<sup>3</sup>; Tribulatti M.<sup>4</sup>; Negrotto S.<sup>5</sup>; Campetella O.<sup>6</sup>; Rabinovich G.<sup>7</sup>; Schattner M.<sup>8</sup> *Laboratorio de Trombosis I, Academia Nacional de Medicina 1 3 5 8; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET 2 7; Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de San Martín, CONICET 4 6 albertinar@gmail.com*

La comprensión de los mecanismos no-canónicos de activación plaquetaria representa un desafío para la identificación de nuevos blancos terapéuticos en los desórdenes hemorrágicos, trombóticos y el cáncer. Recientemente reportamos que Galectina-1 (Gal-1), proteína que se une a residuos  $\beta$ -galactósidos, promueve la activación plaquetaria. En este trabajo, investigamos los mecanismos moleculares involucrados en este proceso y la relevancia fisiológica de Gal-1 endógena en la hemostasia. Mediante estudios de espectrometría de masa y utilizando plaquetas de pacientes con tromboastenia de Glanzmann se identificó a la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 como el receptor funcional de Gal-1 en plaquetas. La unión de Gal-1 a  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 gatilló la fosforilación de la subunidad  $\beta$ 3 de la integrina, la activación de Syk, PLC $\gamma$ 2, PI3K, MAPKs, la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la generación de tromboxano. Además de la forma soluble, la Gal-1 inmovilizada promovió la activación plaquetaria a través de la señalización de Src, PI3K, PLC y PKC. Los ratones deficientes en Gal-1 (Lgals1<sup>-/-</sup>) presentaron tiempos de sangría prolongados comparado con los ratones WT, no asociados a un recuento anormal de plaquetas. Si bien las plaquetas Lgals1<sup>-/-</sup> respondieron de manera normal a la estimulación con ADP, PAR-4 o ácido araquidónico, se observó una disminución en la liberación de ATP ante la estimulación con colágeno. La disminución tanto en la adhesión al fibrinógeno como en la retracción del coágulo de las plaquetas Lgals1<sup>-/-</sup>, no asociada a un defecto en la expresión de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, indicó que la Gal-1 sería un mediador de la señalización 'outside-in' a través de esta integrina. Este estudio proporciona evidencias de un mecanismo no-canónico de activación plaquetaria y regulación de la hemostasia in vivo basado en la interacción galectina-integrina.

#### 003. (234) EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA COMO MEDIADOR DEL EFECTO PROLIFERATIVO DE PROGESTÁGENOS EN CÁNCER DE MAMA

Giulianelli S.<sup>1</sup>; Vaqué J.<sup>2</sup>; Wargon V.<sup>3</sup>; Soldati R.<sup>4</sup>; Vanzulli S.<sup>5</sup>; Martins R.<sup>6</sup>; Zeitlin E.<sup>7</sup>; Helguero L.<sup>8</sup>; Lamb C.<sup>9</sup>; Molinolo A.<sup>10</sup>; Gutkind S.<sup>11</sup>; Lanari C.<sup>12</sup> *IBYME<sup>1,3,4,8,9,12</sup>; OPCB-NIH, USA<sup>2,11</sup>; Academia Nacional de Medicina<sup>5</sup>; Policlínica Bancario<sup>6,7</sup> sebastian.giulianelli@gmail.com*

En carcinomas mamarios murinos C4-HD y en células humanas T47D hemos observado que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la activación del receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ) y su asociación nuclear con el receptor de progesterona (RP). El bloqueo del RE $\alpha$  inhibe la proliferación celular mediada por el progestágeno. Postulamos que dicha interacción a nivel genómico sería fundamental para desarrollar respuestas proliferativas mediadas por MPA. Nuestro objetivo fue estudiar in vivo la acción del antiestrógeno puro ICI 182.780 (ICI) sobre el crecimiento de tumores C4-HD estimulados con MPA, los mecanismos moleculares involucrados en la interacción de ambos receptores en células humanas y evaluar dicha interacción en 15 muestras de cáncer de mama humano. ICI (5mg/semana) indujo la regresión completa de tumores C4-HD creciendo con MPA. A las 48 hs de tratamiento, observamos una disminución en marcadores de proliferación: índice mitótico, Ki67, Ciclina D1 (CCND1) y MYC (p<0.001). Además, se observó un aumento de apoptosis (p<0.001) asociado a una disminución en BCL/XL y aumento en BAX y AIF. Se estudió la interacción entre RE $\alpha$  y RP en promotores de dos genes regulados por MPA, CCND1 y MYC, en células T47D. MPA (10nM) indujo la expresión temprana

de CCND1 y MYC (PCR cuantitativa;  $p < 0.001$ ). El bloqueo del RE $\alpha$  por ICI o siRNA, inhibió la transcripción de ambos genes por MPA ( $p < 0.001$ ). En ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se corroboró la unión de RP y RE $\alpha$  a los mismos sitios en los promotores de CCND1 y MYC inducido por MPA. El tratamiento con ICI no afectó la unión de RP a ambas secuencias regulatorias pero sí inhibió la unión del RE $\alpha$ . Confirmamos la colocalización nuclear entre RE $\alpha$  y RP por microscopía confocal en 4 muestras de cáncer de mama humano. Los resultados demuestran que la presencia del RE $\alpha$ , interactuando con el RP, en promotores de CCND1 y MYC es fundamental para la transcripción génica y la proliferación celular inducida por MPA.

**004. (378) LA FOSFORILACIÓN DE ZEB1 MEDIADA POR MEK/ERK REGULA SU FUNCIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR**

Lorenzatti G.<sup>1</sup>; Cavallo N.<sup>2</sup>; Darling D.<sup>3</sup>; Cabanillas A.<sup>4</sup>  
 CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica,  
 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de  
 Córdoba<sup>1,2,4</sup>; Oral Health and Systemic Disease, University  
 of Louisville, KY, USA<sup>3</sup>  
 glorenzatti@fcq.unc.edu.ar

ZEB1 interviene en diferenciación mesodérmica y EMT en cáncer. Es regulado a distintos niveles y la expresión de isoformas fosforiladas podría representar un mecanismo novel. Nuestro objetivo fue identificar los sitios de fosforilación en ZEB1 y su rol fisiológico. ZEB1 hipoPO4 se une y reprime más a genes blanco (EMSA y genes reporteros). Identificamos fosfositos en dominio ZD2 por mutagénesis sitio-dirigida (S/T por A). ZD2 nativa (wt) y el set de mutantes mZD2-2A/B/C redujeron igualmente la actividad luciferasa de promotores (E-cadherina, ZEB1); el set mZD2-1A/B indujo mayor represión ya que se comportarían como mejores "represores" (respecto a wtZD2) al poseer fosfositos silenciados e inducir una unión más fuerte a los promotores y mayor efecto transcripcional. EMSAs concordaron con estos resultados. Señales involucradas: la inhibición de PKC (CaIc) (revertida por PMA/IONO), PI3K (LY294002) y MEK/ERK (PD98059) aumentó la unión de ZEB1 a promotores. En transfecciones PMA/IONO e IGF-1 revirtieron el efecto represor de wtZD2 y de mZD2-2, pero no el de mZD2-1. PD98059 aumentó la represión del promotor de E-cadherina inducida por wtZD2 y mZD2-2; consistentemente, mZD2-1 no respondieron a este inhibidor sugiriendo que MEK/ERK activadas por IGF-1 regularían el rol biológico de ZEB1. Inmunoprecipitación con anti-fosfo-(Thr)MAPK reveló que ZEB1 es fosforilado por MAPK en T867 del set mZD2-1 (PD98059 disminuyó esta señal). El uso de clones GFP-ZEB1 y microscopía confocal mostró que la fosforilación por MEK/ERK inducida por IGF-1 cambió ZEB1 del núcleo al citosol, mientras que PMA/IONO dio una señal citosólica débil. En síntesis, ZEB1 es regulada por fosforilación vía IGF-1/MEK-ERK (modifica localización nuclear) y de otras vías como PKC. TGF $\beta$  regula la actividad transcripcional de ZEB1 oponiéndose a IGF-1. Estos resultados sugerirían que ZEB1 sería el sitio de convergencia de señales de signo opuesto para la regulación fina del programa EMT para la invasión tumoral.

**005. (505) EFECTO PROLIFERATIVO DE LA TRANSFERRINA SOBRE CÉLULAS PROGENITORAS NEURALES Y SOBRE LA LÍNEA CELULAR DE OLIGODENDROCITOS N20.1**

Silvestroff L.<sup>1</sup>; Franco P.<sup>2</sup>; Pasquini J.<sup>3</sup>  
 IQUIFIB; UBA; CONICET<sup>1,2,3</sup>  
 lsilver81@yahoo.com.ar

La transferrina (Tf) es la principal glicoproteína transportadora de hierro en plasma. En el sistema nervioso central (SNC), la Tf tiene efectos distintivos promoviendo la maduración de células del linaje oligodendroglial. Estudios previos demostraron que la Tf tiene un efecto dual sobre las células progenitoras neurales (CPNs) de ratas adultas derivadas de la zona subventricular (ZSV); promoviendo su proliferación y acelerando la maduración de precursores oligodendrogliales. Decidimos evaluar los efectos proliferativos

de la transferrina sobre cultivos primarios de la ZSV de ratas neonatales. Nuestra hipótesis supone que en estos cultivos la Tf aumenta proporción de precursores oligodendrogliales proliferantes durante estadios inmaduros. Utilizamos cultivos primarios de la ZSV de ratas de dos a cuatro días de edad para expandir las CPNs bajo la forma de agregados celulares esféricos llamados neuroesferas (NE). El tratamiento con apoTf produjo un aumento significativo en el tamaño de las NE respecto de cultivos control, que se correlacionó con un incremento en la tasa proliferativa de las células que conforman las NE. Este efecto proliferante de la Tf fue confirmado utilizando una línea celular de oligodendrocitos inmaduros N20.1. El agregado de apoTf al medio de cultivo, así como la sobreexpresión de Tf produjeron un aumento en la proliferación de esta línea celular. Demostramos que tanto los cultivos primarios como la línea celular N20.1 expresan receptores funcionales para Tf, que son capaces de incorporar la Tf del medio de cultivo. En este trabajo demostramos que la Tf tiene un efecto proliferante en cultivos primarios de CPN de la ZSV de ratas neonatales y sobre la línea celular oligodendroglial N20.1.

**006. (579) LA REGENERACIÓN AXONAL MEDIADA POR LA INTERACCIÓN ENTRE LA INMUNOFILINA FKBP52 Y EL FÁRMACO INMUNOSUPRESOR FK506 RECAPITULA LOS PROCESOS DE LA NEURODIFERENCIACIÓN PRIMIGENIA**

Quintá H.<sup>1</sup>; Galigniana M.<sup>2</sup>  
 Fundación Instituto Leloir<sup>1</sup>; Departamento de Química  
 Biológica, FCEN, UBA<sup>2</sup>  
 hquinta@leloir.org.ar

El macrólido FK506 se une a proteínas intracelulares llamadas inmunofilinas (IMMs). Algunas IMMs como FKBP52 forman complejos con las chaperonas de receptores esteroidales. FKBP52 es muy abundante en el sistema nervioso, pero su función es desconocida. Previamente reportamos que FK506 induce la diferenciación de células estirpe neuronal. Aquí investigamos si FKBP52 es responsable del efecto neurotrófico. FK506 diferenció tanto a células N2a (neuroblastoma) como a células hipocampales embrionarias. El fenotipo neuronal se acompañó de la inducción de  $\beta$ III-tubulina, Map2 y Tau1, así como de las chaperonas Hsp90, Hsp70, p23 y FKBP52. Curiosamente, Hsp90, p23 y FKBP52 forman un anillo perinuclear que se redistribuyó al citoplasma y los terminales axonales con FK506. Las áreas perinucleares que ocupaban adquirirían alta actividad transcripcional. Al sobreexpresar FKBP52, las neuritas fueron ~50% más largas que en células control, y su knock-down inhibió la diferenciación y la formación de estructuras perinucleares. Para evaluar la neuroregeneración, se seccionaron mecánicamente los axones. Las chaperonas se concentraron en áreas perinucleares tal como se ve en células indiferenciadas, y con FK506 regeneraron sus axones (positivos para sinapsina-1), sugiriendo que estas neuronas recapitulaban el fenómeno de diferenciación durante la neuroregeneración. En línea con ello, observamos transdiferenciación de células gliales (GFAP+) en neuronas ( $\beta$ III-tubulina+), hipótesis basada en que ambos tipos celulares comparten un precursor común (nestina+). La sobreexpresión de FKBP52 en astrocitos los transformó en células radiales sin necesidad de agregar FK506, mientras que FK506 aceleró el proceso. El knock-down de FKBP52 inhibió la transdiferenciación mediada por FK506. Proponemos que FKBP52 modula la expresión génica durante la neurodiferenciación y la neuroregeneración, siendo su ligando FK506 un candidato terapéutico para casos de daños nerviosos.

**PREMIO MONTUORI – GADOR**

**007. (89) FUNCIONES REDUNDANTES Y ANTAGÓNICAS DE GALECTINA-1, -3 AND -8 EN LA INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA CELULAR T.**

Tribulatti M.<sup>1</sup>; Figini M.<sup>2</sup>; Carabelli J.<sup>3</sup>; Cattaneo V.<sup>4</sup>; Campetella O.<sup>5</sup>  
 Instituto de Investigaciones Biotecnológicas<sup>1,2,3,4,5</sup>  
 virginiatribu@gmail.com

Las Galectinas (Gals) conforman una familia de lectinas de mamíferos, las cuales han emergido como reguladores claves de la respuesta inmune. Hemos demostrado previamente que galectina-8 (Gal-8), del subgrupo tandem-repeat, ejerce dos efectos definidos sobre células T CD4 naïve: por un lado induce coestimulación antígeno-específica y por otro, proliferación antígeno-independiente. Notablemente, estas señales estimuladoras sobre células T naïve no han sido descritas para ninguna otra galectina hasta el momento. Por lo tanto, en el presente trabajo nos propusimos investigar si Gal-1 y Gal-3, dos miembros prominentes de la familia de Gals, comparten los efectos estimuladores ejercidos por Gal-8 sobre células T naïve. Encontramos que Gal-1 coestimuló la respuesta T antígeno-específica de forma similar a Gal-8, en el modelo murino transgénico DO11.10 TCROVA. Observamos que las actividades de Lck, PKC, PI3K, p38, ERK y CD45 PTPasa estaban involucradas en la señalización intracelular inducida tanto por Gal-1 como Gal-8. En contraste, Gal-3 no coestimuló la respuesta T antígeno-específica y, más aún, antagonizó las señales de Gal-1 y Gal-8. En cuanto a la proliferación antígeno-independiente, observamos que tanto Gal-1 como Gal-3 fueron incapaces de inducir este efecto, sin embargo, cuando fusionamos covalentemente dos moléculas de Gal-1, la proteína quimérica resultante promovió efectivamente la proliferación. Este resultado indica que Gal-1 podría inducir la proliferación y a su vez, remarca el requisito de la estructura de tandem-repeat. Notablemente, una dosis única de Gal-1 o Gal-8 recombinante administrada junto con una dosis subóptima de antígeno a ratones DO11.10, coestimuló respuestas débiles in vivo. En conjunto, estos resultados apoyan la participación de las Gals en el inicio de la respuesta inmune y permiten postular a estas lectinas como potenciadores de respuestas antigénicas subóptimas, representando así potenciales adyuvantes para vacunas.

**008. (162) ESTRATEGIAS INMUNOLÓGICAS EN CÁNCER: RESTAURACIÓN DEL FENOTIPO Y FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK EN EL CÁNCER DE MAMA**

Roberti M.<sup>1</sup>; Rocca Y.<sup>2</sup>; Amat M.<sup>3</sup>; Pampena M.<sup>4</sup>; Loza J.<sup>5</sup>; Coló F.<sup>6</sup>; Fabiano V.<sup>7</sup>; Loza C.<sup>8</sup>; Nervo A.<sup>9</sup>; Arriaga J.<sup>10</sup>; Bianchini M.<sup>11</sup>; Bravo A.<sup>12</sup>; Barrio M.<sup>13</sup>; Chacón R.<sup>14</sup>; Mordoh J.<sup>15</sup>; Levy E.<sup>16</sup>

*Centro de Investigaciones Oncológicas - Fundación Cáncer FUCA<sup>1 2 4 10 11 13 16</sup>; Instituto Médico Especializado Alexander Fleming<sup>3 5 6 7 8 9 14</sup>; HIGA San Martín<sup>12</sup>; IIBBA CONICET - Fundación Instituto Leloir<sup>15</sup> paularoberti@conicet.gov.ar*

Pese a los avances en el tratamiento del cáncer de mama (CM), aún existen muchos pacientes que no se encuentran beneficiados con terapias específicas y efectivas. Tal es el caso de aquellos que presentan cáncer de mama triple negativo (CMTN). Este fenotipo representa el 15% de los tumores de CM, se caracteriza por expresar EGFR, y está asociado a mayor progresión y mal pronóstico pese a su tratamiento con quimioterapia convencional. El sistema inmune (SI) juega un rol importante en el control del cáncer. Dentro de la inmunidad innata, las células natural killer (NK) son reconocidas por ejercer funciones antitumorales. En este estudio realizamos la caracterización fenotípica y funcional de NK en pacientes con CM. Mediante un agrupamiento jerárquico no supervisado de receptores (Rc) activadores e inhibitorios estudiados por citometría de flujo, se reveló un fenotipo alterado en los NK del sitio tumoral ( $p < 0,05$ ) y no en los del estroma mamario no neoplásico o en sangre periférica. Identificamos factores inmunosupresores secretados por células tumorales, tanto en líneas in vitro, como en las muestras de los pacientes ex vivo, tales como el TGF- $\beta$ . Los NK de sangre periférica de pacientes tuvieron la misma capacidad lítica mediada por anticuerpo que los donantes sanos ( $p > 0,05$ ). En cocultivos in vitro con células tumorales, pudimos modular los Rc de NK de donantes sanos y emular a los del tumor. Estos NK presentaron menor capacidad efectora -menor respuesta de degranulación- frente a diversos blancos tumorales ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, fue posible revertir esta disfunción y generar una respuesta efectora con el uso del anticuerpo Cetuximab (anti-EGFR) y citoquinas estimuladoras IL-2 e IL-15 frente a

células de CMTN ( $p < 0,01$ ). Estos resultados abren la posibilidad de ensayar una combinación de Cetuximab con moduladores de la respuesta inmune como un abordaje terapéutico atractivo para aumentar la eficacia clínica del Cetuximab en CMTN.

**PREMIO EDUARDO SOTO**

**09. (300) AXONOPATÍA DISTAL TEMPRANA DE LA VÍA VISUAL EN LA DIABETES EXPERIMENTAL: EFECTO TERAPÉUTICO DE LA INDUCCIÓN DE TOLERANCIA ISQUÉMICA**

Fernandez D.<sup>1</sup>; Pasquini L.<sup>2</sup>; Dorfman D.<sup>3</sup>; Aldana Marcos H.<sup>4</sup>; Rosenstein R.<sup>5</sup>

*Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 3 5</sup>; Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>2</sup>; Laboratorio de histología, Universidad de Morón<sup>4</sup> diegofil@yahoo.com.ar*

La retinopatía diabética (RD) es una de las principales causas de ceguera. Uno de los mecanismos etiopatogénicos clave de la enfermedad es la isquemia. Actualmente no se dispone de estrategias terapéuticas eficaces para evitar la progresión de la RD. Se ha demostrado la efectividad de la inducción de tolerancia isquémica para reducir el daño isquémico retiniano agudo. El primer objetivo de este trabajo fue evaluar las alteraciones morfológicas de la vía visual diabética y el segundo objetivo fue evaluar el efecto de la inducción de tolerancia isquémica como estrategia frente a las alteraciones morfológicas de la vía visual diabética. La diabetes experimental se indujo en ratas Wistar macho adultos mediante una única inyección de estreptozotocina (60 mg/kg). El grupo control fue inyectado con vehículo. Se evaluó la vía retino-colicular y las alteraciones morfológicas en la región proximal y distal del nervio óptico (NO). En un grupo de animales, luego de tres días de confirmada la hiperglucemia ( $> 350$ mg/dl), se inició la aplicación de pulsos semanales de isquemia (por aumento de la presión intraocular a 120 mmHg por 5 min) en un ojo, y un tratamiento simulado en el ojo contralateral. Luego de 6 semanas de inducción de diabetes, se observó un déficit marcado en el transporte anterógrado (evaluado a través de la inyección intravítrea de toxina colérica) y alteraciones axo-gliales (aumento en la reactividad glial, disminución significativa en el número de axones ( $p < 0,01$ ) y alteraciones en la compactación de la mielina de las fibras de mayor calibre) exclusivamente en la porción distal del NO. La aplicación de pulsos semanales de isquemia retiniana previno estas alteraciones. Estos resultados demuestran que las alteraciones axo-gliales observadas en la porción distal del NO podrían constituir el primer cambio estructural en la vía visual diabética. Además, la inducción de tolerancia isquémica podría ser una estrategia terapéutica para la RD.

**PREMIO SAFIS**

**010. (47) MODULACIÓN DE SISTEMAS DE BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN DE DROGAS POR BENZINIDAZOL (BZL) EN CÉLULAS HEPG2. ROL DEL RECEPTOR NUCLEAR DE PREGNANOS X (PXR)**

Rigalli J.<sup>1</sup>; Perdomo V.<sup>2</sup>; Luquita M.<sup>3</sup>; Villanueva S.<sup>4</sup>; Mottino A.<sup>5</sup>; Ruiz M.<sup>6</sup>; Catania V.<sup>7</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup> jprigalli@gmail.com*

En la depuración hepática de fármacos intervienen sistemas enzimáticos de biotransformación (CYP450, UGT, GST) y proteínas de excreción (P-gp, MRP2) regulados coordinadamente, siendo PXR un mediador clave. La modificación de la función de estos sistemas por el antichagásico BZL podría afectar la biodisponibilidad y acción terapéutica de drogas coadministradas, incluso la del propio BZL, transportado parcialmente por P-gp. El objetivo fue evaluar el efecto de BZL sobre la expresión y actividad

de enzimas de biotransformación y transportadores apicales y la mediación de PXR en la línea celular humana HepG2, que retiene propiedades de los hepatocitos. Las células fueron expuestas a BZL (2; 20 y 200 µM, 48h). Se determinó el contenido proteico de CYP3A, UGT1A, GST (alfa, mu y pi), P-gp y MRP2 por inmuno-cuantificación. Se observó inducción a 200 µM en P-gp (+60%), MRP2 (+75%) y GSTpi (+75%) ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). Se detectó además un aumento significativo en la actividad de GST, P-gp y MRP2 por conjugación, acumulación y flujo de un sustrato modelo respectivamente ( $p < 0,05$ ;  $n = 3$ ). La inducción tiene correlato en el ARNm (por Real Time PCR,  $p < 0,05$ ,  $n = 5-7$ ) para P-gp (+232%), MRP2 (+137%) y GSTpi (+78%) sugiriendo un mecanismo transcripcional. Para evaluar el rol de PXR, se disminuyó su expresión mediante un ARN de interferencia (células PXR-), modelo en el cual se logra una disminución del 75% en la expresión del receptor nuclear respecto a su expresión en células transfectadas con un siRNA control no silenciante (células PXR+). Se observó prevención de la inducción de GSTpi, P-gp y MRP2 por BZL en las células PXR-, confirmando la mediación de este receptor nuclear y asociándose por primera vez al BZL como activador del mismo. Los resultados indican que el tratamiento con BZL podría desencadenar interacciones droga-droga que demandarían especial atención en el diseño de las estrategias terapéuticas.

**011. (229) PARTICIPACIÓN DE MOLÉCULAS LIPÍDICAS EN EL PROCESO DE IMPLANTACIÓN: EFECTO DEL ÁCIDO LISOFOSFATÍDICO SOBRE LAS PROSTAGLANDINAS. ROL DE LOS ENDOCANNABINOIDES.**

Sordelli M.<sup>1</sup>; Beltrame J.<sup>2</sup>; Cella M.<sup>3</sup>; Franchi A.<sup>4</sup>; Ribeiro M.<sup>5</sup> Laboratorio de Fisiología y Farmacología de la Reproducción, CEFYBO (CONICET-Fac. de Medicina, UBA)<sup>1 2</sup>  
<sup>5</sup>; Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto, CEFYBO (CONICET-Fac. de Medicina, UBA)<sup>3 5</sup>  
 micaelasordelli@yahoo.com.ar

El ácido lisofosfatídico (LPA), un lípido biológicamente activo, modula algunas funciones reproductivas. Ratones knock out para LPA3, uno de los receptores de LPA, presentan aberraciones en el proceso de implantación. La expresión de LPA3 está disminuida en el endometrio de mujeres con fallas implantatorias múltiples. Entre las moléculas que median la invasión del embrión se encuentran las prostaglandinas (PGs) y los endocannabinoides (ECB). Las ciclooxigenasas (COX-1 y 2) y la PGE2 promueven la vascularización y la decidualización, mientras que niveles elevados de ECB correlacionan con fallas implantatorias. Nuestro objetivo fue investigar el efecto del LPA sobre el proceso de implantación y estudiar si modula la producción de moléculas lipídicas relevantes en este proceso, como las PGs y los ECB. Para ello, en primer lugar, el útero proveniente de hembras Wistar en día 5 de preñez se incubó con LPA (10, 20 y 50 µM) por 3, 6 y 12 hs. Bajo las condiciones de nuestro bioterio la implantación ocurre en el día 5 de preñez. La incubación por 6 hs con LPA 50 µM aumentó la expresión ( $p < 0,01$ ) y la actividad de la FAAH ( $p < 0,05$ ), la principal enzima que regula el metabolismo de los ECB. Este efecto está mediado por los receptores LPA3. Por otro lado, el LPA, también a través de los receptores LPA3, incrementó la expresión de la COX-2 ( $p < 0,01$ ) y la producción de PGE2 ( $p < 0,001$ ). Observamos que en el efecto del LPA sobre la PGE2 y la COX-2 participan los receptores de ECB. Por último, estudiamos el rol del LPA en el proceso de implantación en un modelo in vivo. Para ello, administramos un antagonista selectivo del LPA3 (DGPP: 0,08 mg/kg, intra-uterino) en el día 5 de preñez. La administración de DGPP provocó aberraciones en el espaciado de los embriones, reabsorción embrionaria y una disminución en el peso de las unidades fetoplacentarias ( $p < 0,001$ ). Estos resultados sugieren que el LPA sería un potente mediador lipídico que favorece la implantación del embrión.

**PREMIO MARIA CRISTINA CAMILIÓN DE HURTADO**

**012. (439) MASA VENTRICULAR IZQUIERDA Y RIGIDEZ ARTERIAL EN JOVENES PREHIPERTENSOS**

Broda D.<sup>1</sup>; Salazar G.<sup>2</sup>; Massarutti C.<sup>3</sup>; Nomberto Gómez V.<sup>4</sup>; Pinilla O.<sup>5</sup>; Ennis I.<sup>6</sup>; Escudero E.<sup>7</sup>  
 Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
 oapinilla@gmail.com

El término pre-hipertensión (PH) fue introducido por el JNC VII y fue definida como presiones sistólica de 120 a 139 mmHg y diastólica de 80 a 89 mmHg. Los fundamentos para generar esta nueva categoría surgieron a partir de observaciones epidemiológicas en poblaciones adultas que indicaron mayor riesgo cardiovascular con presiones superiores a 110 mmHg. El presente estudio fue diseñado para analizar la prevalencia de PH y el impacto sobre la masa ventricular izquierda (MVI) y la rigidez arterial en 778 alumnos de la Facultad de Ciencias Médicas con edades entre 18 y 24 años (62% mujeres) sin evidencias de cardiopatía. Se registró la presión arterial (PA) de acuerdo al JNC VII y se realizó ecocardiograma para obtener datos de estructura, función ventricular izquierda y rigidez arterial en todos los casos. 326/778 (41.9%) de los alumnos fueron PH, siendo mayor la prevalencia en los hombres (63% vs 28%  $p < 0,01$ ). El índice de MVI, obtenido de dividir la MVI por altura elevada a 2.7, fue mayor en los PH, respecto a los normotensos (N) (N: 28.4±0.3 g/m<sup>2.7</sup>; PH: 30.6±0.4 g/m<sup>2.7</sup>  $p < 0,01$ ). La relación entre velocidad diastólica del anillo mitral temprana (E) y tardía (A) como expresión de función diastólica fue menor en PH (N: 2.18±0.03; PH: 2.08±0.04  $p < 0,05$ ), mientras que los parámetros de evaluación de la función sistólica no mostraron diferencias. La relación entre la presión de pulso y el índice de volumen latido utilizado para evaluar la rigidez arterial resultó mayor en los PH (N: 1.14±0.01 mmHg/cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>; PH: 1.28±0.02 mmHg/cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>  $p < 0,01$ ). Estos resultados permiten concluir que la PH presenta una elevada prevalencia en la población joven estudiada y que su presencia se asocia con aumento de la MVI, probable compromiso de la relajación y mayor rigidez arterial. Considerando que estas alteraciones se asocian con aumento del riesgo cardiovascular, surge la importancia de identificar a este grupo de individuos a edad temprana para establecer conductas preventivas precoces.

**013. (496) SOBRE EXPRESIÓN DEL INTERCAMBIADOR NACA (NCX) Y APOPTOSIS: DOS ALTERACIONES PRECOSES EN LA EVOLUCIÓN DE LA HIPERTROFIA HACIA LA INSUFICIENCIA CARDÍACA (IC).**

Rodríguez J.<sup>1</sup>; Velez Rueda J.<sup>2</sup>; Becerra R.<sup>3</sup>; Palomeque J.<sup>4</sup>; Rinaldi G.<sup>5</sup>; Mundiña-Weilenmann C.<sup>6</sup>; Vittone L.<sup>7</sup>; Salas M.<sup>8</sup>; Mattiazzi A.<sup>9</sup>  
 Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
 jescasr@yahoo.com.ar

La IC cursa con alteraciones en el calcio intracelular (Ca) y las proteínas que lo manejan. Dos características comunes a distintos modelos de IC son la disminución de SERCA o bomba de Ca del retículo sarcoplásmico (SR) y el aumento del NCX, que normalmente extruye Ca del miocito. Ambas contribuirían a disminuir la contractilidad en la IC. Se desconoce la secuencia temporal y las causas que determinan estas alteraciones. Estudiamos el Ca y diferentes proteínas que lo regulan en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) [6 a 27 meses (m)] y sus controles normotensos (CN), a fin de detectar la aparición de alteraciones en la evolución de las SHR hacia la IC. Resultados: A. Las SHR presentan IC a los 21-27m; B. A los 6 y 9m hay un mayor transitorio de Ca (TCa) y contenido de Ca del RS no asociado a mayor acortamiento celular, evidenciando menor respuesta al Ca de las proteínas contráctiles. C. Los 15m marcan un punto de inflexión en la evolución a la IC: Se detecta sobre expresión del NCX (66.7±16.3% respecto a CN,  $P < 0,05$ ) asociada a mayor velocidad de caída del TCa por cafeína (t1/2: 1.37±0.19 y 2.78±0.28 s, SHR vs CN,  $P < 0,05$ ), reflejo funcional de dicha sobre expresión. Este aumento, que implica una pérdida de Ca de la célula, se asocia a menor amplitud del TCa respecto a los 9m y a ausencia de sobrecarga de Ca del RS. La apoptosis, presente desde los 6m, se hace altamente significativa a los 15m (relación entre la proteína proapoptótica Bax y antiapoptótica Bcl2 respecto a CN: 0.81±0.17 vs 0.21±0.01).

D. La expresión de SERCA disminuye significativamente un 53.4±4.4% respecto a CN a partir de los 21m. Conclusiones: 1. La sobre expresión del NCX ocurre tempranamente sin signos de IC. Esto podría deberse al aumento de Ca producto de la menor respuesta de las proteínas al mismo. 2. La disminución de SERCA se asocia a IC manifiesta. 3. Otras alteraciones precoces en la evolución hacia la IC, como la apoptosis, podrían contribuir al advenimiento de la misma.

**014. (502) LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDE (RM) ES CLAVE PARA EL DESARROLLO DE LA SEGUNDA FASE DE FUERZA (SFF) POST-ESTIRAMIENTO DEL MIOCARDIO**

Díaz R.<sup>1</sup>; Caldiz C.<sup>2</sup>; Nolly M.<sup>3</sup>; Chiappe De Cingolani G.<sup>4</sup>; Ennis I.<sup>5</sup>; Cingolani H.<sup>6</sup>; Pérez N.<sup>7</sup>

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*

*gisel\_laplata@yahoo.com.ar*

El estiramiento miocárdico aumenta la fuerza en 2 fases, una rápida inicial y una lenta o SFF. El aumento de especies reactivas del oxígeno (EROs) por activación de receptores AT1 de angiotensina II (All), ETA de endotelina (ET) y la transactivación (TSA) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE) es clave en el desarrollo de la SFF. Dado que se ha sugerido que el AT1 activa al RM y que éste transactiva al RFCE, quisimos probar si el RM participa en el desarrollo de la SFF en rata. Medimos EROs por quimioluminiscencia en tiritas de ventrículo y SFF en músculos papilares. All 1nM aumentó EROs (51±3% del basal, n=8), efecto que fue cancelado bloqueando RM [epplerenona (Ep) 6±8%, n=4], AT1 (losartan, n=5), ETA (BQ123, n=5) o RFCE (AG1478, n=5), por inhibición de NADPHoxidasas (apocinina, n=7) y por bloqueo de EROs mitocondriales (rotenona, n=3), pero no por bloqueo de receptores de glucocorticoides (RU486, 40±2%, n=5). Un aumento similar de EROs por ET-1 1nM (83±9% del basal, n=13) fue cancelado por las mismas intervenciones excepto losartan confirmando que ETA está después de AT1. Un aumento equivalente de EROs por aldosterona 10nmol/L (ALD, 65±9% del basal, n=5) fue cancelado por Ep (4±5%, n=4) y AG1478 (n=6), pero no por RU-486 (57±6%, n=6) o inhibición de síntesis proteica (cicloheximida, 71±9%, n=9), sugiriendo efectos no genómicos de RM. ALD aumentó la fosforilación de las kinasas ERK1/2 y p90RSK (167±12 y 156±18% del control, n=8) y del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE1, 148±15% del control, n=5) efectos que se cancelaron con Ep (n=6, 6 y 4) o inhibiendo TSA del RFCE (n=4). Por último, la SFF (119±4% de la fase rápida, n=7) fue cancelada por Ep (98±2%, n=5), AG1478 (n=6) o eliminando EROs (MPG, n=5), pero no por RU-486 (22±3%, n=5) o cicloheximida (19±3%, n=5). Los resultados muestran por primera vez que la activación de RM es clave para la activación EROs-sensible de ERK1/2-p90RSK, lo cual conduce al aumento de la actividad del NHE1 y el consecuente desarrollo de la SFF.

## ONCOLOGÍA 1

**015. (9) LA TRANSFERENCIA DEL GEN IFN-B TIENE UN FUERTE EFECTO ANTITUMORAL POTENCIADO POR EL EFECTO BYSTANDER.**

Rossi U.<sup>1</sup>; Villaverde M.<sup>2</sup>; Gil Cardeza M.<sup>3</sup>; Glikin G.<sup>4</sup>; Finocchiaro L.<sup>5</sup>

*Unidad de Transferencia Genética, Área de Investigación, Instituto de Oncología Angel Roffo<sup>1 2 3 4 5</sup>*

*uchiursis@hotmail.com*

Se denomina efecto bystander al fenómeno que extiende la citotoxicidad provocada por una terapia a las células del entorno que no fueron alcanzadas por dicha terapia. La lipofección con el gen IFN-B en células derivadas de melanoma canino (Ak, Bk, Ch) produce un fuerte efecto citotóxico ( $p \leq 0.001$ ). Teniendo en cuenta las bajas eficiencias de lipofección resulta evidente que la muerte celular inducida por el gen cIFN-B no se restringe a las células que lo expresan. Para comprobar la existencia de

efecto bystander en nuestro sistema, se realizaron cultivos bi- y tri-dimensionales de diferentes diluciones de células lipofectadas con cIFN-B en cantidades crecientes de células lipofectadas con B-galactosidasa (B-gal), y se determinó si el efecto observado sobre la proliferación celular resultó ser igual o menor al efecto esperado por dilución. Por otro lado, se evaluó la capacidad del medio condicionado (MC) obtenido 24 h post-lipofección de causar citotoxicidad en células no lipofectadas. La viabilidad celular se determinó utilizando el método de la fosfatasa ácida. En Ak y Ch se observaron valores menores a los esperados en todas las diluciones, tanto en cultivos bi- como tri-dimensionales ( $p \leq 0.05$ ); aún cuando se diluyó al 10% se conservó un gran efecto citotóxico ( $p \leq 0.001$ ). En Bk el efecto de la dilución resultó bastante similar a lo esperado. En las tres líneas evaluadas el MC resultó altamente citotóxico ( $p \leq 0.001$ ). El factor citotóxico presente en el MC demostró ser termo-lábil ya que al precalentar el MC por 30 m a 72°C se perdió por completo el efecto citotóxico. Estos resultados mostraron un gran efecto bystander en las tres líneas estudiadas. Este efecto fue probablemente producido por la liberación al medio de cIFN-B y quizás otros factores. Este efecto constituye una condición sine qua non para la propuesta de la lipofección del gen cIFN-B como una posible terapia génica, dado que in vivo no es posible llegar al 100 % de las células tumorales.

**016. (182) FACTORES LIMITANTES EN LA INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR POR TERAPIA FOTODINÁMICA CON ALA EN CULTIVOS BI Y TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN.**

Teijo J.<sup>1</sup>; Diez B.<sup>2</sup>; Meiss R.<sup>3</sup>; Batlle A.<sup>4</sup>; Fukuda H.<sup>5</sup>

*Centro de Investigación sobre Porfirias y Porfirinas, CO-NICET, Dto de Qca. Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 4 5</sup>; Instituto de Estudios Oncológicos, Academia Nacional de Medicina<sup>3</sup> julieta\_Teijo@yahoo.com.ar*

Las propiedades fotoactivas de las porfirinas al ser irradiadas con luz de longitud de onda adecuada, y la alta selectividad de las células malignas en el metabolismo de las mismas a partir del ácido 5-aminolevulínico (ALA), conforman la base de la terapia fotodinámica (TFD) la cual genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen la muerte celular. El cultivo en esferoides multicelulares (EMCs) simula las condiciones de microtumores independientemente de la vasculatura, cuyo rol en la erradicación de tumores por TFD es controversial. El objetivo del trabajo fue establecer los factores involucrados en la mayor resistencia a la muerte celular por TFD en esferoides (DL50:10 min) de la línea A549 de adenocarcinoma de pulmón humano respecto del cultivo en monocapa (DL50 7 min). Sembrando 5x10<sup>4</sup> cél/ml sobre agar 3%-RPMI (1:1) se obtienen esferoides compactos de 100-700 µm luego de 7 días. Los EMCs se incubaron 3h con ALA 1mM y se irradiaron en un banco de 2 tubos fluorescentes. La síntesis de porfirinas no varió significativamente entre la monocapa (0,109±0,1 pg/cel) y los EMCs (0,09±0,1 pg/cel) y su distribución en los distintos planos del esferoide es uniforme, según se evidenció por microscopía confocal. Mediante cortes histológicos se analizó el grado de penetración de la luz en el interior de los EMCs observándose células apoptóticas y necróticas en las zonas internas de manera dosis lumínica dependiente (confirmado con Annexina V-FITC/ioduro de propidio) y vacuolas de secreción positivas para mucopolisacáridos indicativas de diferenciación, consistente con la naturaleza de adenocarcinoma de la línea; que se pierde luego de irradiar 10 y 20 min. La producción de oxígeno singulete, agente fundamental para el inicio del daño fotoquímico, es mucho menor en los EMCs (5,5±2,7%) que en la monocapa (83,5±1,9%), indicando que la disponibilidad de oxígeno en el interior del esferoide sería el factor que limita la efectividad de la TFD en una configuración tridimensional.

**017. (255) IDENTIFICACIÓN DE UNA POBLACIÓN STEM/PROGENITORA EN EL MODELO TUMORAL MAMARIO MURINO LM38-LP**

Campodónico P.<sup>1</sup>; Farias E.<sup>2</sup>; Berardi D.<sup>3</sup>; Díaz Bessone I.<sup>4</sup>; Urtreger A.<sup>5</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>6</sup>; Todaro L.<sup>7</sup>

*Instituto de Oncología Angel Roffo, Área de Investigación<sup>3 4 5 6 7</sup>; Mount Sinai School of Medicine<sup>2</sup>  
pcampod@yahoo.com*

Los retinoides son esenciales en la regulación del crecimiento y diferenciación celular. El árbol mamario está formado por dos tipos celulares principales: células luminales (LEP) y células mioepiteliales (MEP). Además, existen células stem que generalmente son insensibles a los tratamientos clásicos. Contamos con una línea celular tumoral (LM38-LP) que presenta similitudes con los tumores humanos triple negativo y posee componentes LEP y MEP. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de una subpoblación de células stem en la línea LM38-LP. Pudimos determinar la presencia de algunos marcadores de células stem/progenitora en las células LM38-LP: alta actividad ALDH1, CD133+, CD24. El tratamiento con retinoides disminuyó parcialmente el porcentaje de este tipo celular (FACS análisis). La línea LM38-LP demostró capacidad para formar mamosferas (incubación en suspensión con medio selectivo para células stem), las cuales modificaron su morfología frente al tratamiento con retinoides. Al disgregar las mamosferas y realizar una dilución clonal, observamos que a partir de una única célula se pudo regenerar la línea celular mixta LM38-LP, confirmando la existencia de una población de células stem. Por otro lado, se inocularon suspensiones monocelular de 100 células provenientes de mamosferas, en el fat pad mamario de ratones BALB/c y observamos que las mismas fueron capaces de formar un tumor con características histológicas similares al formado por células LM38-LP. Estos resultados sugieren que la línea celular tumoral LM38-LP presenta una sub-población de células stem heterogéneas frente al tratamiento con retinoides. Estos resultados en conjunto con el hecho de que la línea presente células LEP y MEP sugieren que la línea LM38-LP es un modelo sumamente interesante para el estudio y desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

**018. (275) EL SILENCIAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LAS ISOFORMAS  $\alpha$  Y  $\delta$  DE LA PROTEINA QUINASA C (PKC) POTENCIAN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO EJERCIDO POR RETINOIDES (ATRA) EN EL ADENOCARCINOMA MAMARIO MURINO LM38-LP.**

Berardi D.<sup>1</sup>; Campodónico P.<sup>2</sup>; Díaz Bessone M.<sup>3</sup>; Flumian C.<sup>4</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>5</sup>; Urtreger A.<sup>6</sup>; Todaro L.<sup>7</sup>

*Instituto de Oncología Ángel Roffo, Área de Investigación<sup>2 3 4 5 6 7</sup>*

*dami\_fceyn@hotmail.com*

Los retinoides ejercen algunos de sus efectos sobre la diferenciación celular y la reversión del fenotipo maligno a través de interacciones con distintas isoformas de PKC. Utilizamos como modelo la línea celular mamaria murina LM38-LP compuesta por células luminales (LEP) y mioepiteliales (MEP). En este trabajo nos propusimos analizar: 1) el efecto del tratamiento con ATRA en combinación con inhibidores de PKC sobre el crecimiento in vitro de la línea LM38-LP 2) la modulación del patrón de expresión de los receptores retinoides (RARs) por inhibición de PKCs y la modulación de la expresión de las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  de PKC por el tratamiento retinoide. Las monocapas fueron tratadas por 96hs con inhibidores de PKC: Gö6976 5uM (inhibidor de PKC $\alpha$ ) o Rottlerina 1uM (Inhibidor de PKC $\delta$ ) y en presencia de ATRA (1uM), observándose una disminución de la tasa de duplicación celular respecto del control (N° de celx105: Control 22±1.1; Gö6976 3.6±0.6; Rottlerina 9±0.1; ATRA 11±0.1; ATRA/Gö6976 2.3±0.03; ATRA/Rottlerina 6.7±1.3). Siendo la combinación ATRA/Gö6976 la más efectiva, cuya significancia se dio a partir de las 72 hs. El tratamiento retinoide en células LM38-LP aumenta sólo los niveles de RAR $\beta$ 2. Por RT-PCR determinamos que la inhibición de PKC $\alpha$  o  $\delta$  incrementa los niveles de RAR $\alpha$  y RAR $\beta$ 3 (este último involucrado en proliferación). La inhibición de PKC $\alpha$  o  $\delta$  combinada con ATRA genera un patrón de receptores retinoides compatible con la disminución de la proliferación y diferenciación (aumento de RAR $\beta$ 2 y disminución de RAR $\beta$ 3). En la línea LM38-LP el tratamiento por ATRA (24 hs) induce el aumento de la expresión de PKC $\delta$  y la disminución de PKC $\alpha$  (Western blot).

En su conjunto estos resultados sugieren que el tratamiento retinoide potencia el efecto citostático cuando ambas isoformas de PKC están inhibidas, no sólo porque conduce a una disminución del crecimiento sino porque este efecto está acompañado de la modulación negativa de RAR $\gamma$ .

**019. (282) LA PERMEABILIZACIÓN DE LA MEMBRANA LISOSOMAL ES UN EVENTO TEMPRANO EN EL EFECTO FOTOTÓXICO DE UNA FTALOCIANINA DE ZN(II) CATIONICA**

Marino J.<sup>1</sup>; García Vior M.<sup>2</sup>; Furmento V.<sup>3</sup>; Awruch J.<sup>4</sup>; Roguin L.<sup>5</sup>

*IQUIFIB, FFyB, UBA<sup>1 3 5</sup>; Departamento de Química Orgánica, FFyB, UBA<sup>2 4</sup>  
julietamarino@yahoo.com.ar*

Previamente demostramos que la ftalocianina de Zn(II) catiónica Pc13 es un fotosensibilizador que se localiza preferencialmente en lisosomas e induce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) que llevan a la muerte de células tumorales. En el presente trabajo evaluamos los mecanismos involucrados en la acción fototóxica de Pc13. En primer lugar, observamos que luego de irradiar las células KB (carcinoma orofaríngeo) se produce una permeabilización temprana de la membrana lisosomal y un incremento de  $3.0 \pm 0.1$  veces ( $p < 0.001$ ) en la liberación de cathepsina D al citosol (tiempo 0 post-irradiación, p.i.). Después de 1 h detectamos una disminución del potencial de membrana mitocondrial, y a las 3 h p.i. evidenciamos la liberación de citocromo-c al citosol ( $1.82 \pm 0.02$  veces,  $p < 0.0003$ ) y un aumento en la actividad de caspasa-3 ( $3.2 \pm 0.3$  veces,  $p < 0.001$ ). Estos hallazgos indican la activación de una vía apoptótica mitocondrial. También demostramos que tanto la permeabilización lisosomal como mitocondrial fueron revertidas mediante el empleo de antioxidantes (Trolox 5 mM y ácido ascórbico 10 mM). Asimismo, la incubación de las células con un inhibidor de cathepsina D (pepstatina A 40  $\mu$ M) produjo una disminución del  $48 \pm 4\%$  del efecto fototóxico de Pc13, sugiriendo que las proteasas lisosomales están involucradas en este proceso. Cuando evaluamos la participación de la vía extrínseca, no observamos cambios significativos en los niveles de expresión de los receptores de muerte Fas y DR5 y de sus respectivos ligandos FasL y TRAIL. En conclusión, nuestros resultados permiten proponer la secuencia temporal de eventos responsables del efecto fototóxico de la Pc13. En este sentido, demostramos que la producción de ROS produce la pérdida temprana de la permeabilidad lisosomal, la liberación de proteasas al citosol, la posterior disminución del potencial de membrana mitocondrial y la activación de la caspasa efectora-3.

**020. (295) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE RECEPTORES NUCLEARES POR PROTEÍNAS DEL GRUPO MAGE-A.**

Laiseica J.<sup>1</sup>; Mazaira G.<sup>2</sup>; Galigniana M.<sup>3</sup>; Monte M.<sup>4</sup>

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
julietta\_laiseica@yahoo.com.ar*

Las proteínas de la familia Mage-A poseen expresión específica tumoral y alta homología de secuencia. Esta característica ha hecho que se las considerara proteínas con funciones redundantes. Sin embargo, los estudios indican que la expresión de distintos genes Mage-A regulan la proliferación y la supervivencia de las células tumorales por diferentes mecanismos. La Dexametasona es un glucocorticoide que se utiliza en combinación con el paclitaxel en el tratamiento de tumores de próstata que no responden a terapia hormonal. 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. Por otro lado, el Receptor de Andrógenos (AR) media el crecimiento estimulado por hormonas y contribuye al crecimiento del cáncer de próstata. Ha sido reportado que Mage-A11 interactúa con AR y que aumenta su actividad transcripcional (Wilson EM. et al. 2009). Nosotros hemos observado que Mage-A6 inhibe la actividad transcripcional de GR inducida por Dexametasona.

Si bien hemos detectado la interacción de Mage-A6 con las desacetilasas de histona (HDACs) 1 y 3, no observamos lo mismo para HDAC6, una HDAC involucrada en la translocación de GR al núcleo. La expresión de Mage-A6 tampoco afectó la dinámica de traslocación de GR; esto indicaría que los efectos de Mage-A6 sobre la actividad de GR se encontrarían a nivel nuclear. Además, al comparar los resultados a los obtenidos utilizando AR, observamos que Mage-A6 no afecta por sí sola la actividad transcripcional de AR. Sin embargo, la expresión de Mage-A6 es capaz de potenciar el efecto activador de Mage-A11 sobre AR. Esto no se observa utilizando otros miembros del grupo, como Mage-A4. Nuestros resultados indican que la expresión de Mage-A6 podría modular selectivamente la actividad de dos receptores nucleares relacionados y de esta forma podría contribuir al desarrollo del cáncer de próstata.

- 021. (338) GALECTINA-1 PROMUEVE EL CRECIMIENTO Y METÁSTASIS DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO (HCC) E INHIBE SU ADHESIÓN AL ENDOTELIO**  
Manzi M.<sup>1</sup>; Croci D.<sup>2</sup>; Bacigalupo M.<sup>3</sup>; Espelt M.<sup>4</sup>; Elola M.<sup>5</sup>; Wolfenstein De Todel C.<sup>6</sup>; Rabinovich G.<sup>7</sup>; Troncoso M.<sup>8</sup>  
*IQUIFIB (UBA-Conicet), Departamento de Química Biológica, FFyB, UBA<sup>1 3 4 5 6 8</sup>; IBYME, Conicet<sup>7</sup>*  
*manzimalena@hotmail.com*

Galectina-1 (Gal-1) es una proteína con afinidad por  $\beta$ -galactósidos. En algunos tumores, como en el HCC, y en las células endoteliales asociadas al tumor, la sobre-expresión de Gal-1 se asocia con parámetros de agresividad, diseminación y angiogénesis tumoral. Previamente demostramos que Gal-1 favorece la adhesión de células de HCC, HepG2, a la matriz extracelular. Para estudiar si el nivel de expresión de Gal-1 modula la tasa de crecimiento de células de HCC, se utilizaron células HepG2 y HepG2-G2 (sobre-expresan Gal-1 en forma estable). Al cabo de 96 h, se observó un mayor número de células HepG2-G2 viables ( $225 \pm 30\%$   $p < 0.05$ , MTS) respecto al control (100%). Experimentos in vivo demostraron que células HepG2-G2 inyectadas en ratones nude, promovieron el crecimiento tumoral respecto de ratones inoculados con células HepG2 ( $0.61 \pm 0.06$  y  $0.18 \pm 0.08$  cm<sup>3</sup>,  $p < 0.01$ , respectivamente, 18 d), así como también el número de metástasis en nódulos drenantes al tumor ( $14 \pm 1$  y  $2 \pm 1$ ,  $p < 0.001$ , 8 semanas). Para evaluar la participación de Gal-1 en la relación entre las células de HCC y el endotelio, se utilizaron las células endoteliales sinusoidales, SK-HEP-1, derivadas de un adenocarcinoma hepático humano. Se observó una elevada expresión intracelular de Gal-1 en las células SK-HEP-1, como también una alta secreción al medio extracelular, mientras que no se detectó su presencia en las células BAEC (células endoteliales normales de aorta bovina) (Western blot). Mediante microscopía de fluorescencia se observó que la sobre-expresión de Gal-1, disminuye la adhesión de las células HepG2 a monocapas de células SK-HEP-1 ( $24 \pm 9\%$ ). Nuestros resultados, tanto in vitro como in vivo, confirman que el incremento del nivel de expresión de Gal-1 en las células del HCC, promueve el crecimiento tumoral y metástasis. Además, el endotelio asociado al tumor hepático presenta altos niveles de Gal-1. Finalmente, Gal-1 disminuiría la adhesión al endotelio, sugiriendo que participa en la invasión del HCC.

- 582. (260) EL PERFIL HORMONAL DE RATAS HIPOTIROIDEAS AUMENTA LA APOPTOSIS Y DISMINUYE EL DESARROLLO TUMORAL MAMARIO INDUCIDO POR DMBA**  
López Fontana C.1; Maselli M.2; Sasso C.3; Santiano F.4; Semino S.5; Zubiría M.6; Cuello Carrión F.7; Jahn G.8; Carón R.9.  
*Laboratorio de Hormonas y Biología del Cáncer, IMBECU, CONICET CCT-Mendoza1 2 3 4 5 9; IMBICE, CICPBA-CONICET La Plata6; Laboratorio de Oncología, IMBECU, CONICET CCT Mendoza7; Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CONICET- CCT Mendoza8*  
*clopezfontana@mendoza-conicet.gob.ar*

El cáncer mamario se caracteriza por el control hormonal de su crecimiento. Además, existe controversia sobre la relación

entre el hipotiroidismo y el desarrollo tumoral. Por ello estudiamos la influencia del perfil hormonal inducido por el hipotiroidismo sobre la carcinogénesis mamaria. Ratas hembras Sprague-Dawley fueron tratadas p.o. con una dosis de DMBA (15mg/rata) a los 55 días de edad y divididas en dos grupos: eutiroides (EUT, n=24) e hipotiroides (HIPO, 0.01% PTU en el agua de beber, n=27). Los animales fueron pesados semanalmente y controlados hasta la aparición de tumores palpables. Se determinó la latencia, la incidencia y la progresión tumoral. Se tomaron muestras de sangre troncal y una porción de glándula mamaria normal y de tumor para determinar las concentraciones plasmáticas de hormonas por RIA y realizar el estudio histopatológico e inmunohistoquímico. El análisis estadístico se realizó por la prueba t de Student y por Chi cuadrado. Las HIPO mostraron una disminución del crecimiento corporal, una curva de peso más baja y niveles reducidos de GH ( $p < 0.0001$ ). La latencia de aparición de tumores fue mayor ( $p < 0.0001$ ) y la incidencia y velocidad de crecimiento tumoral fue menor ( $p < 0.05$ ) en las HIPO que en las EUT. En ambos grupos los tumores fueron mayoritariamente de tipo ductal, con más componente infiltrante y menor respuesta inflamatoria local en las HIPO. No se observaron diferencias significativas en el índice mitótico ni en la expresión de PCNA, mientras que el índice apoptótico fue mayor ( $p < 0.05$ ) en las HIPO. Los niveles séricos de prolactina fueron similares en ambos grupos y los de leptina, estradiol e insulina fueron menores ( $p < 0.05$ ) en las ratas HIPO comparadas con las EUT, aún cuando la masa grasa corporal fue similar en ambos grupos. En conclusión, el menor desarrollo tumoral mamario observado en las ratas HIPO podría deberse a un aumento en la apoptosis explicado por niveles séricos bajos de leptina, estradiol e insulina.

- 023. (419) ESTUDIOS TERATOGÉNICOS Y FOTOTERAPÉUTICOS DE NANOPARTÍCULAS DE POLIANILINA (NP-PANI) EN MODELOS IN VIVO**  
Yslas E.<sup>1</sup>; Ibarra L.<sup>2</sup>; Tarrés L.<sup>3</sup>; Molina M.<sup>4</sup>; Rivarola C.<sup>5</sup>; Barbero C.<sup>6</sup>; Rivarola V.<sup>7</sup>; Bertuzzi M.<sup>8</sup>  
*Dpto Biología Molecular, Dpto Química, Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>*  
*inesilla.yslas@gmail.com*

Introducción: La terapia Fototérmica (TFT) se basa en el uso de nanomateriales que al ser irradiados con luz del infrarrojo cercano absorben la radiación y la liberan como calor provocando regresión tumoral. Es importante determinar si los nanomateriales pueden ser una amenaza para el ambiente y la salud. Por esto es necesario dilucidar la interacción de nanoobjetos con sistemas biológicos para poder ser aplicados en TFT. Objetivos: -Evaluar el efecto teratogénico de Np-Pani en embriones de *Rhinella arenarum*. - Evaluar los efectos de Np-Pani sobre la funcionalidad hepática y renal en ratones Balb/c sanos y el efecto fototérmico en ratones portadores de tumor. Materiales y Métodos: Para el test de teratogénesis se utilizaron embriones (2-4 blastómeros) expuestos 96 h a polivinilpirrolidona (PVP) y a Np-Pani dispersadas en PVP, determinándose el número, tipo de malformaciones y muertes. En sangre de ratones Balb/c con Np-Pani administrada por vía endovenosa se determinó GPT, creatinina y urea. En ratones portadores de tumor se administró Np-Pani por vía intratumoral, luego se irradió y se evaluó la regresión del tumor en el tiempo (10 días). Resultados: Los estudios en embriones mostraron efectos teratogénicos en ambos grupos tratados (PVP y Np-Pani). Las concentraciones no tóxicas y teratogénicas determinadas a través del Probit fueron para PVP: NOEC 208,36 mg/L, CT50 290,37 mg/L y CT99 404,65 mg/L. Mientras que para Np-Pani NOEC 219 mg/L, CT50 286 mg/L y CT99 374 mg/L. En ratones no se observaron efectos adversos de Np-Pani ni de PVP en la funcionalidad hepática y renal. Los estudios fototerapéuticos mostraron regresión total en un 60 % de los tumores tratados. Conclusión: Los valores de NOEC, CT50 y CT99 son similares para PVP y Np-Pani indicando que los efectos teratogénicos serían debido a PVP. En ratones, Np no afectó la funcionalidad hepática y renal registrándose una importante acción terapéutica con regresión tumoral total en 3 de los 5 animales tratados.

**024. (595) LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA C-SRC MEDIA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS MAMARIAS HUMANAS MDA MB-231 INDUCIDA POR HISTAMINA**

Mohamad N.<sup>1</sup>; Porretti J.<sup>2</sup>; Girardi M.<sup>3</sup>; Guitérrez A.<sup>4</sup>; Cricco G.<sup>5</sup>; Martín G.<sup>6</sup>

Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
mohamadnora@gmail.com

En trabajos previos demostramos que bajas concentraciones de histamina (HA) ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) estimulan la capacidad migratoria e invasiva en la línea celular humana de carcinoma mamario MDA MB-231, mientras que concentraciones  $> 10 \mu\text{M}$  las inhiben. Esta acción diferencial está mediada por los diferentes niveles de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) generados en el sistema. La activación por fosforilación de c-Src es crucial en la migración y la metástasis. La c-Src activada fosforila sustratos involucrados en la adhesión celular, entre ellos la beta-catenina que transloca al núcleo y regula la expresión de genes del proceso de transición epitelial-mesenquimática. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el papel de la proteína c-Src en la respuesta migratoria inducida por HA en las células MDA MB-231. Se empleó el inhibidor específico de c-Src PP2 en una concentración ( $1 \mu\text{M}$ ) que no afectó la proliferación celular. Utilizando cámaras de migración e insertos con poros recubiertos o no con matrigel<sup>®</sup>, se determinó que el PP2 bloqueó el efecto estimulador de bajas dosis de HA sobre la migración e invasión. Por western blot se observó un aumento de la fosforilación de la proteína c-Src ( $p < 0.05$  vs control) con dosis bajas de HA y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  exógeno ( $0,5 \mu\text{M}$ ) y una disminución ( $p < 0.05$  vs control) con altas concentraciones de HA y de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $5 \mu\text{M}$ ). El tratamiento con catalasa revirtió los efectos de las distintas dosis de HA. Por inmunocitoquímica se evaluó la expresión de Beta catenina. Hubo un aumento de la expresión nuclear y perinuclear con HA  $0,5 \mu\text{M}$  ( $p < 0.05$  vs control), mientras que en el tratamiento combinado de PP2 con HA  $0,5 \mu\text{M}$  se observó una expresión citoplasmática y nuclear de beta catenina similar a la de los controles. Nuestros resultados señalan que la histamina modula la capacidad migratoria e invasiva de las células MDA MB-231 a través de una vía de señalización poco estudiada para los GPCR que incluye la fosforilación de la c-Src por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**025. (606) ROL DE COACTIVADORES DE RECEPTORES NUCLEARES EN EL DESARROLLO TUMORAL**

Panelo L.<sup>1</sup>; Alvarado C.<sup>2</sup>; Fernandez Larrosa P.<sup>3</sup>; Ruiz Grecco M.<sup>4</sup>; Burlando S.<sup>5</sup>; Alvarez C.<sup>6</sup>; Sambresqui A.<sup>7</sup>; Costas M.<sup>8</sup>; Rubio M.<sup>9</sup>

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>

labapoptosis@lanari.fmed.uba.ar

Nuestro grupo estudia el rol de la familia de Coactivadores de Receptores Nucleares en el desarrollo tumoral y su interacción con otras moléculas involucradas en el desarrollo maligno. Demostramos previamente que la sobreexpresión de RAC3, uno de los miembros de esta familia, tiene un rol clave en el desarrollo tumoral por acción nuclear: contribuyendo a la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis regulando la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que es activado por citoquinas inflamatorias y señales de estrés, además de una acción citoplasmática: regulando la actividad de quinasas. Con el objeto de determinar si altos niveles de RAC3 son acompañados de una mayor actividad NF- $\kappa$ B en tumores de colon y recto, se analizaron muestras de biopsias obtenidas en nuestro instituto, en cuanto a nivel y localización subcelular de RAC3 y el componente Rel-A del dímero NF- $\kappa$ B por inmunohistoquímica. Según nuestras observaciones, RAC3 se expresa en altos niveles en 6 muestras tumorales de pacientes analizados respecto de las muestras no tumorales, donde es prácticamente indetectable. La localización fue predominantemente citoplasmática. En cuanto a Rel-A, solo se observa un leve aumento en sus niveles en las muestras tumorales, siendo citoplasmático en todos los casos. Asimismo, cuando se estudiaron los niveles del ARN mensajero de los coactivadores SRC2 y RAC3 en muestras de tejido adiposo de mama, observamos niveles aumentados de los mismos que correlacionan con lesiones

neoplásicas. Estos resultados sugieren que los altos niveles de expresión de coactivadores estarían asociados al desarrollo de distintos tipos de cáncer, tanto hormona dependientes como independientes, contribuyendo al desarrollo tumoral por mecanismos probablemente independientes de la actividad NF- $\kappa$ B.

**026. (613) INDUCCIÓN DIFERENCIAL DE LA PROTEÍNA KU80 EN RESPUESTA A LA IRRADIACIÓN GAMMA EN CÉLULAS DE CÁNCER COLORECTAL RADIORESISTENTES**

Cerda M.<sup>1</sup>; Batalla M.<sup>2</sup>; Notcovich C.<sup>3</sup>; Molinari B.<sup>4</sup>; Duran H.<sup>5</sup>; Policastro L.<sup>6</sup>

Comisión Nacional de Energía Atómica, CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>; UNSAM<sup>6</sup>  
belen\_cerda@yahoo.com

La generación de rupturas doble cadena (DSBs) es la principal causa del efecto letal de la radiación ionizante. La capacidad de reparación del ADN está asociada directamente con la radioreistencia intrínseca (RI) en las células tumorales. La proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PK) es uno de los principales complejos asociados a la reparación de DSBs. La DNA-PK está formada por un componente catalítico y una proteína heterodimérica llamada Ku, compuesta por dos polipéptidos estrechamente asociados denominados ku70 y ku80. Ku se une a las DSBs y recluta a la subunidad catalítica. El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de ku70 y ku80 por PCR en tiempo real y por western blot en células de cáncer colorectal con diferencias en su RI. En primer lugar, hemos caracterizado la RI de líneas de cáncer colo-rectal: HT-29, Caco2, T84 y LoVo mediante curvas de sobrevivencia y mediante su capacidad de reparación de las DSBs. El ajuste de las curvas al modelo lineal cuadrático mostraron un aumento significativo del valor de  $\alpha$  en LoVo respecto de HT-29, Caco-2 y T-84 ( $p < 0.05$ ). La capacidad de reparación del daño al ADN se realizó mediante la determinación inmunohistoquímica de la fosforilación de la histona H2AX. El ensayo se realizó a 0,5 y 6 h post-irradiación (2Gy) como medida de daño inicial y reparado del ADN. HT-29 mostró un aumento significativo del número de células con menos focos a las 6 horas respecto de las otras líneas celulares ( $p < 0.05$ ). En conclusión HT-29 es la línea más radiorresistente y LoVo es la más radiosensible. Finalmente, hemos comparado la expresión de Ku70 y Ku80 en HT-29 y LoVo y su inducción (2Gy) a 2, 4, 8 y 10 horas. Ku80, pero no Ku70 fue significativamente inducida en la línea radiorresistente HT-29 pero no en LoVo. En futuros experimentos evaluaremos si la expresión de Ku80 podría ser un parámetro útil para la predicción de la radiosensibilidad así como también un blanco sensible para la radiosensibilización del cáncer colorectal.

**027. (614) CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE EXCLUSIÓN DE AMPc MEDIADO POR MRPS EN MODELOS DE CARCINOMAS DUCTALES PANCREÁTICOS HUMANOS**

Carozzo A.<sup>1</sup>; Diez F.<sup>2</sup>; Copsel S.<sup>3</sup>; Bianciotti L.<sup>4</sup>; Shayo C.<sup>5</sup>; Fernandez N.<sup>6</sup>; Davio C.<sup>7</sup>

Laboratorio de Farmacología de Receptores, Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA<sup>1 2 6 7</sup>; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IBYME, CONICET<sup>3 5</sup>; Cátedras de Fisiopatología, FFyB, UBA<sup>4</sup>  
acarozzo@ffyb.uba.ar

Diversos reportes indican que el AMPc está implicado en procesos de proliferación y diferenciación de células normales y malignas. Dado que el cáncer de páncreas representa uno de los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad y a fin de establecer un posible blanco terapéutico nos planteamos estudiar el mecanismo de exclusión del AMPc en células ductales de carcinoma pancreático (HPAF, PANC1, BxPC3) y el papel de las proteínas de resistencia a multidroga (MRPs) en este proceso. El nivel de AMPc intracelular resulta del balance entre su producción, degradación y exclusión. Cinéticas de producción de AMPc a Forskolina  $33 \text{ mM}$ , mostraron un incremento significativo en los niveles de AMPc extracelular. En ensayos concentración-respuesta a dicho agente se observó un incremento concentración-dependiente en los niveles intra y extracelulares de AMPc y una exclusión signi-



ficativamente mayor en el sistema más indiferenciado (PANC1). El tratamiento con probenecid 1 mM (inhibidor de MRPs) llevó a una disminución en el proceso de exclusión del 80%, sugiriendo la implicancia de MRPs en dicho proceso. El MRP4 es el miembro de la familia de MRPs que presenta mayor afinidad por el AMPc. Así, evaluamos mediante Western blot la expresión de MRP4, observando una mayor expresión en las células más indiferenciadas y malignas. Asimismo, el tratamiento con agentes que incrementan los niveles de AMPc, inducen una disminución en los niveles de MRP4. Análisis *in silico* del promotor del gen de MRP4 muestran varias secuencias que podrían ser reguladas directa o indirectamente por AMPc (sitios CRE y SRE) sugiriendo un posible mecanismo de regulación que dependería de la maquinaria celular. Estos resultados muestran la existencia de mecanismos de exclusión de AMPc en células ductales de carcinoma pancreático y sugieren una correlación entre el grado de malignidad y la regulación de los niveles de AMPc y MRP4.

**028. (650) ESTRATEGIA DE DESARROLLO DE UNA BIBLIOTECA DE ANTICUERPOS DE DOMINIO ÚNICO DE LLAMA (VHH) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE MELANOMA METASTÁSICO HUMANO.**

Lacreu M.<sup>1</sup>; Mac Keon S.<sup>2</sup>; Mordoh J.<sup>3</sup>; Urrutia M.<sup>4</sup>  
Fundación Instituto Leloir<sup>1 2 3 4</sup>  
laulacreu@gmail.com

Una vez que el melanoma metastatiza a distancia, el pronóstico es sombrío. Aún no se han desarrollado Ac monoclonales contra melanoma. Las llamas poseen, además de las Igs convencionales, Acs que carecen de cadena liviana, cuyo sitio de combinación al Ag consta sólo de la región variable de la cadena pesada (VHH), poseyendo una estrategia de unión al Ag diferente a la de los Acs convencionales. Con el fin de construir una biblioteca de VHHs contra Ag de superficie de células de melanoma humano, se inmunizaron llamas con líneas de melanoma humano metastático (LMHM). Mediante RT-PCR para el transportador de membrana ABCB5, se obtuvieron 3 LMHM positivas (de 9 estudiadas) cuyos extractos de membrana fueron usados como inmunógenos. Luego de la inmunización se observó que las respuestas séricas contra células enteras no permeabilizadas aumentaba a medida que avanzaba la inmunización (1er, 2da y 3er inmunización) obteniéndose un título final mayor a 1/1000. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica, y mediante RT-PCR con primers específicos se amplificó el pool de VHHs para construir la biblioteca. También en dos de las 3 líneas utilizadas se estudió mediante citometría de flujo la presencia en membrana plasmática de los marcadores CD63 (tetraspanina) que será utilizada para la selección y de los marcadores de células stem CD133 (prominina) y CD271 (nerve grow factor receptor). Las 2 LMHM fueron positivas para CD63 (89%, 79%) y CD271 (96%, 98%) y negativas para CD133 (4%, 3%). CD271 confirmó ser Ag de membrana mediante epifluorescencia. Los resultados mencionados nos permiten concluir que las llamas han desarrollado respuesta contra Ag de membrana, probablemente en forma nativa. Por otro lado, la presencia en membrana plasmática de CD271 en dos LMHM utilizadas como inmunógeno, abre la posibilidad de obtener moléculas terapéuticas dirigidas contra este Ag.

**029. (704) REGULACIÓN DIFERENCIAL DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA POR MODULACIÓN DE LOS NIVELES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO**

Bracalente C.<sup>1</sup>; Notcovich C.<sup>2</sup>; Ibañez I.<sup>3</sup>; Policastro L.<sup>4</sup>; Duran H.<sup>5</sup>  
Comisión Nacional de Energía Atómica, GAIANN, Departamento de Micro y Nanotecnología<sup>1 2 4</sup>; CONICET<sup>3</sup>; Universidad de San Martín<sup>5</sup>  
candybraca@gmail.com

El melanoma maligno es un tipo de cáncer de piel que deriva de la transformación de melanocitos. El estudio de los mecanismos de dicha transformación es relevante, dado que es un tipo

de tumor refractario a la mayoría de los tratamientos de quimio-radioterapia. Antecedentes bibliográficos y de nuestro grupo de trabajo demuestran la presencia de altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células tumorales y su participación como mediadoras de procesos asociados a la transformación celular, tales como proliferación, invasión y metástasis. Por lo tanto, se evaluó el efecto de la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por sobreexpresión de la enzima antioxidante catalasa, sobre la proliferación celular y capacidad de migración. Con este objetivo, células de melanoma (A375) fueron transfectadas de forma estable con el plásmido pcDNA3, conteniendo el cDNA de la catalasa humana, utilizándose como control, la transfección con el plásmido vacío. Se obtuvieron tres clones A7, G10 y C10 con mayor expresión y actividad de catalasa respecto del control ( $p < 0.05$ ), evaluadas por western blot y por un ensayo espectrofotométrico, respectivamente. Asimismo, para determinar la proliferación celular, se realizó el ensayo de MTT, obteniéndose en los tres clones una tasa de proliferación significativamente menor al control ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, la capacidad de migración celular fue evaluada por el ensayo de wound healing; observándose que: mientras el clon G10 desarrollaba una mayor capacidad de migración respecto del control ( $p < 0.05$ ); el clon A7 presentó un resultado opuesto, lo que podría explicarse por diferentes niveles endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre clones. En conclusión, si bien el aumento de los niveles de catalasa inhibe la proliferación, en este trabajo demostramos que dicho aumento regula la migración, tanto positiva como negativamente, evidenciando que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participaría en la regulación de ambos procesos por vías independientes.

## REPRODUCCIÓN 1

**030. (434) LA REACCIÓN ACROSÓMICA INDUCIDA POR FIBRONECTINA ES MEDIADA POR EL SISTEMA AMPc/PKA EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

Perez Espinosa B.<sup>1</sup>; Morales P.<sup>2</sup>; Diaz E.<sup>3</sup>  
Universidad de Antofagasta, Facultad Cs de la Salud, Dpto Biomédico, Lab. Biología de la Reproducción<sup>1 2 3</sup>  
boris.perez@uantof.cl

Resultados preliminares demostraron que la fibronectina, una proteína de la matriz extracelular presente en el cúmulo oóforo del ovocito, induce la reacción acrosómica en espermatozoides humanos y que su efecto es mediado por el proteasoma. Es sabido que las integrinas (receptores transmembrana de las proteínas de la matriz extracelular) activan diversas señales intracelulares como por ejemplo el sistema AMPc/PKA, entre otras. El objetivo de este trabajo es determinar si fibronectina es capaz de inducir la reacción acrosómica y la actividad del proteosoma a través de la vía AMPc/PKA. Para ello, alícuotas de espermatozoides móviles, seleccionados por Percoll, fueron capacitados durante 18 hr. En los últimos 45 minutos los espermatozoides fueron incubados con 100µM H89 (inhibidor de PKA), 50nM KT5720 (inhibidor de PKA) o solvente. Luego, se evaluó: 1) el porcentaje de espermatozoides reaccionados usando PSA-FITC y Hoechst 33258; 2) la actividad tipo quimotripsina del proteasoma con un sustrato fluorogénico; 3) el grado de fosforilación en tirosina de proteínas totales y del proteosoma; 4) el efecto de fibronectina sobre el nivel de AMPc de los espermatozoides; 5) el nivel de actividad de PKA. Para evaluar la participación de SACY (adenilil ciclasa soluble), en los últimos 40 minutos los espermatozoides fueron cambiados de medio Tyroides tradicional a un Medio Tyroide S/ HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. En una alícuota se evaluó el porcentaje de espermatozoides reaccionados usando PSA-FITC y Hoechst 33258; en otra alícuota, se determinó por Western-blot el grado de fosforilación de proteínas en residuos tirosina y proteínas sustratos de PKA. Los resultados indican que Fn es capaz de inducir RA vía AMPc y PKA y que en ausencia de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, el efecto observado se revierte parcialmente. Estos efectos se aprecian de igual forma en el patrón de fosforilación de proteínas a nivel de residuos tirosina y proteínas sustrato de PKA. Fondecyt 11070051 y 1080028

**031. (447) EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS EN LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE ARGINASA Y ORNITINA DECARBOXILASA DE PLACENTA HUMANA**

Lombardo P.<sup>1</sup>; Rivero Osimani V.<sup>2</sup>; Chiappella G.<sup>3</sup>; Magnarelli G.<sup>4</sup>; Guiñazú N.<sup>5</sup>

Facultad de Ciencias del Ambiente de la Salud, Universidad Nacional del COMAHUE<sup>1 5</sup>; Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue, IDEPA-CONICET<sup>2 3 4</sup> paol\_87@hotmail.com

Arginasa (ARG) y ornitina decarboxilasa (ODC) son enzimas que participan en la formación de poliaminas, factores que intervienen en el crecimiento y la diferenciación celular en la placenta. Considerando que la síntesis de poliaminas es afectada en respuesta a tóxicos, el objetivo de este trabajo fue analizar si la exposición ambiental a OP impacta en la actividad de las enzimas ARG y ODC en este órgano. Previo consentimiento informado, se colectaron vellosidades de placentas a término (n=36), de cesáreas electivas, de pacientes seleccionadas en base a criterios de inclusión/exclusión: residentes urbanas -ZU- y rurales -ZR en períodos de aplicación intensiva de OP (PA) y en receso (PR). La exposición a OP se evaluó mediante el estudio de la actividad del biomarcador de referencia carboxilesterasa, hallándose disminución en ZR en PA respecto de ZU (p <0,05). Los resultados demostraron que en las placentas de ZR se modificó significativamente (p <0,05) la actividad de las enzimas ARG en PA (60,84 ± 25,85 mg urea/h x mg prot) respecto de PR (15,50 ± 6,78 mg urea/h x mg prot) y de ZU (23,25 ± 6,61 mg urea/h x mg prot). La actividad de ODC se incrementó significativamente (p <0,05) en ZR en AP (0,166 ± 0,071 nmol CO<sub>2</sub>/h x mg prot) respecto de PR (0,015 ± 0,010 nmol CO<sub>2</sub>/h x mg prot) y de ZU (0,029 ± 0,012 nmol CO<sub>2</sub>/h x mg prot). Adicionalmente se analizó por western blot la expresión de ARG isoformas I y II, y ODC observándose un incremento significativo en la expresión de la ARG II y ODC en ZR en AP. Estos resultados indican que la actividad y expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de PA en placenta se incrementaron en la exposición ambiental a OP, efecto posiblemente asociado a una respuesta reparadora para mantener la homeostasis tisular. Agradecimientos: beca alumno UNCo-FaCiAS y posgrado FONCyT. Subsidios FONCyT, UNCo y CONICET. Médicas Marcela Curioni y Silvia Santa Cruz.

**032. (462) BLOQUEO DEL RECEPTOR AT2 DE ANGIOTENSINA II Y SU RELACIÓN CON LA ANGIOGÉNESIS PLACENTARIA Y FETAL EN RATAS NORMO E HIPERTENSAS.**

Biaggio V.<sup>1</sup>; Lopez Aguilera F.<sup>2</sup>; Seltzer A.<sup>3</sup>

Universidad Nacional de Cuyo, IHEM, CONICET<sup>1 2 3</sup> vbiaggio@gmail.com

Introducción: Hay múltiples factores que participan en el fenómeno de anti-angiogénesis en la preeclampsia, algunos actúan en concierto con las vías de señalización de los (VEGF-R) y de los receptores de Angiotensina II (AT1-R y AT2-R). Se observó también una activación aberrante de las vías de señalización de los AT1-R por formación de heterodímeros y autoanticuerpos. Por otra parte, VEGF promueve el desarrollo de la placenta y del feto al incrementar la vasculogénesis. Objetivo: Analizar la expresión de formas oligoméricas de los AT1-R y AT2-R, y la expresión de VEGF y su receptor FLK-1 en la placenta de ratas normo e hipertensas. Se aplicaron técnicas de Western Blot, IHQ y microscopía confocal (mc) a tejidos obtenidos de ratas preñadas (-P) de las cepas WKY y SHR tratadas con el AT2-RB: PD123319 (bomba mini-osmótica/dosis: 1.0 mg/Kg/día) (WKY-PD y SHR-PD) y controles tratadas con salina (WKY-P+SF y SHR-P+SF) y sacrificadas E18. Resultados: En las ratas SHR-P observamos mayor expresión de formas oligo y diméricas (p<0.01) de los receptores: AT1-R y de formas diméricas del AT2-R (p<0.001). El tratamiento con PD123319 no modificó la PA de las SHR-P pero aumentó significativamente (p<0.001) la presencia de monómeros del AT1-R y disminuyó la expresión de las formas de alto peso molecular del AT2-R. En los animales SHR-P vemos una atenuación de las marcas VEGF+ (IHQ), Flk-1+ y AT2+(mc) en

los vasos de la decidua. El tratamiento con el AT2-RB exacerba y extiende la inmunotinción hacia los vasos de la zona fetal en los WKY-PD mientras que en los SHR-PD no aumenta. Conclusión: La respuesta del sistema VEGF/Flk-1 al bloqueo del receptor AT2 fue diferente en las placentas de las ratas normo e hipertensas. En este sistema postulamos una regulación de los AT1-R por los AT2-R (crosstalk) en las ratas WKY-P que se pierde en las SHR-P posiblemente por alteraciones de los receptores de VEGF.

**033. (521) CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA PREÑEZ MURINA Y EN UN MODELO DE PARTO PRETÉRMINO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO.**

Bariani M.<sup>1</sup>; Dominguez Rubio A.<sup>2</sup>; Vercelli C.<sup>3</sup>; Cella M.<sup>4</sup>; Franchi A.<sup>5</sup>; Aisemberg J.<sup>6</sup>

CEFYBO<sup>1 2 3 4 5 6</sup>

vickiba\_86@hotmail.com

Uno de los problemas más importantes en la perinatología actual es la prematuridad, siendo la causa principal de morbi-mortalidad perinatal. Las infecciones son responsables de un tercio de los partos prematuros, estando implicadas las vías proinflamatorias. Los endocannabinoides (EC) son mediadores lipídicos que actúan a través de receptores CB siendo la anandamida (AEA) uno de los EC más abundantes. Su efecto biológico termina cuando es degradada por la FAAH, una hidrolasa de amidas de ácidos grasos. Se vio que los niveles de AEA aumentan en suero durante el parto en la mujer, sugiriendo su participación durante el parto normal. En el presente trabajo demostramos la presencia de ambos receptores de EC (CB1 y CB2, por western blot) y determinamos la actividad (por radioconversión) de las enzimas de síntesis y degradación de AEA en el útero de ratón en la preñez tardía. Observamos un aumento de la actividad de síntesis de AEA (p<0,01: día 18 vs. día 19 o día del parto) antes del parto, sin encontrarse cambios en su degradación. Desarrollamos un modelo murino de parto pretérmino administrando dos dosis de lipopolisacárido (LPS, 10 µg/ratón) a ratones hembra de la cepa BALB/c en el día 15 de gestación. La endotoxina induce el parto prematuro 10 h después de la última inyección. Se determinó en úteros de hembras de día 15 (control) y con parto pretérmino la expresión del ARNm de la FAAH (por PCR) y la actividad enzimática de la misma (por radioconversión). Observamos una disminución en la expresión uterina del ARNm de FAAH en las hembras con parto pretérmino luego de 3 h de la última dosis de LPS (p<0.001: día 15 vs. día 15+LPS) que no se mantiene a las 5 h; momento en el cual tampoco observamos cambios en la actividad enzimática. Este trabajo muestra la presencia del sistema endocannabinoide en el útero de ratón al final de la preñez, la modulación de la síntesis de AEA y alteraciones en la degradación de este EC en el parto prematuro inducido por infección.

**034. (539) LA HIPERANDROGENIZACIÓN PRENATAL PRODUCE ALTERACIONES EN LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA DURANTE LA ETAPA PUBERAL**

Amalfi S.<sup>1</sup>; Velez L.<sup>2</sup>; Heber F.<sup>3</sup>; Ferreira S.<sup>4</sup>; Pignataro O.<sup>5</sup>; Motta A.<sup>6</sup>

CEFYBO, UBA, CONICET<sup>1 2 3 4 6</sup>; IBYME<sup>5</sup>

sabri\_amalfi@hotmail.com

Una de las hipótesis sobre la etiología del Síndrome del Ovario Poliquístico es que un exceso de andrógenos intrauterino induciría reprogramación fetal, sin embargo se desconoce el alcance de la misma. Objetivo: establecer alteraciones ováricas inducidas por el hiperandrogenismo prenatal (HA). Ratas preñadas Sprague-Dawley se inyectaron entre los días 16 a 19 de gestación con 2 (T2) ó 5 mg (T5) de testosterona ó aceite (control: C), N=10 animales/determinación y por grupo. Las crías hembras se pesaron a los 21 y 60 días de edad (sacrificio) y se midió la distancia urogenital (como parámetro de masculinización). Por extendido vaginal se determinó el estadio del ciclo sexual. Resultados: El estudio de la morfología ovárica por tinción con hematoxilina-eosina mostró que HA aumentó el número de folículos primarios por ovario, indujo luteinización anómala y quistes foliculares. A los 21 días de

edad, los animales T2 y T5 tenían menor peso que los controles (C: 40±2 g, T2: 34±3g, T5: 20±1 g) pero a los 60 días no había diferencia y la distancia uro-genital de T2 y T5 era mayor (1,7±0,2 y 1,9±0,1, respectivamente) que C (1,2±0,1 mm). La concentración de progesterona en suero evaluada por radioinmunoensayo (RIA) era mayor en T2 (149±50) y T5 (135±18) que en C (68±7 ng/ml suero) y la de estradiol (por RIA) era menor en T2 (0,05±0,02) y T5 (0,06±0,01) que en C (0,37±0,01 ng/ml suero). Testosterona en suero (por RIA), no varió entre los tres grupos. Los animales T5 no presentaron apertura vaginal y no ciclaban. El 20% de T2 tenía ciclos sexuales regulares vs 30% de C. La prostaglandina E ovárica de T2 (3,4±0,9) no era significativamente distinta a la C (3,5±1,09) pero era mayor en T5 (7,9±1,6 pg/mg proteína). Concluimos que HA genera un ambiente desfavorable para el desarrollo fetal que se traduce en un menor peso en los primeros días post-nacimiento. En la pubertad, la esteroidogénesis ovárica se ve alterada y se establece un estado pro-inflamatorio ovárico en T5.

### 035. (602) DOSIS DIARIAS DE LEPTINA EJERCEN UN EFECTO PROTECTOR SOBRE LA ATRESIA FOLICULAR DE LA RATA

Bilbao M.<sup>1</sup>; Di Yorio M.<sup>2</sup>; Faletti A.<sup>3</sup>  
 CEFYBO, 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 diario con bajas dosis de leptina induce el proceso ovulatorio aumentando los niveles de progesterona (P4) sérica en la rata. Dado que en el ovario la cadena de transporte de electrones asociada a la esteroidogénesis es la principal vía de producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de este tratamiento sobre las principales enzimas responsables de la síntesis de P4, la atresia folicular mediante la determinación del estado oxidativo y el grado de apoptosis tisular. Para ello, ratas inmaduras estimuladas con gonadotropinas (eCG/hCG) fueron tratadas por 12 días con vehículo (C) y leptina (L, 3 µg/día). Se determinó en ovario: i) expresión proteica de P450scc, 3βHSD y caspasa-3 por Western blot, ii) contenido total de glutatión (GSH), actividad enzimática de superóxido dismutasa y catalasas, e índice de peroxidación lipídica, por espectrofotometría; iii) capacidad de respuesta del tejido a ROS por espectrofluorometría; y iv) presencia de ROS en el tejido por microscopía confocal. Las ratas tratadas con leptina exhibían menor expresión de caspasa-3 activa (C: 684±63; L: 425±51; p<0.001), mayor expresión de 3βHSD (43.6%, p<0.05) sin cambios en P450scc. Asimismo, se observó disminución del contenido de GSH total (20%, p<0.05) sin afectar las actividades enzimáticas antioxidantes ni modificar el nivel de peroxidación lipídica; de la capacidad de respuesta a ROS al aumentar 216% (p<0.001) la presencia de estas especies después de una inducción con H2O2; y de la cantidad absoluta de ROS (94.6%, p<0.01) en el tejido. Estos resultados sugieren que bajas dosis diarias de leptina ejercen un efecto protector sobre el ovario por disminuir el estrés oxidativo y el grado de apoptosis, lo que lleva a una menor atresia folicular durante el proceso ovulatorio.

### 036. (672) MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GnRH EN EL HIPOTÁLAMO DE LAGOSTOMUS MAXIMUS (VIZCACHA DE LAS LLANURAS) POR ÓXIDO NÍTRICO

Inserra P.<sup>1</sup>; Di Giorgio N.<sup>2</sup>; Saucedo L.<sup>3</sup>; Leopardo N.<sup>4</sup>; Lux-lantos V.<sup>5</sup>; Vitullo A.<sup>6</sup>; Dorfman V.<sup>7</sup>  
 Centro de Estudios Biomédicos Biotecnológicos Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides<sup>1 3 4 6 7</sup>; IByME<sup>2 5</sup>  
 vdorfman08@yahoo.com

La síntesis y secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) es regulada por óxido nítrico (NO). Ésta se secreta en forma pulsátil desde la pubertad hasta la menopausia exceptuando la preñez. La vizcacha presenta poliovlulación, neoogénesis a edad adulta y pseudo-ovulación durante la gestación. El objetivo fue estudiar la modulación de la síntesis y secreción

de GnRH en este roedor. Se utilizaron hipotálamos de vizcachas adultas preñadas ovulando (PO) y sin ovular (PNO), no preñadas ovulando (NPNO) y sin ovular (NPNO) y machos (M) (n=5 por grupo). Se determinó la concentración de GnRH por RIA y se observó significativamente (s., p<0,05) mayor concentración en HA (hipotálamo anterior) que en HMB (hipotálamo medio basal) de M y no preñadas (M=5 veces, NPNO=3 veces y NPO=98%) y mayor concentración en HMB que en HA de preñadas (PO=177%, PNO=20%). La concentración en HMB fue 108% mayor en PO que en PNO, mientras que en HA fue 7 veces menor en NPO que en NPNO. Mediante inmunohistoquímica se localizó GnRH en soma y varicosidades de neuronas del Área Preóptica del Hipotálamo (APO), en citoplasmas del Núcleo Supraóptico (NSO) y en varicosidades de la Eminencia Media (EM). Con microscopía confocal se determinó la expresión de NO Sintasa neuronal (nNOS) en neuronas adyacentes a las que expresan GnRH en APO, y NO Sintasa endotelial (eNOS) en células que rodean los axones inmunorreactivos para GnRH en ME. Por Western-Blot se determinó disminución s. de la expresión de nNOS en HA y de eNOS en HMB durante la ovulación (nNOS= 144% NPO vs NPNO y 102% PO vs PNO; eNOS= 10 veces NPO vs NPNO y 8 veces PO vs PNO). La diferencia de expresión de GnRH en HA e HMB durante la preñez indicaría la actividad del eje HHG durante la gestación. La presencia de NOS en neuronas adyacentes a las inmunorreactivas para GnRH, así como su disminución durante la ovulación sugiere la influencia del NO sobre la síntesis y secreción de GnRH aún durante la gestación. (PIP-CONICET 0225/2011).

### 037. (43) EFECTO DE AGONISTAS DE RECEPTORES ACTIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISOMALES (PPARS) EN LA PLACENTA A TÉRMINO DE RATAS SANAS Y DIABÉTICAS.

Capobianco E.<sup>1</sup>; Kurtz M.<sup>2</sup>; Fornes D.<sup>3</sup>; Perrone C.<sup>4</sup>; Jawerbaum A.<sup>5</sup>  
 CEFYBO, CONICET, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 evacapobianco@yahoo.com.ar

En la diabetes materna, el feto y la placenta se desarrollan en un ambiente intrauterino proinflamatorio. Dada la capacidad reguladora de agonistas de PPARs sobre el entorno proinflamatorio, el OBJETIVO fue estudiar el efecto de agonistas de PPARs sobre la lipoperoxidación y producción de óxido nítrico (NO) en placenta de ratas sanas y diabéticas a término en forma género-dependiente. Se explantaron placentas de ratas sanas (C) y diabéticas (D) por administración de estreptozotocina que fueron A) alimentadas desde el día 0,5 de gestación con dieta estándar suplementada o no con 6% de aceite de oliva (AO: contiene 75% de ácido oleico) o 6% de aceite de cártamo (AC: contiene 75% de ácido linoleico) y B) inyectadas en forma intrafetal con 15deoxyΔ12,14PGJ2 (PGJ 1 µM), agonista de PPARγ en los 3 últimos días de preñez. Se dosó la glucemia, trigliceridemia y colesterolemia en suero materno y fetal. En la placenta se determinaron los niveles de nitros/nitritos (N/N), metabolitos estables del NO (reacción de Griess) y los lipoperóxidos, mediante reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS). Los tratamientos efectuados no modificaron los niveles de glucemia, trigliceridemia y colesterolemia, elevados en suero D materno y fetal (p<0.05). Los niveles de TBARS, elevados en placentas de fetos hembra (36% p<0,05) y macho (59% p<0,01) D, se redujeron con dieta materna AC (33% p<0,05), y no mediante dieta AO. El tratamiento fetal con PGJ redujo TBARS solo en placentas de fetos hembra (49% p<0,05). Los niveles de N/N, incrementados en placenta de fetos hembra (31% p<0,05) y macho (43% p<0,05) D, se redujeron con ambos tratamientos dietarios (30% p<0,05). El tratamiento fetal con PGJ redujo N/N solo en placentas de fetos hembra (20% p<0,05). CONCLUSIONES: Los tratamientos con agonistas de PPARs mejoran parámetros proinflamatorios en placentas de ambos sexos cuando el tratamiento es materno, mientras que solo en placentas de fetos hembra, cuando el tratamiento es fetal.

### 038. (37) FAS LIGANDO SOLUBLE COMO MEDIADOR DE LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN TESTICULAR

Jacobo P.<sup>1</sup>; Fass M.<sup>2</sup>; Lustig L.<sup>3</sup>; Theas M.<sup>4</sup>  
*Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4</sup>*  
*ciruba14@yahoo.com.ar*

La orquitis autoinmune experimental (OAE) es un cuadro de inflamación crónica del testículo caracterizado por la presencia de un infiltrado intersticial linfomonocitario y apoptosis de las células germinales (CG). Demostramos previamente la expresión del receptor de muerte Fas en las CG apoptóticas y un aumento del número de linfocitos que expresan FasL en la membrana (FasLm). Nuestra hipótesis es que el FasLm podría liberarse en su forma soluble (FasLs), atravesar la barrera hemato-testicular (BHT) y unirse al Fas de las CG induciendo apoptosis. La OAE fue inducida por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes. Las ratas del grupo control (C) fueron inyectadas solo con adyuvantes y las del grupo normal (N) no recibieron tratamiento. Los animales fueron sacrificados a los 50 (OAE focal) y 80 (OAE severa, s) días de la primera inmunización. Por citometría de flujo detectamos en la OAE un aumento del porcentaje de macrófagos testiculares que expresan FasLm. El contenido testicular de FasLs (Western blot) evaluado en el fluido testicular fue mayor sólo en las ratas con OAEs (media±SEM, N:0,85±0,04, C:1,00±0,00, OAE:1,59±0,28, p<0,05 vs N y C). Para evaluar la permeabilidad de la BHT al FasLs, inyectamos por vía subalbugínea un FasLs unido al Strep-tag® y analizamos su localización por inmunofluorescencia, con un anticuerpo anti-Strep-tag®. En ratas con OAE, el FasLs-Strep-tag®, se localizó en la luz de los túbulos seminíferos (TS), por dentro de la BHT (identificada por claudina 11). Mediante experimentos in vitro empleando un anticuerpo agonista (Ac-Fas) observamos que la activación del Fas indujo apoptosis de las CG [media±LC %CG-TUNEL+: medio solo: 25,46±(0,82-0,79), Ac-Fas(5µg/ml): 46,77±(1,05-1,05) n=8000-11000 células/grupo, p<0,001, Chi2 test]. Los resultados demuestran que el FasLs, posiblemente liberado por los linfomonocitos intersticiales, es capaz de atravesar la BHT e inducir apoptosis de las CG a través de su interacción con el receptor Fas.

### 039. (173) VIAS DE SEÑALIZACIÓN DIFERENCIALMENTE ACTIVADAS POR LEPTINA EN EL EJE HIPOTALAMO-ADENOHIPOFISIS DE LA RATA

Di Yorio M.<sup>1</sup>; Bilbao M.<sup>2</sup>; Artillo-guida R.<sup>3</sup>; Faletti A.<sup>4</sup>  
*CEFYO, CONICET, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4</sup>*  
*paula\_diyorio@yahoo.com.ar*

La leptina (L) es capaz de ejercer efectos opuestos sobre el proceso ovulatorio dependiendo de los niveles circulantes de esta proteína y en parte de los caminos de señalización activados a nivel ovárico. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar distintas proteínas de señalización en el eje hipotálamo (H)- adenohipofisis(A) de ratas sometidas a distintos niveles de L. Ratas inmaduras estimuladas con eCG/hCG fueron expuestas a: 1) Tratamiento agudo (TA): con vehículo o 5 dosis de L (5 µg c/u) durante el proceso ovulatorio; y 2) Tratamiento diario (TD): con vehículo o 3 µg de L a partir del destete durante 12 días; ya que estos tratamientos causan inhibición e inducción de la ovulación, respectivamente. Después de 1 h de la última inyección de L se determinó: i) la expresión proteica de ERK1/2 (proteína quinasa de activación mitogénica 1/2), STAT3 (transductores de señal y activadores del camino de transcripción tipo 3) y JAK2 (tirosina quinasa de la familia Janus tipo 2) total (t) y fosforilada (p), y de su principal regulador SOCS3 (supresor del camino de señalización de las citoquinas tipo 3) por Western blot; y ii) la expresión del ARNm de SOCS3 por RT-PCR. En ratas sometidas al TA y comparadas con animales controles, encontramos en H disminución de p-ERK1/2 (17%, p<0.05) y aumento de t-ERK1/2 (17%, p<0.05), sin cambios en p-JAK2, t-JAK2 ni SOCS3. En A observamos disminución de p-STAT3 (27%, p<0.05) y p-ERK1/2 (26%, p<0.05) y aumento de t-STAT3 (35%, p<0.01) y SOCS3 (22%, p<0.05), sin alteración en JAK2, t-ERK1/2 ni en ARNm de SOCS3. En cambio, en ratas sometidas al TD encontramos en H aumento de p-ERK1/2 (59%, p<0.01) y t-JAK2 (59%, p<0.0001) y disminución de p-JAK2 (19%, p<0.05), sin alteración en t-ERK1/2,

ni SOCS3. En A no observamos cambios. Estos resultados nos indican que distintos niveles de L circulantes, que causan respuestas opuestas sobre la función ovárica, regulan en forma diferencial distintas vías de señalización en el eje H-A.

### 040. (180) PARTICIPACIÓN DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA KINASA (PDK) EN LA REGULACIÓN HORMONAL DE LA PRODUCCIÓN DE LACTATO EN CÉLULAS DE SERTOLI

Artagaveytia S.<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>; Riera M.<sup>7</sup>  
*CEDIE, CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
*friera@cedie.org.ar*

Una de las funciones importantes de las células de Sertoli (CS) es la producción de lactato (L). Este metabolito de la glucólisis es utilizado como fuente de energía por las células germinales. Un aspecto aún no explorado con respecto a la regulación de la producción de L por CS es aquel que involucra la disponibilidad del piruvato para ser convertido a L. El complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC), que cataliza la conversión de piruvato a Acetil-CoA, regula en forma indirecta la disponibilidad del cetoácido. La actividad del PDC está regulada por su estado de fosforilación. La piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK) lo inactiva por fosforilación. Se han identificado cuatro isoformas de PDK (PDK1 a PDK4) de expresión variable en distintos tejidos. Nuestros objetivos fueron: a) caracterizar la expresión de las isoformas de PDK en CS y b) evaluar si en la estimulación por FSH de la producción de L está involucrada la regulación de la actividad del PDC. Se utilizaron cultivos de CS provenientes de ratas de 20 días de edad. Se observó por RT-PCR que las cuatro isoformas de PDK se expresan en CS. Además, se analizó la producción de L en respuesta a FSH (100ng/ml) en ausencia o presencia de dicloroacetato (DCA, 10mM), inhibidor general de PDKs. Se observó que DCA inhibe parcialmente el estímulo de FSH (B: 8.4±0.7a; FSH: 13.8±0.2b; FSH+DCA: 11.1±0.4c; media±DS, n=3; diferentes letras indican diferencias significativas p<0.05). Por otro lado, se analizó la expresión por RQ-PCR de PDK3, isoforma de alta expresión testicular, observándose que FSH incrementa su expresión. En su conjunto, los resultados sugieren que en CS se expresan las cuatro isoformas de PDK y que la estimulación por FSH de la producción de L involucra, al menos en parte, la regulación de la actividad del PDC a través del aumento en la expresión de PDK3. (PIP2008 N°806; PICT2007 N°1004)

### 041. (296) TGF-BETA1 EN PRESENCIA DE PROGESTERONA ESTIMULA LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE LEYDIG

Gonzalez C.<sup>1</sup>; Calandra R.<sup>2</sup>; Gonzalez-calvar S.<sup>3</sup>  
*Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides<sup>1</sup>; IBYME<sup>2</sup>; IBYME, Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>*  
*gonzalez.candela@maimonides.edu*

El factor de crecimiento transformante beta1 (TGF-β1) participa en la homeostasis celular. En trabajos previos describimos que la administración "in vivo" de esta citoquina junto con progesterona (P4) a ratones de 3 semanas de edad conduce a un aumento en el volumen de las células de Leydig (Gonzalez y col., J.Rep. Dev. 2010). El objetivo del presente trabajo fue estudiar los mecanismos de señalización involucrados en la acción de TGF-β1 en presencia o ausencia de P4 y analizar si TGF-β1 puede ejercer un efecto proliferativo sobre las células de Leydig. Se utilizó la línea celular comercial no tumoral proveniente de ratones inmaduros TM3. Las células fueron cultivadas en Medio DME-Ham F12 (1:1) suplementado con 5% de suero de caballo y 2,5% de suero fetal de ternero. Luego de ser sincronizadas, las células fueron incubadas con TGF-β1 (1ng/ml) durante 5,10,15, 30 y 60 min y se analizó la expresión génica de p15 por Real-time-PCR, factor que bloquea el ciclo celular por inhibición de CDK4/6. La expresión de p15 fue máxima a los 30 min de incubación. La incubación en presencia de U0126 (inhibidor de erk 1/2; 10 µM) SB 203580 (inhibidor de p38; 40 µM) y SP 600125 (inhibidor

de JNK; 20  $\mu$ M) con TGF- $\beta$ 1 indicó que tanto erk 1/2 como p38 están involucradas en este efecto ( $p < 0,05$ ). En presencia de P4, TGF- $\beta$ 1 indujo la expresión de erg-1 y de PCNA a los 5 min de incubación. Mediante el ensayo de proliferación con MTT se pudo establecer que TGF- $\beta$ 1 en presencia de P4 (1  $\mu$ M) conduce a un efecto proliferativo (incremento de 150% en TGF- $\beta$ 1 + P4 respecto de basal, TGF- $\beta$ 1 o P4 individualmente,  $p < 0,05$ ). En este efecto el receptor tipo I ALK-5 no estaría involucrado dado que en presencia de su inhibidor específico SB431542 (1,3 10-6  $\mu$ M) se mantiene el efecto proliferativo de TGF- $\beta$ 1 y P4 ( $p < 0,05$ ). Conclusión: TGF- $\beta$ 1 puede ser el responsable de la hiperplasia observada en algunas patologías dado que en presencia de P4 puede conducir a una proliferación de las células de Leydig.

#### 042. (141) MELATONINA EN EL TESTÍCULO HUMANO: SU INFLUENCIA SOBRE LA POBLACIÓN LOCAL DE MACRÓFAGOS

Rossi S.<sup>1</sup>; Matzkin M.<sup>2</sup>; Terradas C.<sup>3</sup>; Ponzio R.<sup>4</sup>; Puigdomenech E.<sup>5</sup>; Levalle O.<sup>6</sup>; Calandra R.<sup>7</sup>; Frungieri M.<sup>8</sup> *IBYME<sup>1</sup>*; *IBYME, Cátedra de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA<sup>2</sup>*; *División de Endocrinología, Hospital Durand, Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>*; *Centro de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA<sup>4</sup>*; *Instituto Médico PREFER, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>* *soledadrossi3@hotmail.com*

Melatonina (Mel), presenta efectos anti-proliferativos en líneas celulares de mama, ovario, coriocarcinoma, próstata, colon, melanoma y neuroblastoma. Recientemente, hemos descripto la presencia de Mel en el testículo del hámster, y su rol inhibitorio sobre la producción de testosterona. El objetivo del presente trabajo ha sido investigar la presencia de Mel en el testículo humano, y su influencia sobre la proliferación de los macrófagos (MAC) gonadales. Se emplearon biopsias testiculares de pacientes que presentan Hipoespermatogénesis y Arresto Germinal. La concentración testicular de Mel, determinada a través de un ensayo de ELISA (pg / g de tejido: 19.317 + 2.008, n=7), correlacionó negativamente con la expresión del antígeno de proliferación celular (PCNA, Western blot y densitometría) ( $r = 0,847$ ,  $P < 0,05$ ), y con el número de MAC totales ( $r = 0,877$ ,  $P < 0,05$ ), intersticiales ( $r = 0,838$ ,  $P < 0,05$ ), intra-tubulares ( $r = 0,860$ ,  $P < 0,05$ ), y aquellos localizados en la pared tubular ( $r = 0,797$ ,  $P < 0,05$ ). El número de MAC fue determinado por inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico para CD68 (marcador de MAC) y un microscopio equipado con un ocular graduado. Mediante la técnica de microdissección por captura láser y amplificación por RT-PCR, se detectó la expresión de TNF $\alpha$  y de su receptor TNF-R1 en MAC del testículo humano. La concentración testicular de Mel mostró una correlación negativa con los niveles de expresión de esta citoquina ( $r = 0,810$ ,  $P < 0,05$ ). Por otra parte, se utilizó la línea celular THP-1 (macrófagos humanos diferenciados a partir de monocitos por estímulo con forbol-miristato-acetato). Su incubación en presencia de Mel, produjo una inhibición significativa en la expresión de PCNA y TNF $\alpha$  determinadas por Western blot y PCR en tiempo real. En resumen, se detectó la presencia de Mel en el testículo humano patológico, su rol anti-proliferativo sobre la población local de MAC, y su efecto inhibitorio sobre la expresión de TNF $\alpha$  en estas células inmunes.

#### 043. (10) ONTOGENIA DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS ALFA Y BETA, ENZIMA AROMATASA Y RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN EL TESTÍCULO DE LA VIZCACHA (LAGOSTOMUS MAXIMUS)

Gonzalez C.<sup>1</sup>; Muscarse Isla M.<sup>2</sup>; Leopardo N.<sup>3</sup>; Willis M.<sup>4</sup>; Vitullo A.<sup>5</sup> *Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides<sup>1,2,3,4,5</sup>* *gonzalez.candela@maimonides.edu*

En mamíferos los andrógenos y estrógenos regulan la función testicular a lo largo del desarrollo. Los andrógenos han sido muy estudiados dado su rol en la regulación de la espermatogénesis

y fertilidad. Poco se conoce sobre el efecto de los estrógenos. Su acción es mediada por receptores específicos alfa (RE $\alpha$ ) y beta (RE $\beta$ ) y se postula que modularían la proliferación celular. El objetivo de este trabajo fue estudiar la localización y expresión del receptor de andrógenos (RA), RE $\alpha$  y  $\beta$  y de la enzima sintetizadora de estrógenos (aromatasa, ARO) mediante inmunohistoquímica y Real Time PCR y establecer una posible relación con la proliferación de células germinales (CG) mediante el análisis inmunohistoquímico de marcadores de proliferación (PCNA) y de CG (VASA) en testículos fetales (F), perinatales (P), prepuberales (PP) y adultos (A) de la vizcacha, *Lagostomus maximus*. La expresión de PCNA en CG se mantuvo elevada hasta el período prepubebral mientras que el número de CG positivas para VASA fue significativamente mayor en testículos A y PP (F: 67,9 $\pm$ 8,8, P: 69,5 $\pm$ 3,1, PP: 93,2 $\pm$ 4,4, A: 96,3 $\pm$ 7,5,  $p < 0,05$ ). El RE $\alpha$  se localizó en CG y células de Sertoli (CS) en testículos F, P y PP, y en células de Leydig (CL) de animales A. La expresión del RE $\alpha$  fue significativamente mayor en testículos F y P respecto de PP y A (F: 0,2 $\pm$ 0,11, P: 0,2 $\pm$ 0,06, PP: 0,5 $\pm$ 0,02, A: 0,06 $\pm$ 0,02,  $p < 0,05$ ). El RE $\beta$  se localizó en CL y su expresión fue mayor en testículos P respecto de F, PP y A ( $p < 0,05$ ). ARO se localizó en CL y su expresión fue mayor en testículos F y P ( $p < 0,05$ ). RA se detectó en las CL durante toda la ontogenia y en testículos PP y A también se localizó en CS. Estos resultados sugerirían que los estrógenos producidos por ARO podrían actuar vía RE $\alpha$  estimulando la proliferación de CG desde el período F hasta el PP. Así, la ausencia del RE $\alpha$  de las CG en A podría estar relacionada con la aparición del RA en CS para favorecer el proceso espermatogénico en el testículo de *Lagostomus maximus*.

#### 044. (405) ACTIVIDAD DIFERENCIAL DEL PROTEASOMA EN SEGMENTOS DE EPITELIO SEMINÍFERO DE RATÓN

Zapata Carmona H.<sup>1</sup>; Morales Retamal P.<sup>2</sup>; Diaz Lois E.<sup>3</sup>; Jara Gonzalez M.<sup>4</sup> *Laboratorio de Biología de la Reproducción, Departamento Biomédico, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Antofagasta<sup>1,2,3,4</sup>* *hectorzapata.c@gmail.com*

Durante la espermatogénesis de mamíferos existen transformaciones celulares que implican, entre otras, degradación de proteínas. Parte de esta degradación es mediada por el sistema ubiquitina proteasoma (SUP) la que se detecta en todos los estados del ciclo del epitelio seminífero (ECES). Dado que cada ECES agrupa células en diferentes estadios funcionales, nuestra hipótesis plantea que existiría distinta actividad del proteasoma en los diferentes ECES. Para esto, obtuvimos por transiluminación segmentos de túbulos seminíferos de ratones sexualmente maduros, que agrupan los ECES IX - XI (PZ); XII - II (WS); III - V (SS); y VI - VIII (DZ). Dichos segmentos fueron homogenizados y en el extracto proteico se evaluó, usando sustratos fluorogénicos, las tres actividades enzimáticas del proteasoma. Los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de un inhibidor específico (epoxomicina). Además, se detectó por Western blots (Wb), la presencia de las subunidades estructurales y catalíticas del proteasoma y la presencia de proteínas poliubiquitinadas en los diferentes ECES. Los resultados muestran que las 3 actividades enzimáticas del proteasoma son diferentes en los segmentos analizados y que la epoxomicina disminuye considerablemente estas actividades. Los análisis de Wb indican que no existen diferencias en la expresión de las subunidades estructurales o subunidades con actividad catalítica del proteasoma en los diferentes ECES. Igualmente, no se encontraron diferencias en los patrones electroforéticos de proteínas poliubiquitinadas. Para indagar en los mecanismos de regulación, realizamos ensayos de inmunoprecipitación en condiciones no reductoras y Wb utilizando anticuerpos contra proteínas fosforiladas. Los resultados muestran diferencias en los patrones de bandas fosforiladas en los segmentos analizados. Los resultados sugieren que el proteasoma estaría diferencialmente regulado por fosforilación en los ECES. Financiamiento Fondecyt 1080028 y CODEI 2010.

## MODELOS ANIMALES 1

### 045. (249) PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *CAR BACILLUS* EN COLONIAS DE RATAS DE LA REPÚBLICA ARGENTINA.

Carriquiriborde M.<sup>1</sup>; Cagliada P.<sup>2</sup>; Laborde J.<sup>3</sup>; Milocco S.<sup>4</sup>; Ayala M.<sup>5</sup>; Carbone C.<sup>6</sup>

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 mcarriri@fcv.unlp.edu.ar

La rata (*Rattus norvegicus*), al igual que el ratón (*Mus musculus*), son las especies más comúnmente usadas como animales de experimentación en las investigaciones biomédicas, en las pruebas de diagnóstico y de control de calidad. Su biología y fisiología se han estudiado en profundidad por lo que se han descubierto una cantidad importante de enfermedades inaparentes producidas por virus y bacterias que interfieren en las investigaciones. El bacilo asociado al epitelio ciliar respiratorio (*CAR bacillus*) es un microorganismo, no clasificado, Gram negativo, móvil, que no forma esporas y que originalmente fue reconocido como causante de neumonía en ratas. Su nombre se debe a que esta bacteria coloniza las ciliadas del epitelio del tracto respiratorio superior. La primera descripción fue hecha por Zwieten en 1980, en una colonia de ratas del Instituto de Investigaciones Gerontológicas en Rijswijk, Holanda. En los roedores infectados produce traqueítis, bronquitis y bronconeumonía. En cortes histológicos de animales infectados y teñidos con sales de plata se puede visualizar la morfología del *CAR bacillus* y su ubicación entre las ciliadas. En el presente estudio se controlaron 342 sueros de ratas de instituciones estatales y privadas en un período de 3 años (2008-2010) por el método serológico de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los resultados que se obtuvieron fueron del 20,83 %, 23,16 % y 21,36 % respectivamente para cada año, cuyo promedio trianual es de 21,64%. Por los resultados obtenidos, se puede concluir que esta bacteria se encuentra en las colonias de ratas de Argentina. En este sentido y dado que este patógeno interfiere en los resultados finales de pruebas diagnósticas y de investigación, debe asegurarse que las colonias de ratas estén libres de este microorganismo para evitar falsas conclusiones.

### 046. (147) DESARROLLO DE MODELOS MURINOS PARA ESTUDIAR EL PAPEL DE LOS ANTICUERPOS HOMOTÍPICOS Y HETEROTÍPICOS EN LA FIEBRE HEMORRÁGICA DEL DENGUE

Mauri A.<sup>1</sup>; Díaz L.<sup>2</sup>; Batallé J.<sup>3</sup>; Acosta P.<sup>4</sup>; Polack F.<sup>5</sup>; Talarico L.<sup>6</sup>

Fundación Infant<sup>1 2 3 4 6</sup>; Vanderbilt Vaccine Center, Medical Center North, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA<sup>5</sup>  
 amauri@infant.org.ar

El virus dengue (DENV) produce la enfermedad transmitida por artrópodos con mayor prevalencia en humanos. Actualmente no se dispone de una terapia antiviral ni vacunas contra DENV. El 90% de los casos de la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) sucede en infecciones secundarias heterólogas, mientras que el 10% afecta a niños lactantes durante infecciones primarias. La hipótesis más aceptada para explicar el mecanismo de la FHD propone que en presencia de concentraciones sub-neutralizantes de anticuerpos (ac) anti-DENV se forman complejos virus-ac que facilitan la entrada viral a células fagocíticas. En niños lactantes, el aumento de replicación viral se produciría con la disminución de los ac maternos. El objetivo de este trabajo es establecer modelos murinos de FHD con el fin de estudiar mecanismos mediados por complejos inmunes responsables de la enfermedad. La estrategia utilizada constó de una transferencia pasiva de sueros anti-DENV-1, anti-DENV-2 o control a ratones C57BL/6 de 14 y 60 días de vida por vía intraperitoneal (IP). A las 24 hs post-inoculación se realizó la infección con DENV-2 con 104-106 UFP IP. A los 0, 3 y 7 días post-infección se extrajo sangre, se determinaron los parámetros bioquímicos y se detectó la cantidad de virus por RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) y la cantidad de ac por ensayo de ELISA. Se analizaron los cortes histológicos

de bazo, hígado y riñón, y se estudió la presencia de DENV-2 en esos mismos órganos por qRT-PCR. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales de la Universidad de Vanderbilt y realizados de acuerdo a las normas éticas internacionales para el uso de animales de laboratorio. Los modelos murinos de FHD desarrollados manifiestan síntomas de la enfermedad observados en humanos: trombocitopenia, transaminitis y hemorragias internas. Este trabajo permitirá estudiar los mecanismos de la patogénesis de la FHD y contribuirá al desarrollo de vacunas y tratamientos contra la enfermedad.

### 047. (266) ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA CAUSADA POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN RATONES DE LA CEPA BALB/C-CANN.CG-FOXN1NU TRANSPLANTADA CON LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549.

Ayala M.<sup>1</sup>; Cagliada M.<sup>2</sup>; Milocco S.<sup>3</sup>; Carriquiriborde M.<sup>4</sup>; Gentil F.<sup>5</sup>; Laborde J.<sup>6</sup>; Maschi F.<sup>7</sup>; Principi G.<sup>8</sup>; Carbone C.<sup>9</sup>

Cátedra de Animales de Laboratorio, FCV, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
 mayala@fcv.unlp.edu.ar

Entre las cepas de ratones inmunodeficientes disponibles en Argentina se encuentra la BALB/c-CAN.Cg-Foxn1nu. Se utiliza como modelo animal para el trasplante de tumores humanos. Estos ratones se producen bajo estrictas barreras sanitarias y deben estar libres de sus patógenos específicos; uno de ellos, oportunista y de los más frecuentes es *Pseudomonas aeruginosa* que afecta oído medio, produce abscesos y lesiones purulentas en diferentes órganos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que causa *Pseudomonas aeruginosa* en ratones BALB/c-CAN.Cg-Foxn1nu transplantados con la línea tumoral humana A549. Cuarenta ratones hembras BALB/c-CAN.Cg-Foxn1nu de 4 a 6 semanas se dividieron en cuatro grupos (G) de 10 animales cada uno: G1, transplantados con la línea tumoral A549; G2, inoculados con *Pseudomonas aeruginosa*; G3, transplantados con la línea tumoral e inoculados con *Pseudomonas aeruginosa* y G4 control. Siete de los 10 animales del G1 presentaron crecimiento tumoral, los ratones del G2 no mostraron signos clínicos; los animales del G3 no demostraron signología clínica y el desarrollo tumoral se comportó como en el G1; a la necropsia se aisló *Pseudomonas aeruginosa* en los animales del G2 y G3; el G4 no presentó lesiones y no se aisló el microorganismo. Se concluyó que las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* no son fatales en ratones BALB/c-CAN.Cg-Foxn1nu y que esta bacteria no interfiere en el desarrollo del tumor.

### 048. (245) UTILIZACIÓN DEL RATÓN BALB/C EN LA CARACTERIZACIÓN PATOGENICA DE CEPAS DE TRITRICHOMONAS FOETUS

Doumeq L.<sup>1</sup>; Monteavaro C.<sup>2</sup>; Cacciato C.<sup>3</sup>; Echevarría H.<sup>4</sup>; Soto P.<sup>5</sup>

Laboratorio de Microbiología Clínica y Experimental, SAMP, FCV, UNCPBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 ldoumeq@vet.unicen.edu.ar

La Tritrichomonosis genital bovina es una enfermedad venérea producida por *Tritrichomonas foetus* (T. foetus) que provoca muerte embrionaria o abortos. En las hembras el período de infección depende de la respuesta inmune del huésped y de la patogenicidad de la cepa, tales como la capacidad de citoadherencia y producción de enzimas extracelulares. Existen trabajos experimentales para determinar la patogenicidad de la cepa, sin embargo aún no está esclarecido cuáles son los parámetros más adecuados. El objetivo del presente trabajo fue comparar dos parámetros de patogenicidad en aislamientos de T. foetus. A 18 cepas de T. foetus aisladas de raspajes prepuciales subcultivadas en medio Diamond (TYM) se les realizaron dos pruebas. A) Producción de abscesos subcutáneo: se utilizaron 3 ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad por cepa. Se inoculó por vía subcutánea en la región del dorso 0.5 ml de T. foetus lavadas con una concentración de 1 x 10<sup>6</sup> T. foetus/mL y se verificó la presencia/ausencia de absceso por palpación en la zona de inoculación. Los animales positivos fueron sacrificados a los 5 días y los negativos a los 10 días pos inoculación. El contenido del absceso se observó

microscópicamente y se sembró en medio TYM y agar sangre. B) Infección y persistencia vaginal: cada cepa se inoculó por vía intravaginal, previa sincronización del estro, a 5 ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad con 2 dosis (con intervalo de 24 h) de 10 µL (9 x 10<sup>5</sup> T.foetus). Cada 7 días se realizó citología exfoliativa vaginal para determinar la persistencia del protozooario por 5 semanas. De las 18 cepas analizadas 10 presentaron formación de absceso subcutáneo. En cuanto a la infección intravaginal 17 cepas presentaron infección persistente (2 cepas con alto porcentaje, de animales infectados). Como conclusión la mayoría de las cepas con producción de absceso presentaron baja persistencia de infección intravaginal y viceversa. Estos resultados son parte de un proyecto de caracterización.

**049. (264) ESTUDIO DE LA PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DIMINUTO DEL RATÓN EN COLONIAS DE RATONES DE LA REPÚBLICA ARGENTINA.**

Laborde J.<sup>1</sup>; Carriquiriborde M.<sup>2</sup>; Cagliada P.<sup>3</sup>; Milocco S.<sup>4</sup>; Ayala M.<sup>5</sup>; Cid De La Paz V.<sup>6</sup>; Galosi C.<sup>7</sup>; Carbone C.<sup>8</sup>  
*Cátedra de Animales de Laboratorio, FCV, UNLP<sup>1</sup>; Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, FCV, UNLP<sup>2,3,4,5,8</sup>; Cátedra de Virología, FCV, UNLP, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires<sup>6,7</sup>*  
 juanmartinlaborde@gmail.com

La presencia de agentes infecciosos en animales de laboratorio es un serio problema en las investigaciones biomédicas. Algunos microorganismos patógenos pueden inducir signos clínicos o causar infecciones subclínicas y modificar parámetros fisiológicos con alteraciones en los resultados experimentales. El Virus Diminuto del Ratón (MMV) pertenece a la Familia Parvoviridae y es de alta prevalencia en colonias de ratones y un contaminante de tumores trasplantables. El MMV requiere de células en división para replicarse. La misma se produce en órganos como el páncreas, intestino delgado, órganos linfoides, hígado y riñones. El virus se libera y transmite a través de las heces y la orina. Los animales sanos se infectan al ponerse en contacto con el animal enfermo o heces y orina provenientes del mismo. El virus ingresa por vía oronasal para luego diseminarse. La signología clínica se manifiesta diferente en animales inmunocompetentes y en inmunodeficientes. En general los primeros no manifiestan la enfermedad clínica a menos que estén sometidos a un estrés, mientras que en los segundos es más frecuente observar alteraciones en su comportamiento y en su anatomofisiología. También puede reducir la tasa de crecimiento tumoral directamente o impedir su desarrollo (oncólisis), interfiere con la selección de nuevos trasplantes y provoca una reducción química de los tumores. En el presente estudio se controlaron 616 sueros de ratones provenientes de instituciones estatales y privadas en un periodo de 4 años (2007-2010) por el método serológico de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los resultados que se obtuvieron fueron del 15,38 %, 22,84 %, 17,78 % y 29,89 respectivamente para cada año y un promedio general de 21,92 %. Se concluyó que la prevalencia de este virus en colonias convencionales de nuestro país respondería a que no se han establecido suficientes unidades de producción y experimentación que cuenten con una infraestructura eficiente y un manejo adecuado.

**050. (648) AUCYTAL - ASOCIACIÓN URUGUAYA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ANIMALES DE LABORATORIO.**

Arévalo A.<sup>1</sup>; Möller R.<sup>2</sup>; Saldaña J.<sup>3</sup>; Urbanavicius J.<sup>4</sup>; Francescoli G.<sup>5</sup>; Schlapp G.<sup>6</sup>  
*Instituto Pasteur de Montevideo<sup>1</sup>; AUCyTAL<sup>2,3,4,5,6</sup>*  
 aparevalo@pasteur.edu.uy

La Asociación Uruguaya de Ciencia y Tecnología de Animales de Laboratorio es una asociación sin fines de lucro de carácter científico, creada en noviembre de 2006. Esta organización, donde participan instituciones universitarias y no universitarias públicas y privadas, surgió ante la necesidad de generar un espacio común de trabajo e intercambio entre investigadores y usuarios de animales de experimentación. Cumpliendo con uno de sus principales objetivos, la AUCyTAL promovió la redacción de la

Ley Nacional N° 18.611 "Utilización de Animales en Actividades de Experimentación, Docencia e Investigación Científica", aprobada en 2009, posteriormente integrando la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) creada en dicha Ley. Los fines de la AUCyTAL son: Racionalizar y mejorar el uso de los animales de experimentación y promover la relación e intercambio de conocimientos entre los profesionales de esta ciencia; Difundir y aplicar la Ley 18.611 así como principios éticos en uso de animales de experimentación; Asesorar a las Comisiones de Ética en el Uso de Animales (C.E.U.A), exigidos en la Ley 18.611; Desarrollar las relaciones interdisciplinarias en relación a la Ciencia de Animales de Experimentación; Promover el relacionamiento y colaboración con entidades extranjeras y asociaciones dedicadas a fines análogos. Desde su creación ha participado en congresos de asociaciones similares. A través del dictado de cursos, talleres y/o seminarios la AUCyTAL ha procurando transmitir y concientizar sobre la importancia de realizar un manejo responsable y uso racional de animales utilizados en experimentación. Estas actividades han contado con la participación de profesores extranjeros y nacionales reconocidos internacionalmente. Cabe destacar que en julio de 2011, la AUCyTAL co-organizó junto a la Escola Politécnica J. Venâncio (Fundação Oswaldo Cruz, Brasil) el primer curso de Bioseguridad en Bioterios realizado en Montevideo.

**051. (312) EFECTO DE NUCLEÓTIDOS EXTRACELULARES EN LA DIFERENCIACIÓN DE OSTEÓBLASTOS DE RATA NEONATA E IMPLICANCIA EN EL CICLO CELULAR.**

Ayala P V.<sup>1</sup>; Santillán G.<sup>2</sup>  
*Departamento Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur, CONICET<sup>1,2</sup>*  
 vayala@criba.edu.ar

El hueso se encuentra expuesto a diferentes estímulos mecánicos, durante los movimientos, injuria e inflamación durante los traumatismos, que resultan en la liberación celular de ATP y UTP. Así estos nucleótidos o sus metabolitos pueden actuar sobre receptores P2 (P2X, ionotrópicos y P2Y, metabotrópicos) de la membrana plasmática para inducir diversas respuestas en las células óseas. Previamente, mediante el empleo de la línea celular ROS17/2.8 y cultivos primarios de osteoblastos obtenidos de calvaria de rata neonata, evidenciamos que el ATP estimula la proliferación de osteoblastos a través de la activación de receptores P2Y2 y las vías de señalización de las MAPKs y PI3K/Akt. También, observamos un incremento significativo (33 % respecto al control) en la actividad fosfatasa alcalina (FAL) luego de 7 días de tratamiento de los osteoblastos primarios con ATP 10 µM en un medio osteogénico (conteniendo ácido ascórbico 300 µM y β-glicerofosfato 10 nM). En el presente trabajo estudiamos la participación de los diferentes subtipos de receptores P2 en la estimulación de la actividad FAL y su efecto a nivel del ciclo celular en ambos tipos celulares. Se evaluó la respuesta a distintos agonistas purinérgicos (UTP, UDP, ADP, ATP-γ-S) en función del tiempo de tratamiento. La actividad FAL se determinó por un método enzimático y para estudiar el ciclo celular se realizaron experimentos de incorporación de yoduro de propidio (PI) seguido del análisis por citometría de flujo. El tratamiento con ATP ó ATP-γ-S 10 µM estimuló el pasaje de la fase G1 a S del ciclo celular a las 16 hs de tratamiento. Además, el ATP, ATP-γ-S y UTP 10 µM indujeron un aumento en la actividad FAL a partir del cuarto día en los osteoblastos primarios, mientras que la línea celular resultó refractaria a este efecto. Estos resultados sugieren un rol para los receptores P2Y2 (responsivos a ATP y UTP) en la maduración de osteoblastos.

**052. (558) EFECTOS METABÓLICOS DEL CONSUMO DE ACEITE DE GIRASOL ALTO OLEICO DURANTE EL CRECIMIENTO**

Orzuza R.<sup>1</sup>; Alsina E.<sup>2</sup>; Gatchenko M.<sup>3</sup>; Mancuso A.<sup>4</sup>; Rodríguez P.<sup>5</sup>; Zago V.<sup>6</sup>; Scherier L.<sup>7</sup>; Friedman S.<sup>8</sup>; Macri E.<sup>9</sup>  
*Facultad de Odontología, UBA<sup>1</sup>; Cátedra de Bioquímica, Facultad de Odontología, UBA<sup>2,3,4,5,8,9</sup>; Laboratorio Lípidos y Lipoproteínas, INFIBIOC, Fac Farmacia y Bioquímica, UBA<sup>6,7</sup>*  
 orzuzaricardo@hotmail.com

El aceite de girasol alto oleico (AGAO, rico en  $\omega 9$ ) se está utilizando de forma masiva en diferentes productos alimentarios. Sin embargo, el efecto metabólico de su consumo tanto en individuos sanos como en hipercolesterolémicos (HC) no ha sido suficientemente estudiado. Objetivo: investigar en ratas en crecimiento sanas o con HC, el efecto del consumo de dietas ricas en AGAO sobre el crecimiento corporal, los parámetros cardioprotectores [colesterol total (col-T), triglicéridos (TG), Col-HDL y Col-noHDL], el índice hepatosomático (IH), el % de grasa corporal (% G) y %visceral (%GV) y la densidad (DMO) y contenido mineral óseo (CMO) de esqueleto total. Ratas Wistar macho (n=24) de  $21 \pm 2d$  fueron asignadas aleatoriamente a uno de 3 grupos. Durante 8 semanas, el grupo control (C) recibió dieta AIN-93G y el grupo AGAO, aceite de girasol alto oleico. El restante, recibió por 3 semanas (T3) una dieta aterogénica rica en grasa saturada (GS) y Col. Luego por 5 semanas (T8) se reemplazó la GS por AGAO + col (col-AGAO). A T3 se midió en los 3 grupos la colesterolemia total (col-T, mg/dL) y a T8: col-T (mg/dL), triglicéridos (TG, mg/dL), col-HDL (mg/dL), col-noHDL (mg/dL), DMO (g/cm<sup>2</sup>) y CMO (g) totales (DXA, Lunar DPX); IH, %G y %GV. Semanalmente se registraron peso (P, g) y longitud (L, cm) corporales expresados como velocidad de ganancia de peso (VGP, g%) y longitud (VGL, cm/10cm) corporales y el consumo (g/P 0.75/d). Resultados (media  $\pm$  DE, ANOVA. SNK, nivel de significación 5%). A T3, se observó hipercolesterolemia en col-AGAO. A T=8, consumo, IH, % G, %GV, TG, col-T y noHDL-col fueron significativamente mayores en col-AGAO vs. C y AGAO (p<0.001). Contrariamente, VPG, HDL-Col, CMO, CMO/P y DMO resultaron menores en col-AGAO vs. C y AGAO. El efecto negativo sobre los parámetros cardioprotectores y la masa ósea sugieren que el manejo nutricional de individuos con HC no resultaría adecuado con dietas ricas en  $\omega 9$  provenientes del AGAO. UBACyT O-008 y O-015.

- 053. (285) ESTRADIOL (E2) Y PROGESTERONA (PO) FECALES EN MONAS CEBUS APELLA CICLANDO, POSTMENOPAÚSICA Y CASTRADA. COMPARACIÓN CON LOS VALORES PLASMÁTICOS DEL CICLO MENSTRUAL.** Farinati Z.<sup>1</sup>; Gette G.<sup>2</sup>; Moreno Ayala M.<sup>3</sup>; Porta M.<sup>4</sup>; Lahoz M.<sup>5</sup>; Manzur T.<sup>6</sup>; Nagle C.<sup>7</sup>  
CEMIC<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
zfarinati@cemic.edu.ar

La investigación en reproducción requiere obtener datos hormonales, siendo de elección los valores en plasma. Trabajando con el mono Cebus apella en cautiverio son necesarias punciones venosas repetidas, por lo que el trabajo es laborioso y puede provocar estrés en los animales, afectando los resultados. Por tal razón nuestro objetivo fue encontrar un método no invasivo de medición hormonal de igual precisión que el plasmático. Como en el Cebus los esteroides se eliminan no conjugados, desarrollamos una metodología que extrae los esteroides de materia fecal con etanol absoluto, evapora a sequedad, resuspende el residuo en buffer y mide E2 y Po por inmunoensayo. Para validarlos se obtuvieron muestras diarias durante 14 días del ciclo de una mona en edad fértil. La punción venosa se efectuó a las 9 hs y la recolección de materia fecal entre las 9:30 y las 16:30 hs (7hs totales). Se midieron E2 y Po en plasma y en heces. La comprobación fisiológica se completó con datos fecales de mona postmenopáusica y de mona castrada. Los resultados fueron los siguientes: A) En ciclo menstrual, la relación de E2 plasmático en pg/mL/ E2 fecal en ug/7hs fue: 455/10 el día 1, 706/59 el día 5 y 539-41 el día 14; la relación Po plasmática en ng/mL/Pofecal en ug/7hs: 20/9 el día 1; 85/9 el día 5; 219/87 el día 11 y 10/16 el día 14 B) En postmenopausa, en 3 semanas sucesivas, el E2 fue 4,5; 5,5; y 7,4, y la Po 3,3; 1,2; y 2,7, todos en ug/7hs. C) En mona castrada: a los 13, 19, 26 y 34 días postcastración el E2 fecal fue 0,31; 0,32; 0,23 y 0,19, y la Po fecal 2,8; 2,7; 3,3; y 1,8, todos en ug/7hs. La conclusión sobre los resultados obtenidos es que permiten aceptar la validez de las mediciones de E2 y Po fecales en el Cebus apella, como alternativa válida a las mediciones plasmáticas.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 1

- 054. (24) RSUME REGULA LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES POR SUMOILACIÓN**  
Druker J.<sup>1</sup>; Gerez J.<sup>2</sup>; Rein T.<sup>3</sup>; Holsboer F.<sup>4</sup>; Arzt E.<sup>5</sup>  
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires, CONICET, Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 5</sup>; Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania<sup>3 4</sup>  
jimedruker@fbmc.fcen.uba.ar

El sistema endócrino responde al estrés secretando glucocorticoides (GC), los cuales ejercen su acción a través del receptor de glucocorticoides (GR). La actividad del GR está regulada por SUMOilación. Se han descrito tres sitios consenso de SUMOilación para el GR: K297 y K313 localizados en el N-terminal, mientras que el tercer sitio (K721) está en el dominio de unión al ligando. La mutación K297/313R (2KR) aumenta la actividad transcripcional del GR medida sobre promotores con múltiples elementos de respuesta a GC. RSUME aumenta la SUMOilación de proteínas. En este trabajo analizamos la acción de RSUME sobre la SUMOilación y la función del GR. Mediante ensayos de western blot demostramos que RSUME aumenta la SUMOilación del GR y este efecto no se observa con la mutante estructural de RSUME (Y61A/P62A). La sobreexpresión de RSUME aumenta la actividad transcripcional del GR y de la mutante 2KR (p < 0.05) medida por ensayos reporteros, mientras que Y61A/P62A no tiene efecto, indicando la importancia del dominio RWD para la acción de RSUME. Ensayos de co-inmunoprecipitación y pull-down demuestran que RSUME interacciona con el GR y con la mutante 2KR. A través de ensayos de purificación de proteínas conjugadas a 6xHis-SUMO por cromatografía de afinidad a níquel observamos que RSUME aumenta la SUMOilación del 2KR. RSUME no estimula la SUMOilación de la mutante K297/313/721R (3KR) indicando que RSUME aumenta la SUMOilación del tercer sitio. Ensayos reporteros utilizando las mutantes K721R y 3KR, demuestran que en ausencia de K721, RSUME no aumenta la actividad del GR, sugiriendo que la lisina 721 es necesaria para el efecto positivo de RSUME sobre la actividad transcripcional del GR. RSUME se induce en condiciones de estrés y regula la actividad del GR, constituyendo un potencial blanco para modular las acciones de los GC.

- 055. (33) CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR LA HORMONA CRH EN CÉLULAS NEURONALES HIPOCAMPALES**  
Inda C.<sup>1</sup>; Bonfiglio J.<sup>2</sup>; Holsboer F.<sup>3</sup>; Arzt E.<sup>4</sup>; Silberstein S.<sup>5</sup>  
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires, CONICET, Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 4 5</sup>; Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich<sup>3</sup>  
carolinainda@fbmc.fcen.uba.ar

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) ejerce un rol clave en la respuesta coordinada frente al estrés. Además de mediar una respuesta aguda a través de la activación del eje hipófisis-hipotálamo-adrenal, CRH puede determinar un efecto a largo plazo en el sistema nervioso central (SNC) como regulador de la arquitectura neuronal. La expresión de CRH está ampliamente distribuida en el SNC y la desregulación de la función de CRH en estructuras límbicas se encuentra involucrada en el desarrollo de estadios patológicos como ansiedad/depresión. Nuestro modelo de estudio son las células hipocámpales HT22 que expresan el receptor de CRH tipo 1 (HT22-CRHR1). En estas células detectamos la expresión de marcadores neuronales (Tau, Neurofilamento y APC). Observamos que CRH 100 nM induce el crecimiento de neuritas en los clones HT22-CRHR1. Nuestro objetivo es caracterizar las vías de señalización involucradas en los cambios morfológicos mediados por CRH en HT22-CRHR1. Demostramos que la acción de CRH está mediada por CRHR1, ya que este cambio no se observó en la línea parental HT22 (no



expresa CRHR1) y se inhibió ( $p < 0,05$ ) en clones preincubados con DMP696 (antagonista específico para CRHR1). A su vez, el efecto inductor de CRH es bloqueado cuando el estímulo se realiza en presencia de suero, un agente proliferativo. Confirmamos que el crecimiento de neuritas depende de la vía de AMPc, dado que el agregado del análogo CPT-AMPc induce cambios morfológicos tanto en los clones HT22-CRHR1 como en la línea parental. Además, utilizando inhibidores específicos de adenilato ciclasas (AC), comprobamos que la atípica y novedosa isoforma soluble (sAC) está involucrada en la aparición de neuritas mediada por CRH. Este estudio contribuye a describir los mecanismos implicados en la acción de CRH en el SNC y a establecer un bioensayo basado en la inducción de neuritas que podrá ser utilizado para la prueba de moléculas dirigidas al sistema de CRH/CRHR1 con potencial utilidad terapéutica.

**056. (222) IDENTIFICACIÓN DE LA TIROSINA FOSFATASA SHP2 COMO MEDIADORA DE LA INDUCCIÓN DE ACSL4 Y STAR Y PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES ESTIMULADAS POR AMPc EN CÉLULAS DE LEYDIG MA-10**

Cooke M.<sup>1</sup>; Orlando U.<sup>2</sup>; Maloberti P.<sup>3</sup>; Podesta E.<sup>4</sup>; Cornejo Maciel F.<sup>5</sup>

Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
mcooke@fmed.uba.ar

La activación de tirosina fosfatasas (TPs) es un proceso universal necesario para la síntesis de esteroides en zona fasciculata y glomerulosa de glándula adrenal y en células de Leydig testiculares. La defosforilación de proteínas en residuos de tirosina se requiere luego de la producción de AMPc para la inducción de una proteína clave de la cascada de transducción de la señal hormonal: la acil-CoA sintetasa 4 (ACSL4). Previamente verificamos que la sobreexpresión de una forma catalíticamente activa de la TP SHP2 en células de Leydig MA-10 incrementa la inducción de ACSL4, de StAR y de la esteroidogénesis estimuladas por el segundo mensajero cAMP. Los efectos observados podrían deberse a un efecto inespecífico ejercido por los altos niveles de la SHP2, reemplazando la función de otra TP. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar que la SHP2 es la fosfatasa endógena necesaria para regular los niveles de ACSL4, StAR y esteroidogénesis. Para ello se disminuyeron los niveles endógenos de la SHP2 en células de Leydig de la línea MA-10, utilizando un shRNA específico para esta TP. El knock down de SHP2 produjo una disminución significativa en la producción de progesterona (P4) estimulada por 8Br-AMPc (concentración P4 en el medio de cultivo, en ng/ml: mock + cAMP =  $60 \pm 12$  vs SHP2-shRNA + cAMP =  $34 \pm 5$ ;  $p < 0,05$ ). La disminución en los niveles de SHP2 también disminuyó los niveles de ACSL4 ( $p < 0,01$  vs mock) y StAR ( $p < 0,001$  vs mock) analizadas por Western Blot. La participación de SHP2 en la regulación de la esteroidogénesis a través de ACSL4 fue corroborada por estudios de cotransfección en los que se realizó el knock down de ACSL4 en células MA-10 que sobreexpresan SHP2. Concluimos que SHP2 es la TP que interviene en la activación de la esteroidogénesis y que lo hace a través de la inducción de ACSL4.

**057. (341) PARTICIPACIÓN DE AMPc-EPAC EN LA ADIPOGÉNESIS DE FIBROBLASTOS 3T3-L1**

Gabrielli M.<sup>1</sup>; Martini C.<sup>2</sup>; Vila M.<sup>3</sup>

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 3</sup>  
mgabrielli@qb.fcen.uba.ar

La diferenciación de fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos es estimulada por una mezcla que contiene insulina, dexametasona y metilisobutilxantina (MIX). Este proceso es precedido por una etapa proliferativa llamada expansión clonal mitótica (ECM). MIX aumenta el contenido de AMPc, que es el activador de la proteína quinasa A (PKA). Sin embargo, recientemente se describió una respuesta de AMPc independiente de PKA, mediada por la proteína intercambiadora de GTP activada por AMPc (EPAC). En este trabajo encontramos que H89, un inhibidor de PKA, bloqueó la ECM pero no la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1, que por otro lado no ocurrió en ausencia de MIX en la mezcla de

diferenciación. La diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos, evaluada por tinción con Oil-Red-O o cuantificación de triglicéridos, se recuperó por el agregado de dibutilil-AMPc u 8-pCPT-2'-O-Me-AMPc. Este último activa EPAC pero no PKA. Al transfectar los preadipocitos con una mutante dominante negativa de Rap (proteína G de bajo peso molecular), que es un sustrato frecuente de EPAC, se inhibió la diferenciación. Por otro lado se analizó la activación de quinasas y factores de transcripción a través de la vía de MIX-AMPc. Nuestros resultados sugieren que MIX activa a la quinasa JNK pero no a PI3K-PKB. Además vimos que MIX contribuye al aumento de la expresión de PPAR $\gamma$ , un factor de transcripción requerido para la diferenciación a adipocitos. Estos resultados indican la participación de la señalización MIX-AMPc-EPAC-Rap y la posible activación de JNK en la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos.

**058. (411) HIPOTIROIDISMO CONGÉNITO: PAPEL DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA NEURONAL DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL DEL HÍGADO Y CEREBRO EN LA RATA.**

Elguero E.<sup>1</sup>; Kersting S.<sup>2</sup>; Finocchietto P.<sup>3</sup>; Alippe Y.<sup>4</sup>; Co-sarin M.<sup>5</sup>; Poderoso J.<sup>6</sup>; Carreras M.<sup>7</sup>

Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas, FFyB, UBA, CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
eugeelguero@gmail.com

El óxido nítrico (NO) es un radical libre que regula varias funciones celulares. Previamente demostramos que la expresión mitocondrial de óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) se modula durante el desarrollo neuronal y hepático en la rata controlando vías de proliferación y arresto celular en relación a los niveles de NO mitocondrial y especies reactivas del oxígeno (ROS). El status tiroideo regula el metabolismo mitocondrial y la función respiratoria y el estadio postnatal es el período de máxima sensibilidad a hormonas tiroideas (HT). Para determinar cambios producidos por el hipotiroidismo congénito en la expresión mitocondrial de nNOS en el desarrollo postnatal, se compararon ratas preñadas en dos grupos: control (C) e hipotiroideo (H), por administración de metimazol desde el día 9 de gestación y se estudiaron las crías en los días 5-15 y 30 postnatales (P5-P15-P30). El peso corporal fue mayor en el grupo C  $12,8 \pm 0,5$  respecto al grupo H  $9,6 \pm 0,1$  (P5;  $p < 0,05$ ) y de  $146,3 \pm 10$  C vs.  $61,2 \pm 3$  en H (P30;  $p < 0,05$ ). La expresión de nNOS evaluada por WB aumentó en H en citosol respecto a C en cerebro e hígado, mientras que en mitocondrias este aumento se observó en P5-P15 en cerebro y P5-P30 en hígado en H. La actividad de nNOS por [H3]citrulina (pmoles NO/min.mg) en la fracción mitocondrial fue 311 en H vs. 69,25 C ( $p < 0,046$ ) en cerebro/P15 mientras que en hígado el aumento máximo se apreció en P30, 130 en H vs. 37 en C ( $p < 0,005$ ); estos resultados se confirmaron por medición de NO con DAF-FM. La actividad del complejo I de la cadena respiratoria, resultó inhibida por NO en el grupo hipotiroideo en P5 y P15 ( $p < 0,026$  y  $p < 0,012$ ) en cerebro mientras que en hígado la inhibición del complejo I se alcanzó en P30 ( $p < 0,045$ ). Concluimos que hay un período crítico de acción de TH acompañado de un incremento mitocondrial de NO en el hipotiroidismo que resulta en inhibición del complejo I y que esta modulación presenta patrones diferentes durante el desarrollo en ambos órganos.

**059. (430) CARACTERIZACIÓN DE LA MODULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF-KAPPAB MEDIADA POR PROTEÍNAS FKBP5**

Erlejman A.<sup>1</sup>; Molinari A.<sup>2</sup>; Mazaira G.<sup>3</sup>; Galigniana M.<sup>4</sup>

Depto. Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 3</sup>; Depto. Química Biológica, FCEN, UBA, IBYME, CONICET<sup>2 4</sup>  
erlejman@qb.fcen.uba.ar

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B (RelA/p50) regula genes involucrados en la inflamación, diferenciación y muerte celular. Su activación es mediada por la fosforilación del inhibidor I $\kappa$ B y posterior degradación, lo que libera a NF- $\kappa$ B para translocar al núcleo. Previamente observamos que las FK506 binding proteins (FKBPs) modulan la actividad transcripcional NF- $\kappa$ B. Las FKBP5 se caracterizan por

presentar un dominio con actividad enzimática de peptidil-prolil-cis/trans-isomerasa (PPlasa) y un dominio TPR (series de 34 aa) de interacción con otras proteínas. El objetivo de este trabajo fue estudiar las características de esta modulación. En células HEK 293T estimuladas con PMA (100ng/ml) se analizó la inducción de un gen reportero con sitios promotores para NF- $\kappa$ B. Mientras que FKBP51 mostró efectos inhibitorios, FKBP52 mostró un efecto amplificador de la respuesta, el que fue revertido por FKBP51. Asimismo, no se observó estimulación en la actividad de NF- $\kappa$ B inducida por PMA en células HEK 293 transfectadas con FKBP52 que sobreexpresan de manera estable a FKBP51. La preincubación con FK506 (inhibidor de la actividad PPlasa) previno la estimulación mediada por FKBP52 sin afectar el efecto inhibitorio de FKBP51 sobre NF- $\kappa$ B. La cotransfección del dominio TPR disminuyó por competencia el efecto modulador observado para ambas FKBP5. Se estudió la cinética de translocación nuclear de NF- $\kappa$ B por IFI, observándose que FKBP52 aumentó el tiempo de permanencia de NF- $\kappa$ B en el núcleo, mientras que FKBP51 inhibió parcialmente su translocación nuclear. FKBP51 coimmunoprecipitó con RelA en condiciones basales, siendo el complejo disociado en células estimuladas con PMA. Concluimos que FKBP51 y FKBP52 modulan la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B actuando en forma contrapuesta, siendo relevante la actividad PPlasa de FKBP52 así como la interacción vía dominios TPR con otras proteínas. Este efecto tiene lugar tanto a nivel de la translocación de NF- $\kappa$ B y/o en su sitio promotor.

- 060. (436) LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 EN SER 727 INDUCIDA POR PROGESTÁGENOS ES NECESARIA PARA SU ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y PARA PROMOVER EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA**  
Tkach M.<sup>1</sup>; Rivas M.<sup>2</sup>; Díaz Flaqué M.<sup>3</sup>; Proietti C.<sup>4</sup>; Chareau E.<sup>5</sup>; Elizalde P.<sup>6</sup>; Schillaci R.<sup>7</sup>  
*IBYME<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
*mercedes.tkach@gmail.com*

Previamente demostramos que el acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la fosforilación de Stat3 en Tyr705 y su activación transcripcional en células de cáncer de mama humano, T47D, y en células murinas progestágeno-dependientes, C4HD. Además, comprobamos que el MPA, vía p42/44 MAPK, induce la fosforilación de Stat3 en el residuo Ser 727 (S727). En este trabajo evaluamos si la fosforilación de Stat3 en S727 es requerida para una completa activación transcripcional de Stat3 inducida por progestágenos y su participación en la proliferación celular. Para ello, co-transfectamos células C4HD con el plásmido 4xm67-luciferasa, que contiene sitios de unión a Stat3, y con un vector de expresión de Stat3 wild-type (wt) o de Stat3 mutada en S727 (Stat3S/A). La presencia de la proteína mutante bloqueó la capacidad del MPA de aumentar la actividad luciferasa ( $p < 0,05$ ). Al explorar la activación del promotor de ciclina D1 (cicD1) inducido por MPA observamos que las células C4HD y T47D transfectadas con Stat3S/A no mostraron un aumento de la actividad transcripcional de cicD1 a diferencia de las transfectadas con Stat3 wt ( $p < 0,05$ ). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) demostramos que la transfección con Stat3S/A impide el reclutamiento de Stat3 a su sitio de unión en el promotor del gen de la cicD1 inducido por MPA. La transfección con Stat3S/A resultó en una inhibición de la proliferación celular inducida por MPA, medida por incorporación de timidina-3H ( $p < 0,001$ ). Finalmente exploramos el requerimiento de pStat3 S727 para el crecimiento in vivo dependiente de MPA de células C4HD y observamos una inhibición del crecimiento tumoral en el grupo de ratones inyectados con células transfectadas con Stat3S/A ( $p < 0,01$ ). Demostramos por primera vez que la fosforilación de Stat3 en S727 es necesaria para la completa activación transcripcional de Stat3 y para la proliferación celular de células de cáncer de mama inducida por MPA tanto in vitro como in vivo.

- 061. (537) REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA ACILCOA-SINTETASA-4 (ACSL4) POR CREB Y SP1 EN CÉLULAS ESTEROIDOGÉNICAS**  
Cooke M.<sup>1</sup>; Orlando U.<sup>2</sup>; Cornejo Maciel F.<sup>3</sup>; Maloberti P.<sup>4</sup>  
*Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4</sup>*  
*mcooke@fmed.uba.ar*

Los niveles intracelulares de ácido araquidónico (AA) son regulados en respuesta a diferentes agonistas fisiológicos en diferentes tejidos. Hemos demostrado previamente la existencia de un nuevo mecanismo de liberación compatalizada de AA en el que participa la enzima ACSL4 como marcapaso. ACSL4 está involucrada también en la formación de dendritas en sistema nervioso, en la fusión de membranas y en la producción de eicosanoides en células tumorales lo que favorece la agresividad tumoral. Los niveles de expresión de ACSL4 son regulados hormonalmente a través del AMPc en células esteroideogénicas. Previamente clonamos y caracterizamos a través de delecciones unidireccionales la secuencia mínima del promotor de ACSL4 que es regulada por AMPc. Esta secuencia mínima, 150 pb río arriba del inicio de la transcripción, contiene sitios consenso para los factores de transcripción SP1 y CREB, entre otros y no posee una secuencia TATA box. El objetivo de este trabajo fue demostrar el rol de los factores CREB y SP1 en la regulación transcripcional de ACSL4. A través de ensayos de EMSA comprobamos que estos sitios consenso unen específicamente factores de transcripción. La mutación sitio dirigida de los sitios consenso tanto de SP1 como CREB a través del método de megaprimers produce una disminución significativa de la actividad tanto basal ( $p < 0,001$ ) como estimulada por 8Br-AMPc ( $p < 0,001$ ) para SP1 y solo reduce significativamente la estimulación mediada por AMPc ( $p < 0,01$ ) sin afectar la actividad basal del promotor para CREB. Para comprobar la unión de estos factores de transcripción a la secuencia promotora de ACSL4 realizamos ensayos de CHIP. Tanto fosfo-CREB como SP1 se unen al promotor de ACSL4 y esta unión se incrementa por AMPc. Estos resultados muestran por primera vez el papel de SP1 y CREB en la regulación de ACSL4.

## FISIOLOGÍA 1 Y GASTROENTEROLOGÍA 1

- 062. (728) MIELOPEROXIDASA Y CERULOPLASMINA EN PACIENTES CON PANCREATITIS AGUDA.**  
Serra C.<sup>1</sup>; Bustos M.<sup>2</sup>; Yapur V.<sup>3</sup>; Lopez Mingorance F.<sup>4</sup>; Sorda J.<sup>5</sup>; Negri G.<sup>6</sup>; Di Carlo M.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Gastroent. y Enzimología Clínica, Cpto Bioquímica Clínica, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; Servicio de Gastroenterología, Hospital de Clínicas, UBA<sup>5</sup>*  
*dicarlo@ffyb.uba.ar*

La pancreatitis aguda (PA), enfermedad inflamatoria pancreática de fisiopatología compleja y en continuo estudio. Es autodigestiva, con activación prematura y retención de las enzimas en las células acinares. El daño pancreático y peripancreático consecuente es muy variable, y orienta al pronóstico y tratamiento. Posibles marcadores de inflamación son: Proteína-C-reactiva (PCRus) y Ceruloplasmina (Cp), ambas de fase aguda y síntesis hepática. PCR es inducida por liberación de interleuquinas, como interleukina 6 (IL6); Proteína asociada a la pancreatitis (PAP), se sobreexpresa ante la injuria pancreática, con propiedades antiinflamatorias; y Mieloperoxidasa (MPO), hemoenzima de neutrófilos, monocitos y macrófagos, productora de potentes oxidantes. Objetivo: Determinar los marcadores de inflamación: PCR, Cp, IL6, PAP y MPO en el suero de pacientes controles y con PA, para establecer diferencias entre ambos. Materiales y Métodos: Se estudiaron pacientes: controles (C-n=11, 58±12 años, 3H/8M); y PA (n=15, etiología biliar, 24hs. evolución; 69±17 años, 5H/10M). Consentimiento informado-Comité Ética-FFyB-UBA. Se determinó: PCRus y Cp (métodos automatizados); PAP (Enzimo-inmunoensayos), IL6 (quimioluminiscencia) y MPO (Método Cinético modificado). Análisis estadístico por: Tests Student/Mann-Whitney y correlación de Spearman. Significancia  $P < 0,05$  (SPSS-16). Resultados: Se observan: en PA en relación a C aumentos significativos ( $P < 0,001$ ): PCRus, IL6, PAP y MPO; y disminución significativa ( $P < 0,05$ ): Cp, asociaciones significativas ( $P < 0,05$ ) positivas de MPO y negativas de Cp con: PCRus, IL6 y PAP, y asociación negativa no significativa de MPO y Cp. Conclusiones: En PA, el comportamiento de las actividades de MPO y Cp, orientan a pensar en el efecto inhibitorio de una oxidasa sobre la otra, sin determinar la relación estequiométrica de

la inhibición. Así la Cp, inhibidor natural de MPO impediría que esta exacerbe el cuadro inflamatorio durante el proceso agudo de la pancreatitis.

**063. (299) EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE DISMINUYE LOS NIVELES DE TNF-ALFA E IL-1 BETA EN ENCÍA DE RATAS CON PERIODONTITIS EXPERIMENTAL SOMETIDAS A ESTRÉS**

Rettori E.<sup>1</sup>; De Laurentiis A.<sup>2</sup>; Luce V.<sup>3</sup>; Zorrilla Zubilete M.<sup>4</sup>; Elverdin J.<sup>5</sup>

*Departamento de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA<sup>1</sup>; CEFYBO, Facultad de Medicina<sup>2,3,4</sup> elisaretтори@yahoo.com.ar*

Periodontitis es una enfermedad infecciosa que causa una respuesta immuno-inflamatoria en la cual TNF-alfa (TNF) e IL-1 beta (IL-1) tendrían una relación directa con la destrucción tisular y la reabsorción ósea. El sistema endocannabinoide gingival podría ejercer una acción anti-inflamatoria, por lo cual el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del endocannabinoide anandamida (AEA) y/o los antagonistas de los receptores cannabinoides sobre el contenido de TNF e IL-1 en la encía. Periodontitis (P) fue inducida en ratas macho Wistar colocando un hilo alrededor de los primeros molares inferiores por 7 días. El estrés se indujo por inmovilización durante 2 horas, dos veces por día durante 7 días (n=6 ratas por grupo). La AEA (10-8M) y/o antagonistas para CB1 (AM251, 10-6M) y para CB2 (AM630, 10-6M) fueron inyectados en las encías alrededor de los primeros molares 15 min antes de cada período de inmovilización. La periodontitis fue confirmada morfométricamente midiendo la distancia desde límite amelocementario a la cresta ósea. La AEA bloqueó el aumento de TNF y este efecto no se observó en presencia de los antagonistas de receptores cannabinoides. La AEA también bloqueó el aumento de IL-1 (Western blot). Asimismo, la AEA disminuyó los niveles séricos de corticosterona. En conclusión el sistema endocannabinoide actuaría disminuyendo la respuesta inflamatoria en la periodontitis. (CONICET PIP 02546, ANPCyT PICT 06-258).

**064. (291) EFECTO DEL ENTEROGLUCAGON TIPO 2 (GLP-2) SOBRE EL METABOLISMO Y ELIMINACIÓN BILIAR, INTESTINAL Y RENAL DE 1-CLORO-2,4-DINITROBENCENO (CDNB).**

Villanueva S.1; Perdomo V.2; Ruiz M.3; Rigalli J.4; Luquita M.5; Catania V.6; Mottino A.7

*IBYME<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>*

*ssmv77@yahoo.com.ar*

GLP-2 produce hipertrofia intestinal y regeneración de la mucosa en diferentes modelos experimentales de injuria intestinal. Hemos demostrado que GLP-2 además mejora la capacidad del yeyuno para restringir la absorción del xenobiótico CDNB incorporado en el lumen intestinal, desconociéndose su efecto ante la incorporación sistémica de dicho xenobiótico. Se evaluó el efecto de GLP-2 (25 µg/100 g peso corporal/día, durante 5 días consecutivos, s.c.) sobre la excreción hepática, intestinal y renal de dinitrofenil glutation (DNP-SG), metabolito conjugado del CDNB, en ratas Wistar hembras adultas (n=4). El CDNB fue administrado i.v. (30 µmol/kg peso) y la excreción de DNP-SG fue determinada durante 90 min y asociada a la actividad del transportador apical de aniones orgánicos conjugados Mrp2. Se determinó en cada tejido la actividad de glutation-S-transferasa (GST), involucrada en la conversión de CDNB en DNP-SG, así como la expresión de Mrp2 y GST por western blot, para establecer una posible correlación con los hallazgos funcionales. La excreción biliar de DNP-SG disminuyó (-20%) mientras que la excreción intestinal aumentó (+103%) por GLP-2 respecto de ratas controles (C) (p<0,05). Ni la eliminación urinaria de este compuesto ni su excreción por los tres tejidos tomada en conjunto fue afectada, indicando que los cambios en hígado e intestino se compensaron mutuamente. La actividad GST fue reducida en hígado (-24%) y aumentada en intestino (+64%) por GLP-2 respecto de C (p<0,05). Sólo se registraron cambios de expresión de GSTmu hepática (-30%) y de GSTalfa (+91%) y Mrp2 intestinales (+75%) por GLP-2 (p<0,05).

Conclusión: Los hallazgos sugieren una acción beneficiosa de GLP-2 en la metabolización y eliminación intestinal de compuestos tóxicos, sustratos comunes de GST y Mrp2, incorporados sistémicamente. Sin embargo, el efecto negativo sobre la excreción biliar de DNP-SG, consecuencia de la afectación de GST, debe tenerse en cuenta al evaluar su potencial terapéutico.

**065. (289) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ABC POR ESTRÓGENOS Y FITOESTRÓGENOS EN CÉLULAS CACO-2.**

Arias A.<sup>1</sup>; Villanueva S.<sup>2</sup>; Ruiz M.<sup>3</sup>; Catania V.<sup>4</sup>; Mottino A.<sup>5</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario)<sup>1,2,3,4,5</sup> arias@ifise-conicet.gov.ar*

Los transportadores ABC (ATP-Binding Cassette) median el eflujo celular de diversos endo- y xenobióticos. Se evaluó la influencia del estrógeno natural Estradiol (E2), del estrógeno sintético Etinilestradiol (EE) y del fitoestrógeno Genisteína (GNT), sobre los niveles de expresión de la proteína de resistencia a multidrogas 1 (MDR1) y de las proteínas asociadas a resistencia a multidrogas 2 y 3 (MRP2 y MRP3), en un modelo de epitelio intestinal humano, la línea celular Caco-2. Los niveles proteicos y de ARNm se determinaron por western blot y PCR en tiempo real, respectivamente. Las células se trataron durante 48 hs con dosis fisiológicas y farmacológicas de E2 o EE (0.05 pM a 5 nM) y con dosis de GNT asociadas a la ingesta de soja (0.1 nM a 10 µM). Los resultados (p<0.05, n=4-6), muestran un aumento en la expresión proteica de MDR1 en células tratadas con 0.5 y 5 pM de EE y 1.0, 10 y 1000 nM de GNT respecto de los controles (+158%, +162%, +87%, +97% y +99%, respectivamente), con un aumento paralelo en su ARNm a las dosis 5 pM de EE y 1000 nM de GNT (+32% y +70%). La expresión proteica de MRP2 aumentó en células tratadas con 5 nM de E2 (+36%), 0.5 y 5 pM de EE (+75% y +88%) y 0.1, 1.0, 10 y 1000 nM de GNT (+139%, +325%, +401% y +120%), mientras que su ARNm no fue afectado. MRP3 aumentó sus niveles de expresión proteica a las dosis 5 pM de E2 y EE (+92% y +75%) y 10 µM de GNT (+87%), con un aumento concomitante en su ARNm a 5 pM de E2 y EE (+100% y +97%). Se concluye una inducción tanto de los transportadores apicales MDR1 y MRP2 como del transportador basolateral MRP3 por estrógenos, a través de mecanismos de regulación diferentes (transcripcional vs. pos-transcripcional). Este efecto contribuiría a la prevención de la absorción intestinal de xenobióticos dietarios, sustratos de los transportadores ABC estudiados, así como a la protección del enterocito mismo, en condiciones de embarazo, anticoncepción o ingesta de fitoestrógenos dietarios.

**066. (252) LA BILIRRUBINA NO CONJUGADA (BNC) PREVIENE LAS ALTERACIONES INDUCIDAS POR ESTRÉS OXIDATIVO (EO) SOBRE EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y LA FUNCIÓN SECRETORA BILIAR**

Basiglio C.<sup>1</sup>; Toledo F.<sup>2</sup>; Arriaga S.<sup>3</sup>; Sanchez Pozzi E.<sup>4</sup>; Ochoa J.<sup>5</sup>; Mottino A.<sup>6</sup>; Roma M.<sup>7</sup>

*IBYME<sup>1,2</sup>; Area Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la UNR<sup>3</sup>; INSTITUTO DE FISIOLÓGIA EXPERIMENTAL<sup>4,5,6,7</sup> basiglio@ifise-conicet.gov.ar*

El EO contribuye a la patogénesis y progresión de numerosas enfermedades hepáticas, en parte ejerciendo una alteración colestásica. La bilirrubina es un importante antioxidante endógeno con propiedades citoprotectoras, de potencial aplicación en el tratamiento de dichas hepatopatías. Previamente, demostramos en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHR) que la internalización de transportadores canaliculares secundaria a la desorganización de actina media el efecto colestásico del pro-oxidante modelo tert-butilhidroperóxido (tBOOH), y que concentraciones fisiológicas de BNC previenen esta alteración. El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad de BNC para limitar las alteraciones en la función secretora biliar inducida por tBOOH en el hígado aislado y perfundido de rata

(HAPR), un modelo con estructura epitelial conservada similar a la condición fisiológica. Se estudió también la capacidad de BNC para prevenir la desorganización de actina, evaluada en DAHR por i) formación de ampollas de membrana plasmática ("blebs"), visualizadas por contraste de fase, y ii) disminución del % de actina pericanalicular por redistribución al cuerpo celular, estudiada por microscopía confocal de F- actina marcada con faloidina-Cy3 y posterior análisis de imagen. tBOOH (125  $\mu$ M) indujo la formación de "blebs" de membrana, y el pre-tratamiento con BNC (17,1  $\mu$ M) previno significativamente esta alteración (30 $\pm$ 3 vs. 68 $\pm$ 2%,  $p < 0.05$ ). La disminución del % de actina pericanalicular también fue prevenida por BNC (73 $\pm$ 8 vs. 39 $\pm$ 6%,  $p < 0.05$ ). En HAPR, tBOOH (75  $\mu$ M), perfundido durante 10 min, disminuyó agudamente el flujo biliar, y BNC (2,1  $\mu$ M; perfundida 15 min antes que tBOOH) previno completamente esta alteración (0,8 $\pm$ 0,2 vs. 1,5 $\pm$ 0,3  $\mu$ l/min/g híg,  $p < 0.05$ ). Concluimos que BNC ejerce un rol anticolestásico en condiciones de EO, previniendo la desorganización de actina y la consecuente internalización endocítica de transportadores canaliculares relevantes para la secreción biliar.

- 067. (158) ESTUDIO DEL AREA NEURONAL DEL PLEXO MIENTERNO INTESTINAL EN RATAS INYECTADAS CON ALOXANO Y SUPLEMENTADAS CON ACIDO ASCÓRBICO.**  
Novelli F.<sup>1</sup>; Posadas M.<sup>2</sup>; Hisano N.<sup>3</sup>  
*Cátedra de Histología, Fac. Cs. Médicas, UNR<sup>1</sup>;* *Catedra de Biología, Fac. Cs. Médicas, UNR<sup>2</sup>*  
*franconovelli1@hotmail.com*

El aloxano destruye a las células  $\beta$  del islote de Langerhans, con la formación de radicales libres. Este efecto podría ser evitado por la acción del ácido ascórbico. Habiendo detectado una disminución de neuronas NOS+ por el aloxano, que no es observable en el caso de una administración simultánea con ácido ascórbico (SAIC 2010). En esta comunicación estudiamos la distribución de las áreas neuronales en el intestino delgado inyectado con aloxano y aloxano más ácido ascórbico. Ratas "m" de 23 días de edad fueron divididas en 3 grupos experimentales: 1.- Inyectados con aloxano (A) 24mg/100g PC (n=4). 2.- Inyectado con agua destilada (C) 1cc/100g PC. (n=4). 3.- Inyectados con aloxano que recibieron ácido ascórbico (2g/L) disueltos en agua corriente, como bebida ad libitum (A+AA) (n=4). Se detectó la glucemia con tiras reactivas ACCU-CHEK (@Roche) a las 48 hs. A los 7 días las ratas fueron sacrificadas y se diseccionaron los intestinos delgados, obteniéndose segmentos del yeyuno, fijados en paraformaldehído 4% PBS, y procesados con la técnica de NADPH. Los plexos de Auerbach fueron fotografiados a 40x con una cámara digital y las superficies neuronales fueron medidas en un procesador de imágenes. Las neuronas fueron divididas en <100 $\mu$ m<sup>2</sup>, entre 100-200 $\mu$ m<sup>2</sup>, entre 200-300 $\mu$ m<sup>2</sup>, entre 300-400 $\mu$ m<sup>2</sup> y >400 $\mu$ m<sup>2</sup>. La mayoría de las neuronas comprenden entre 100 y 300 $\mu$ m<sup>2</sup>, que se distribuyen en: 100-200 $\mu$ m<sup>2</sup>: A (51.90%), A+AA (50.90%), C (43.85%) y 200-300 $\mu$ m<sup>2</sup>: A (37.75%), A+AA (39.25%), C (42.50%). Promedio superficie neuronal A: 202.14 $\pm$ 11.31 $\mu$ m<sup>2</sup>, A+AA: 207.33 $\pm$ 7.25 $\mu$ m<sup>2</sup>, C: 220.22 $\pm$ 12.49 $\mu$ m<sup>2</sup> (ns). Los resultados indicaron que los cuerpos neuronales en los animales tratados con aloxano presentaron un porcentaje mayor en neuronas de menor a 200 $\mu$ m<sup>2</sup>, mientras que las neuronas de mayor tamaño (>200 $\mu$ m<sup>2</sup>) se observó un porcentaje mayor en el grupo control. El aloxano afecta el área y la cantidad neuronal (SAIC 2010), independientemente si han recibido o no ácido ascórbico.

- 068. (153) LA DIETA RICA EN GRASA SE ASOCIA CON MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN HEPÁTICA DEL TRANSCRIPTO Y CAMBIOS EN LA DIMERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SCD1 (STEAROYL-COA DESATURASA).**  
Fernández Gianotti T.<sup>1</sup>; Rosselli M.<sup>2</sup>; Burgueño A.<sup>3</sup>; Pirola C.<sup>4</sup>; Sookoian S.<sup>5</sup>  
*Departamento de Genética y biología Molecular de Enfermedades Complejas, IDIM, UBA, CONICET<sup>1</sup>;* *Departamento de Hepatología Clínica y Molecular, IDIM, UBA, CONICET<sup>2</sup>;*  
*tfgianotti@yahoo.com.ar*

La Scd1 se postula como blanco terapéutico de la obesidad, insulinoresistencia (IR) y enfermedad cardiovascular. Las desaturasas son reguladas por los ácidos grasos, pero es controversial la modulación de la expresión de Scd1 en la enfermedad grasa del hígado de etiología no alcohólica (NAFLD). Objetivos: evaluar los cambios en la expresión hepática de Scd1 inducidos por dieta rica en grasa (DG) y su relación con el estatus de IR. Para este fin medimos los niveles hepáticos del transcrito de Scd1 (PCR en tiempo real) y los niveles de proteína (Western Blot) en dos modelos experimentales de NAFLD inducidos por DG: ratas adultas macho Sprague Dawley (SD) y ratas espontáneamente hipertenensas (SHR) con sus controles normotensos (Wistar-Kyoto, WKY). Los animales fueron alimentados con dieta estándar (CON, n=7) o DG (n=7) durante 10 semanas. Ambas cepas desarrollaron NAFLD cuando se alimentaron con DG, solo la cepa SHR presentó IR. Observamos una significativa reducción en la abundancia hepática del Scd1 mRNA en las ratas sometidas a DG: CON-SD 235 $\pm$ 195 vs. DG-SD 4.5 $\pm$ 2.9 (media $\pm$ ES),  $p < 0.0004$ ; CON-SHR 75.6 $\pm$ 10.8 vs. DG-SHR 4.5 $\pm$ 17.4, CON-WKY 168.7 $\pm$ 17.4 vs. DG-WKY 12.9 $\pm$ 17.4,  $p < 0.000001$  (ANCOVA ajustado por HOMA). El análisis de la expresión hepática de la proteína Scd1 mostró un patrón particular en todas las ratas sometidas a DG, caracterizado por la presencia de un nivel elevado de una banda monomérica de 33 kDa ( $p < 0.003$ ), y un nivel disminuido de una banda dimerica de 66 kDa ( $p < 0.02$ ). La relación monómero/dímero de la proteína fue mayor ( $p < 0.0002$ ) en los especímenes sometidos a DG (DG-SHR: 1.9 vs CON-SHR: 0.55; y DG-WKY: 2.1 vs CON-WKY: 0.9). En conclusión, la ingesta de DG se asoció con una significativa reducción en la expresión hepática del mensajero de Scd1 y una desdimerización de la proteína hepática, la cual podría impactar directamente en la función y actividad de la proteína.

- 069. (127) EFECTO DE GALECTINA-1 EN LA QUIMIORRESISTENCIA Y ADHESIÓN DE CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO (HCC)**  
Bacigalupo M.<sup>1</sup>; Manzi M.<sup>2</sup>; Espelt M.<sup>3</sup>; Elola M.<sup>4</sup>; Rabinovich G.<sup>5</sup>; Wolfenstein De Todel C.<sup>6</sup>; Troncoso M.<sup>7</sup>  
*Instituto de Química y Físico-Química Biológicas, FFyB, UBA, CONICET<sup>1,2,3,4,6,7</sup>; IBYME, CONICET<sup>5</sup>*  
*lore\_baci@yahoo.com.ar*

Previamente demostramos que Galectina-1 (Gal-1), proteína con afinidad por  $\beta$ -galactósidos, promueve la adhesión y la polarización de células de HCC, HepG2. En este trabajo, estudiamos la adhesión de otra línea de HCC humano, HuH7 en presencia de Gal-1 recombinante (rGal-1), mediante la tinción con cristal violeta. rGal-1 soluble (3,5 y 14  $\mu$ M) disminuyó la adhesión a pocillos sin recubrir (80,8 $\pm$ 3,8 y 66,4 $\pm$ 4,6 %,  $p < 0.01$ ) respecto al control (100%), t=1h, mediante su dominio de unión a carbohidratos. En cambio, rGal-1 (14  $\mu$ M) promovió la adhesión cuando fue inmovilizada en los pocillos (137,8 $\pm$ 3,2 %,  $p < 0.05$ ) y al ser incubada sobre pocillos recubiertos con laminina (proteína de la matriz extracelular (MEC)) (218 $\pm$ 12 %  $p < 0.001$ ). Si bien la expresión intracelular de Gal-1 fue menor en las células HuH7 que en las HepG2, en el medio condicionado fue diez veces mayor, indicando que la mayor parte de Gal-1 es secretada al medio extracelular, a diferencia de lo observado en las células HepG2 (Western blot, WB). Gal-1 aumentó la expresión del marcador apical MDR1 en la membrana plasmática (WB), y dada su participación en la resistencia a diversas drogas quimioterapéuticas, como la camptotecina (CPT), analizamos la viabilidad de células HepG2 wt y que sobre-expresan Gal-1 frente a dicho compuesto. Células que sobre-expresan Gal-1 fueron más resistentes a la muerte por CPT (1 y 10  $\mu$ M) (56,8 $\pm$ 1,8 y 50,6 $\pm$ 1,9 %) que las células wt (41,2 $\pm$ 2,3 y 34,6 $\pm$ 2 %  $p < 0.05$ ) (MTS). Nuestros resultados demuestran que Gal-1 modula la adhesión de células de HCC, ejerciendo un efecto diferencial según su "presentación" a la célula, su nivel de expresión y/o su localización celular. Proponemos que los hepatocitos tumorales secretan Gal-1, ésta permanece unida a la membrana plasmática o depositada en la MEC, favoreciendo la adhesión de las células tumorales a la misma, y a su diseminación. Además, Gal-1 contribuye a la resistencia a la muerte por CPT sugiriendo su participación en la quimiorresistencia.

**070. (102) TRANSFERENCIA IN VIVO DEL GEN DE AQUAPO- RINA-1 HUMANA (HAQP1) AL HÍGADO DE RATA**

Lehmann G.<sup>1</sup>; Marrone J.<sup>2</sup>; Malvicini M.<sup>3</sup>; Mazzolini G.<sup>4</sup>; Marinelli R.<sup>5</sup>  
*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), UNR<sup>1,2,5</sup>; Laboratorio de Terapia Génica, Universidad Austral<sup>3,4</sup>*  
 marrone@ifise-conicet.gov.ar

La aquaporina-8 (AQP8) facilita el transporte de agua a través de la membrana canalicular del hepatocito durante la formación de la bilis. En animales con colestasis hepatocelular, la expresión canalicular defectiva de AQP8 y la consecuente reducción de la permeabilidad de membrana al agua, se considera un importante factor contribuyente a la falla secretora biliar. Así, hipotetizamos que la normalización de la permeabilidad canalicular al agua vía transferencia génica in vivo de AQPs puede atenuar un cuadro colestásico. A fin de comenzar con los estudios, se utilizó el adenovector AdhAQP1 (generado y donado por BJ Baum, Gene Transfer Laboratories, NIH, USA) y en animales normales, se optimizaron las condiciones experimentales, i.e. dosis, vía de administración y tiempo requerido para la expresión proteica y se determinó, además, la localización celular y subcelular de hAQP1. La administración de AdhAQP1 (dosis: 5 x 10<sup>9</sup> UFP) a ratas Wistar macho adultas indujo la expresión hepática de hAQP1 a las 72 h post-administración. La vía retrobiliar, cuyas ventajas son: la exposición directa a los hepatocitos periportales principales generadores de la secreción biliar, la menor reacción inmune sistémica y la potencial significancia clínica; mostró los mejores resultados. Los estudios inmunohistoquímicos en tejido hepático revelaron expresión de hAQP1 en hepatocitos mayormente periportales. El fraccionamiento subcelular por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y análisis por inmunoblotting, reveló un mayor enriquecimiento de hAQP1 en membrana canalicular hepática. En conclusión, la administración retrobiliar de AdhAQP1 a ratas normales, indujo la expresión proteica de hAQP1 en hepatocitos a las 72 h, con localización canalicular. Así, la transferencia adenoviral de hAQP1 podría resultar una estrategia útil para futuros estudios dirigidos a atenuar un cuadro colestásico.

**071. (86) LA APLICACIÓN TÓPICA DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE CANNABINOIDES SOBRE EL TEJIDO GINGIVAL INCREMENTA EL DAÑO PERIODONTAL INDUCIDO POR LPS EN LA RATA**

Ossola C.<sup>1</sup>; Surkin P.<sup>2</sup>; Mohn C.<sup>3</sup>; Elverdin J.<sup>4</sup>; Fernandez-Solari J.<sup>5</sup>  
*Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA<sup>1,2,3,4,5</sup>*  
 caossola@hotmail.com

Los receptores de cannabinoides, CB1r y CB2r, han sido identificados en la encía en y la glándula submaxilar (GSM) de la rata. El objetivo de este trabajo fue evaluar cómo se modifican algunos parámetros de enfermedad periodontal luego un tratamiento con antagonistas (ANT) de los receptores mencionados sobre la encía adyacente a los molares comprometidos. Se emplearon 3 grupos de ratas (Wistar macho, n=7): G1) inyectados con 10µL de solución fisiológica (SF) en la encía del primer molar superior e inferior, 3 veces por semana, durante 6 semanas; G2) inyectados con 10µL de LPS (2mg/mL en SF) en los sitios descritos para G1; y G3) inyectados con LPS y topicados diariamente con una solución de AM251 (1µg/mL) y AM630 (1µg/mL) (ANT de CB1r y CB2r, respectivamente), en los sitios de inyección. Una vez sacrificados los animales, se extrajeron los maxilares superior e inferior para evaluar la pérdida ósea, en base a la distancia entre el límite amelo-cementario y la cresta ósea alveolar de las raíces de los primeros molares. Las encías y las GSM se extrajeron para medir prostaglandina E (PGE) por RIA, actividad de óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) por radioconversión, y TNFα por ELISA. La aplicación local de los ANT incrementó la pérdida ósea inducida por LPS en ambos maxilares (P<0,05). En las encías, el tratamiento con ANT incrementó más aún (P<0,01) los niveles de TNFα aumentados por LPS (p<0,05) (G1: 91,7±3,5; G2: 167,9±36,2; G3: 280,4±10,8 pg TNFα/ mg prot), pero disminuyó la actividad de

iNOS incrementada en tales condiciones (P<0,05). En las GSM, el contenido de PGE aumentó en las ratas inyectadas con LPS con respecto a los controles, mientras que disminuyó en respuesta al tratamiento con los ANT. Los resultados demuestran que el tratamiento con ANT de CB1r y CB2r sobre el tejido gingival de ratas con periodontitis conduce a un daño periodontal mayor. Esto sugiere la participación del sistema endocannabinoide durante el desarrollo de la enfermedad.

**072. (88) RATONES DEFICIENTES EN AMBAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR AT1 DE ANGIOTENSINA II, AT1A Y AT1B, PRESENTAN RETARDO EN LA INVOLUCIÓN MAMARIA POST-LACTANCIA: UN NUEVO ROL DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA.**

Nahmod K.<sup>1</sup>; Cambados N.<sup>2</sup>; Walther T.<sup>3</sup>; Meiss R.<sup>4</sup>; Tappenbeck N.<sup>5</sup>; Raffo D.<sup>6</sup>; Simian M.<sup>7</sup>; Geffner J.<sup>8</sup>; Kordon E.<sup>9</sup>; Schere-levy C.<sup>10</sup>  
*Sección Inmunología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina<sup>1,8</sup>; LEGMA, IFIBYNE-CONICET, FCEN, UBA<sup>2,9,10</sup>; Center for Cardiovascular and Metabolic Research, Hull York Medical School, University of Hull, Hull, United Kingdom<sup>3,5</sup>; Servicio de Patología, IIHEMA, Academia Nacional de Medicina<sup>4</sup>; Área de Investigación, Instituto de Oncología Angel H Roffo, UBA<sup>6,7</sup>*  
 karenahmod@gmail.com

La angiotensina II (AngII) participa en una multiplicidad de procesos biológicos, como proliferación, apoptosis y remodelado tisular a través de 2 receptores tipo 7TMS asociados a proteínas G, el AT1 y el AT2. Nuestra hipótesis es que AngII cumple un rol en la fisiología de la glándula mamaria y en particular en la fase de involución mamaria post-lactancia (IM). Previamente reportamos que AngII induce la activación del factor pro-apoptótico STAT3 en epitelio mamario de hembras de la cepa Balb/c lactantes. Encontramos además que durante la IM se incrementa la expresión de los componentes del RAS y que el bloqueo farmacológico de AT1 con losartan induce retardo en dicha fase. En el presente trabajo, demostramos mediante western blot que el co-tratamiento con irbesartan 10-5M, un antagonista del AT1, bloquea la activación de STAT3 y ERK1/2 inducida por la inoculación intramamaria de AngII 10-6M en hembras lactantes. El tratamiento de hembras de la cepa Balb/c con losartan 20mg/kg/día por vía sc durante la IM nos permitió identificar mecanismos subyacentes al retardo inducido por el bloqueo de AT1. Observamos inducción en la expresión de factores de supervivencia como BCL-XL y AKT, disminución en la tasa de células epiteliales apoptóticas [12.1±2.1% (control) vs. 4.8±0.7% (losartan); P<0.001] e inhibición significativa dosis dependiente de la actividad de MMP-9 por zimografía (80%; P<0.05), con un IC50 de losartan de 6.9 mg/kg/día. Por otro lado, demostramos que hembras deficientes en cualquiera de las dos isoformas del receptor AT1, el AT1A, el AT1B o en ambas isoformas(AT1A / AT1BDKO), presentan retardo en la IM con disminución significativa en el porcentaje de células apoptóticas [6.3±0.95% (WT) vs. 3.3±0.56% (AT1A /AT1BDKO); P<0.05] y menor depósito de fibras de colágeno y reticulina. Estos resultados sugieren que AngII, a través de ambas isoformas del receptor AT1 cumple un importante rol en la involución mamaria post-lactancia.

**073. (132) REPARACIÓN ALVEOLAR POST EXODONCIA EN RATAS CON SUBMANDIBULECTOMIA (SMX): PARÁMETROS INFLAMATORIOS**

Mohn C.<sup>1</sup>; Gallego M.<sup>2</sup>; Steimetz T.<sup>3</sup>; Surkin N.<sup>4</sup>; Fernandez-solari J.<sup>5</sup>; Guglielmotti M.<sup>6</sup>; Elverdin J.<sup>7</sup>  
*Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, UBA, CONICET<sup>1,3,6</sup>; Cátedra de Fisiología, Facultad de Odontología, UBA<sup>2,4,5,7</sup>*  
 claumohn@yahoo.com

La saliva cumple un importante rol en la reparación de heridas en la cavidad bucal, aportando una diversidad de factores de crecimiento, inmunológicos y enzimas. Tanto la hiposaliva como la xerostomía son afecciones con elevada incidencia en la población adulta. En tal sentido existe poca evidencia respecto

al efecto que la hiposialia ejerce sobre mediadores inflamatorios como el óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE) y el factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) producidos durante la reparación tisular post extracción dentaria. El objetivo de este estudio es evaluar los efectos de la SMx sobre dichos parámetros inflamatorios. Se utilizaron ratas Wistar macho ( $n=10$ /grupo) al momento del destete (21 días): Grupo Experimental (SMx) y Grupo Sham. El día 7 post cirugía se realizó la exodoncia bilateral del primer molar inferior y se procedió a estudiar la actividad de la NOS (Arginina C14), los niveles de PGE (RIA) y el contenido de  $TNF\alpha$  (ELISA) en dos áreas: 1) tejido que ocupa el alvéolo y 2) encía a las 24, 48 y 72 hs post exodoncia. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente considerándose significativas las diferencias con  $p<0.05$ . La actividad de la NOS aumentó en el Sham 48 hs con respecto a Sham 24hs ( $p<0.01$ ) en ambas áreas estudiadas. El G SMx no presentó aumento de actividad de NOS respecto al Sham 48hs ( $p<0.01$ ). Los niveles de PGE observados en el área 1, fueron mayores a las 24hs siendo más elevados en el G SMx 24 hs ( $p<0.05$ ). En el G SMx 72 hs los niveles de PGE disminuyeron con respecto a G SMx 48 hs y 24 hs ( $p<0.01$ ). El  $TNF\alpha$  fue detectado en el área 1) en G Sham y G SMx 24 hs y a las 48 hs fue detectado sólo en el G SMx. La submandibulectomía modifica los niveles de NO, PGE y  $TNF\alpha$  en el tejido que ocupa el alvéolo post exodoncia. Los cambios de estos parámetros inflamatorios podrían ejercer algún efecto sobre la reparación ósea post exodoncia en ratas. UBACyT 20020100100657, PIP 11220090100117 y UBACyT O 007

**074. (136) EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL SCHINUS AREIRA (ANACARDEACEA) EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN DE LAS VÍAS EN RATÓN Y EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN CONEJOS**

Bigliani C.<sup>1</sup>; Rossetti V.<sup>2</sup>; Gronzona E.<sup>3</sup>; Lo Presti S.<sup>4</sup>; Pagnini P.<sup>5</sup>; Rivero V.<sup>6</sup>; Zunino M.<sup>7</sup>; Ponce A.<sup>8</sup>

*Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Cs Médicas, UNC<sup>1</sup>; Cátedra de Pequeños Animales, Dpto. Académico de Ciencias y Tecnologías Aplicadas a la Producción, al Ambiente y al Urbanismo, Universidad Nacional de la Rioja<sup>2</sup>; Cátedra de Biofísica, Facultad Cs Médicas, UNC<sup>3</sup>; Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Dpto. de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC<sup>4</sup>; Cátedra de Química Orgánica y Productos Naturales (IMBIV-CONICET), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC<sup>5</sup>; Cátedra de Fisiología Humana, Facultad Cs Médicas, UNC, Cátedra de Fisiología Humana, Depto. Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de la Rioja<sup>6</sup> bigliani.celeste@gmail.com*

Diversas especies vegetales Sudamericanas tienen una larga historia de usos en la medicina popular, como el "Aguaribay" (*Schinus molle*), ampliamente utilizado como antiinflamatorio, antifúngico e hipotensor. Los terpenos presentes en su aceite esencial (AE) poseen actividad hipotensiva, antiradicalaria, e inhiben a la "enzima convertidora de angiotensina" (ECA). El presente estudio fue diseñado para determinar a nivel pulmonar, la acción biológica de diferentes concentraciones de AE (5, 30 y 300 mg/Kg; obtenido por destilación por arrastre con vapor de agua), administrado intraperitonealmente a ratones machos adultos de la cepa Albino Swiss, previamente instilados con LPS (lipopolisacárido de *Pseudomonas aeruginosa*, 1,67mg/Kg), cuantificando la expresión de  $TNF-\alpha$  en pulmón, la concentración de dienos conjugados (DC), la activación de macrófagos (MA) y la migración de neutrófilos (PMN), a partir del lavado bronquioalveolar. También se determinó la contractilidad miocárdica en ratón inducida por noradrenalina y factores hemodinámicos en conejos machos. Los terpenos se identificaron mediante GC-MS, cuantificando el 98% del total de terpenos, siendo los principales el  $\alpha$ -pineno (13.80%) y el canfeno (12.62%). Conclusiones: El AE disminuye significativamente  $TNF-\alpha$ , la activación de MA, el infiltrado de PMN y el cociente entre porcentaje de DC/MA (como parámetro de actividad antioxidante). Ejerció actividad inotrópica (-) en ratón, mientras que en conejos disminuyó significativamente

la presión sistólica ( $p < 0.01$ ). Estos resultados podrían atribuirse a la actividad inhibitoria que ejercerían los terpenos sobre la ECA. Agradecimientos: Subsidios de la SECyT UNLAR.

**075. (169) FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN HIPOCAMPO Y CORTEZA CEREBRAL DE RATAS SOMETIDAS A 5000 M DE ALTURA SIMULADA DURANTE 7 MESES.**

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

*Instituto de Investigaciones Cardiológicas, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2</sup>; Laboratorio de Radicales Libres en Biología, FFyB, UBA<sup>3,4,5</sup> pablolapa@hotmail.com*

Nuestros estudios previos en mitocondrias aisladas de hipocampo de ratas expuestas a hipoxia hipobárica durante un mes indicaron un aumento de óxido nítrico sintasa (NOS), acompañado por una disminución del consumo de O<sub>2</sub> con preservación del potencial de membrana y la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, efectos que se integrarían en un mecanismo protector. Teniendo en cuenta que un aumento de NOS mitocondrial correlacionó con la cardioprotección observada durante un largo período de aclimatización (J Appl Physiol, 2008), el objetivo del presente estudio fue analizar la función mitocondrial en cerebro de ratas sometidas a hipoxia prolongada. Ratos Wistar fueron expuestos a una altura simulada de 5000 m (53,8 kPa) en una cámara de hipopresión, mientras que el mismo número de animales permanecieron como controles a presión atmosférica ambiental (101,3 kPa). Al cabo de 7 meses, las ratas se sacrificaron y se aisló la fracción mitocondrial de hipocampo (H) y corteza (C). La producción de NO, determinada por el método espectrofotométrico de la oxihemoglobina, y el consumo de O<sub>2</sub>, determinado con un respirómetro de alta resolución, no mostraron cambios. La despolarización de la membrana, evaluada por citometría de flujo (sonda potenciométrica DiOC6), aumentó (en %) de  $16 \pm 1$  a  $25 \pm 1$  ( $p<0.01$ ) y de  $10 \pm 1$  a  $16 \pm 2$  ( $p<0.01$ ) en H y C, respectivamente. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, medida por el método espectrofluorométrico (escopoletina-HRP), disminuyó en H ( $p<0.05$ ). Se concluye que, probablemente debido a la mayor sensibilidad del cerebro a la deficiencia de O<sub>2</sub>, el mecanismo protector descrito previamente no se manifestó después de un período prolongado en condiciones de hipoxia relativamente severas. Sin embargo, los resultados podrían interpretarse dentro del marco de la hipótesis "uncoupling to survive" (Brand, 2000), por la cual una moderada caída del potencial de membrana mitocondrial disminuiría la producción de especies reactivas del oxígeno y el consiguiente daño oxidativo.

**076. (322) LA INOCULACIÓN INTRAMAMARIA DE PANAX GINSENG AL MOMENTO DEL SECADO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DEL SISTEMA DE FACTORES DE CRECIMIENTO ANÁLOGOS A INSULINA (IGFS).**

Dallard B.<sup>1</sup>; Pujato S.<sup>2</sup>; Baravalle C.<sup>3</sup>; Renna M.<sup>4</sup>; Rey F.<sup>5</sup>; Ortega H.<sup>6</sup>; Calvino L.<sup>7</sup>

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular, FCV, UNL<sup>1,2</sup> 3,4,5,6; Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, INTA<sup>7</sup> bdallard@fcv.unl.edu.ar*

Se ha descrito que el sistema de IGF regula el proceso de remodelación mamaria durante la involución. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de componentes del sistema de IGF en tejido mamario bovino y en leche identificando posibles modificaciones tras la aplicación intramamaria (IM) de Panax ginseng (PG) durante la involución temprana. Se utilizaron 6 vacas Holstein no preñadas en la etapa final de la lactancia. La unidad experimental fue el cuarto mamario. Ocho cuartos fueron inoculados con 10 ml de una solución de extracto de PG (3 mg del extracto seco/ml), 8 con 10 ml de solución fisiológica (placebo, P) y 8 fueron mantenidos como controles libres de inoculación (C). Los animales fueron secados luego del tratamiento y se sacrificaron a los 7 días para la obtención de tejido mamario. Previa inoculación se tomaron muestras de leche (hora 0) y a las 24, 48 y 72 hs post inoculación (pi). A los 7 días del secado se observó una

disminución ( $p < 0.05$ ) en los porcentajes de marcación evaluados por IHQ para IGF-I en los cuartos tratados con PG con respecto a los cuartos P y C; mientras que, los porcentajes de marcación para IGF-II fueron similares en los tres tratamientos. Los niveles de expresión de ARNm para IGF-I y II fueron similares en los tres grupos evaluados. Los porcentajes de inmunomarcación y los niveles de expresión de ARNm para IGFBP-3, -4 y -5 se vieron aumentados ( $p < 0.05$ ) en los cuartos tratados con PG con respecto a los cuartos P y C. La concentración de IGF-I en leche evaluada por RIA, fue mayor en los tratados con PG ( $p = 0.001$ ). La concentración de IGF-II en leche obtenida por ELISA, no se vio influenciada por el tratamiento ( $p = 0.942$ ). Los resultados revelan que la inoculación de PG al secado disminuye la expresión de IGF-I, no modifica la expresión de IGF-II y aumenta la expresión de IGFBP-3, -4 y -5 en la glándula mamaria contribuyendo en la aceleración del proceso de remodelación durante la involución temprana.

**077. (412) RELACION ENTRE EL ESTADO BUCAL Y NIVELES DE INMUNOGLOBULINA A SALIVAL EN ADOLESCENTES**

Juárez R.<sup>1</sup>; Martínez S.<sup>2</sup>; Vila V.<sup>3</sup>

Facultad de Odontología, Universidad Nacional del Nordeste<sup>1, 2, 3</sup>

ropablojuarez@gmail.com

Introducción: el principal papel de las IgA salival es contribuir a la inmunidad de las mucosas y se postula que inhiben la adherencia de microorganismos a las células de estas. Objetivo: el objetivo de este trabajo fue evaluar la relación entre la condición bucal de adolescentes y los niveles de IgA en saliva. Métodos: La población estuvo constituida por individuos sanos de ambos sexos. A todos los pacientes seleccionados se les realizó historia clínica completa, índice de caries, índice de placa y gingival. Para el dosaje de IgA en saliva se recolectó la muestra de cada paciente involucrado en el trabajo. La técnica utilizada para la determinación de IgA en saliva, fue la Inmuno-difusión Radial. Resultados: el 86% de la muestra presentó valores muy altos de índice de caries y el 54% mostraron valores de índice gingival y de placa no compatibles con salud. Se obtuvieron valores de IgA que variaron entre 1,90 y 15,40 mg/dl (promedio 9,36). El 36% (19 pacientes) presentaron valores de IgA menores a 4, mientras que el 64% (31 pacientes) mostraron valores entre 4 y 15,40 mg/dl. A fin de correlacionar los niveles de IgA con el estado bucal de los adolescentes, se consideraron los valores obtenidos del índice gingival de Loe-Silness ( $r = -0.0012$ , P-Valor= 1) no hallándose correlación significativa; y los valores de caries del CPOD ( $r = -0.3$ , P-valor= 0.04) donde la correlación fue significativamente inversa. Conclusión: Los valores de caries mostraron una correlación significativamente inversa, reflejándose que a niveles elevados de IgA en saliva, le correspondieron valores bajos de caries. La saliva podría tener una influencia moduladora sobre los microorganismos involucrados con la caries, por medio de la secreción de IgA.

**078. (491) EL ADP: UN NOVEDOSO MODULADOR DEL VOLUMEN CELULAR EN CÉLULAS DE HEPATOMA HUMANO.**

Espelt M.<sup>1</sup>; Alvarez C.<sup>2</sup>; De Tezanos Pinto F.<sup>3</sup>; Schwarzbau P.<sup>4</sup>

IQUIFIB, UBA, CONICET<sup>1, 2, 3, 4</sup>

vicespelt@yahoo.com.ar

La exposición de células hepáticas y de hepatoma a medios hipotónicos, induce el aumento del volumen celular seguido de la pérdida de iones y con agua. Esto provoca disminución regulatoria del volumen celular (RVD) que tiende a restaurar los valores de volumen a niveles control. El aumento de volumen en células hepáticas estimula la salida de ATP, el cual puede interactuar con receptores P2 y al mismo tiempo ser degradado a ADP por la actividad ectoATPasa de eNTPDasas. El objetivo del presente trabajo es estudiar la variación de volumen en células Huh-7 incubadas en medio hipotónico (Hypo), y el rol del ATP y/o ADP extracelulares en el RVD. La exposición de las células a Hypo generó aumento del volumen celular seguido de RVD de  $40.8 \pm 7.80$  % a los 40

min (RVD40), mientras que la concentración de ATPe aumentó 2.4 veces sobre el nivel basal (17 min). En Hypo con apirasa, una enzima que remueve el ATP y el ADP, el RVD fue similar al observado en Hypo solo (RVD40api= $42.2 \pm 9.71$  %) indicando que el ATP no mediaría el RVD. Sin embargo, en presencia de Hypo+Cibacron Blue y Suramina (inhibidores de receptores P), se inhibió el RVD sugiriendo un posible papel de los nucleótidos extracelulares en la respuesta. Las células incubadas en Hypo+(Na+/K+)-ATPasa (enzima que cataliza la producción de ATP a ADP) mostraron una fuerte activación del RVD (RVD40= $106.1 \pm 14.31$  %). Resultados similares se observaron al agregar el agonista de ADP, 2-Metil tio ADP, mientras que un inhibidor del receptor P2Y13 revirtió esta activación. Experimentos de RT-PCR mostraron la presencia de mRNA para el receptor P2Y13 y para eNTPDasa 2 (enzima que principalmente hidroliza ATP a ADP). En conclusión, estos resultados muestran por primera vez al ADP como molécula estimuladora del RVD que actuaría por su interacción con el receptor P2Y13. El ATP liberado al aumentar de volumen podría ser convertido a ADP por medio de la eNTPDasa 2. Realizado con subsidios UBACYT (20020100100090), CONICET (PIP1187) y ANPCyT (0151)

## GENÉTICA 1

**079. (207) DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE PORTADORAS DE DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE/BECKER. EL PARTICULAR CASO DE UNA MUJER SINTOMÁTICA (XO)**

Djenderedjian I.<sup>1</sup>; Luce L.<sup>2</sup>; Ottaviani D.<sup>3</sup>; Tonini S.<sup>4</sup>; Ferrer M.<sup>5</sup>; Szijan I.<sup>6</sup>; Giliberto F.<sup>7</sup>

Cátedra de Genética y Biología Molecular, FFyB, UBA<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>6, 7</sup>; Hospital de Día Polivalente, Hospital de Niños Ricardo

Gutierrez<sup>4</sup>; División Neurocirugía, Hospital de Clínicas

"José de San Martín", UBA<sup>5</sup>

ivannadjenderedjian@gmail.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. Los varones la padecen, las mujeres son portadoras asintomáticas y raramente afectadas. 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 es estimar el riesgo de ser portadoras de DMD de 9 mujeres con antecedentes familiares de la enfermedad. Como estrategia diagnóstica se realizó un estudio de segregación de STRs intragénicos con el uso del primer universal y marcación con fluorocromo para determinar el haplotipo de riesgo, aquel que posee el afectado de DMD. Dos mujeres se excluyeron de ser portadoras con un 95% de certeza por no haber heredado el haplotipo de riesgo. Dos mujeres son portadoras obligadas, madre e hija, ambas con un hijo enfermo de DMD. Otra mujer es portadora obligada al presentar sintomatología y un único cromosoma X (Turner XO) el diagnóstico fue corroborado molecularmente al comprobar que comparte el mismo haplotipo que uno de sus hermanos afectados. Cuatro de las mujeres aún están siendo analizadas, se sospecha la existencia de eventos de recombinación y mosaicismo germinal. El análisis de segregación de microsatélites permitió identificar los haplotipos de riesgo y estimar la probabilidad de ser afectado o portador de DMD, brindando un correcto asesoramiento genético a las familias consultantes. La importancia de este trabajo es demostrar la utilidad del estudio de segregación de alelos cuando es imposible afrontar el costo de técnicas como el MLPA para alcanzar un diagnóstico certero de DMD en familias afectadas y presentar el particular caso de una mujer con síndrome de Turner y sintomatología para DMD.

**080. (242) ANÁLISIS DE GENOTIPOS DE GENES RELOJ Y GENES METABOLIZANTES XENOBIÓTICOS EN MUESTRAS DE CÁNCER DE MAMA**

Cerliani M.<sup>1</sup>; Villanueva M.<sup>2</sup>; Richard S.<sup>3</sup>

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC, CO-  
NICET<sup>1 2 3</sup>  
bele\_cerliani@hotmail.com

Durante los últimos años, se ha evidenciado una estrecha relación entre el sistema circadiano y la proliferación celular, como así también un impacto de las variantes alélicas de genes reloj en el desarrollo tumoral. Por otro lado, el metabolismo y la detoxificación de fármacos y sustancias procarcinogénicas también se hayan vinculados al reloj circadiano. De esta forma, los patrones diarios de expresión de las enzimas metabolizantes xenobióticas, junto a las variantes alélicas que éstas pueden presentar, tienen efectos considerables sobre procesos celulares relevantes, en particular en el desarrollo tumoral. El objetivo del trabajo fue analizar los genotipos de genes reloj y genes metabolizantes xenobióticos (GMX), y su posible correlación en el desarrollo tumoral. Para ello, se realizó un estudio caso-control, con 62 muestras de cáncer de mama y 79 controles. Se analizaron los genes reloj PER3 (VNTR, alelos 4 o 5 repeticiones, GenBank AB047536), y CLOCK (SNP T3111C, GenBank rs1801260). Los GMX estudiados fueron GSTT-1 y GSTM-1 (ambos con polimorfismo null), y NAT2 (alelos acetiladores rápidos y lentos). Se utilizó técnica de PCR en todos los casos, con posterior RFLP para CLOCK y NAT2. Los genotipos 4/5 y 5/5 de PER3 no mostraron asociación con el cáncer de mama (OR 0.65, IC95% 0.33-1.3, p=0.22); lo mismo sucedió con los genotipos TC y CC de CLOCK (OR 0.70, IC95% 0.36-1.37, p=0.30). Analizando sólo las muestras tumorales, ninguno de los genotipos de GMX (wild-type/null para GSTs; rápido/intermedio/lento para NAT2) mostró asociación significativa con uno o varios genotipos de genes reloj, con excepción del genotipo GSTT-1 null y el homocigota TT para CLOCK (p=0.05). Un aumento en el número de casos y controles, así como la evaluación de una mayor cantidad de polimorfismos, nos permitirá dar una conclusión definitiva sobre el rol de las variantes alélicas de GMX y genes reloj en el riesgo de cáncer de mama.

**081. (308) EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN GSTP1 Y DEL POLIMORFISMO ILE105VAL EN PACIENTES CON MIELOMA MÚLTIPLE**

Stella F.<sup>1</sup>; Weich N.<sup>2</sup>; Slavutsky I.<sup>3</sup>; Fundia A.<sup>4</sup>  
Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones  
Hematológicas, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4</sup>  
fla\_stella@yahoo.com.ar

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia caracterizada por una infiltración atípica de células plasmáticas en médula ósea (MO). Las glutatión-S-transferasas (GSTs) son enzimas detoxificantes de fase II encargadas de la metabolización de diversos carcinógenos endógenos y exógenos y se asocian con la respuesta al tratamiento. Su actividad ha sido muy poco estudiada en MM. La isoforma GSTP1 tiene un polimorfismo de nucleótido único en el codón 105 con sustitución de isoleucina por valina (Ile105Val) que disminuye la actividad enzimática. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión y los polimorfismos genéticos de GSTP1 en pacientes con MM. Se cuantificó la expresión génica en MO de 42 pacientes con MM (21 varones; edad media: 65 años; rango: 30-87 años; estadios Durie & Salmon: I: 26%, II: 17%, III: 57%), y en linfocitos de sangre periférica de 11 controles normales. Se efectuó la extracción de ARN, síntesis de ADNc por RT-PCR y cuantificación mediante PCR en tiempo real. Por otra parte, en 16 pacientes se extrajo ADN a fin de realizar la genotipificación del polimorfismo Ile105Val mediante PCR-RFLP con la enzima de restricción Alw261. El 45% (19/42) de los casos mostraron sobreexpresión de GSTP1 (0,18±0,05) tomando como punto de corte la media de los controles (0,05±0,007) (p<0,0001). El análisis de los genotipos GSTP1 mostró que el 70% de estos tenía genotipo salvaje Ile/Ile y el 30% restante era heterocigota Ile/Val. Tres de los 6 casos con expresión disminuida tenía genotipo salvaje, en tanto que la otra mitad era heterocigota. No se identificaron individuos con genotipo homocigota variante Val/Val. Los resultados obtenidos sugieren que la sobreexpresión de GSTP1 se asociaría con el genotipo salvaje que se caracteriza por una actividad ca-

lítica normal y mayor capacidad detoxificante, pudiendo llegar a ser de importancia en la evaluación de respuesta terapéutica.

**082. (357) HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) COMO NUEVO MÉTODO DE SCREENING DE LA MUTACIÓN V617F DEL GEN JAK2 EN SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS. COMPARACIÓN CON LOS MÉTODOS DE SECUENCIACIÓN Y ARMS PCR**

Quintana S.<sup>1</sup>; Di Gerónimo V.<sup>2</sup>; Agriello E.<sup>3</sup>; Martín N.<sup>4</sup>; Pagani F.<sup>5</sup>  
Laboratorio de Biología Molecular, FARES TAIE Instituto  
de Análisis<sup>1 2</sup>; Laboratorio de Especialidades Bioquímicas<sup>3</sup>;  
Servicio de Hematología, Clínica Colón<sup>4 5</sup>  
biologiamolecular@farestaie.com.ar

La policitemia vera (PV), la trombocitemia esencial (TE) y la mielofibrosis idiopática (MI) son trastornos mieloproliferativos clonales estrechamente relacionados y caracterizados por una proliferación excesiva de una o más líneas mieloides tales como eritrocitos, plaquetas y fibroblastos de la médula ósea. En el año 2005, se identificó en varias de estas entidades una mutación en el gen tirosina quinasa Janus kinase 2 (JAK2). Esta mutación consiste en la sustitución de una G por una T en la posición 1849, resultando en la sustitución en la proteína de una fenilalanina por valina (JAK2 V617F). Es el objetivo de este trabajo determinar la utilidad de la técnica de HRM como método de screening de JAK2 V617F y comparar su sensibilidad y especificidad con la secuenciación y ARMS PCR. Con este fin se realizó extracción de ADN de sangre periférica de 25 pacientes con síndromes mieloproliferativos mediante técnica estándar. Todas las muestras de ADN fueron analizadas por las tres técnicas. Para el análisis de detección de JAK2 V617F por HRM se llevaron a cabo amplificaciones por PCR en Tiempo Real de un fragmento de 180 pb del gen jak2 con el intercalante fluorescente Evagreen. Además se estudió la presencia de JAK2 V617F por la técnica de PCR alelo específica refractaria (ARMS PCR) en Tiempo Real modificada y secuenciación. En este trabajo las técnicas de HRM y ARMS PCR mostraron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 87, 5%, mientras que la secuenciación mostró una sensibilidad del 88,8% y una especificidad del 100%. Las técnicas de HRM y ARMS PCR modificada presentaron en dos casos falsos positivos dado a la presencia de SNPs en las cercanías de la posición de JAK2 V617F. En conclusión, la técnica de HRM presenta varias ventajas como método de screening de la presencia de JAK2 V617F, debido a su alta sensibilidad, bajo costo y rapidez (<15 minutos) debiendo ser confirmados los resultados positivos por secuenciación.

**083. (407) MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE ACUMULACIÓN LISOSOMAL DE GB3 EMPLEANDO CITOMETRÍA DE FLUJO: POSIBLE HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA PARA MUJERES HETEROCIGOTAS CON ENFERMEDAD DE FABRY.**

De Francesco P.<sup>1</sup>; Ceci R.<sup>2</sup>; Mucci J.<sup>3</sup>; Rozenfeld P.<sup>4</sup>  
Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN),  
Facultad de Ciencias Exactas, UNLP<sup>1 2 3 4</sup>  
nicolasdefrancesco@gmail.com

La Enfermedad de Fabry (EF) es un desorden genético ligado al X, causado por la deficiencia en la enzima  $\alpha$ -galactosidasa A (GLA), que conduce a la acumulación lisosomal de globotriaosilceramida (Gb3). En varones, la demostración de la deficiencia enzimática es el diagnóstico confirmatorio. Para el diagnóstico de heterocigotas, el dosaje enzimático no es de utilidad ya que pueden obtenerse valores reducidos a normales. En aquellos casos donde el caso índice sospechoso es una mujer, el diagnóstico se confirma mediante la secuenciación completa del gen GLA, que codifica para dicha enzima. Dicho estudio puede ser no concluyente dado que un pequeño porcentaje de las mutaciones en EF, tales como inversiones, duplicaciones, o mutaciones intrónicas o en el promotor, son indetectables mediante el método analítico utilizado. El objetivo de este trabajo es proponer un método de diagnóstico basado en la detección de la acumulación de Gb3,



empleando citometría de flujo, y evaluar su utilidad para el diagnóstico de heterocigotas. Se cultivaron esplenocitos de ratones wild type (RWT) y knock-out para GLA (RF) o células mononucleares de individuos controles incubadas con 800  $\mu\text{M}$  de DGJ, un inhibidor de GLA, durante 18 hs en presencia de un análogo fluorescente del Gb3, NBD-Gb3. Luego se lavaron, se incubaron con medio fresco por diferentes tiempos (0, 24, 48 y 72 hs), y se analizaron por citometría de flujo. Tanto en los esplenocitos de RF como en las PBMC expuestas a DJG se detectó la acumulación de Gb3 evaluado como un aumento de fluorescencia, en comparación con los RWT y PBMC no tratada, respectivamente. La diferencia en fluorescencia fue mayor a las 24 hs. luego del lavado. Este método permitiría detectar la población celular con GLA deficiente del total de las PBMC de mujeres con sospecha de Fabry, separarla mediante cell-sorting, y facilitar el estudio genético a partir del análisis del alelo mutado haciendo uso de la secuenciación del ARNm.

**084. (485) MODELO IN VITRO DE PATOLOGÍA ÓSEA DE ENFERMEDAD DE GAUCHER: ESTUDIO DEL ROL DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN LOS MECANISMOS FISIOPATOGÉNICOS.**

Mucci J.<sup>1</sup>; De Francesco P.<sup>2</sup>; Scian R.<sup>3</sup>; Delpino M.<sup>4</sup>; Rzenfeld P.<sup>5</sup>

LISIN, *Fac de Ciencias Exactas, UNLP*<sup>1 2 5</sup>; *Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, UBA*<sup>3 4</sup>  
juanmarcosmucci@gmail.com

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. Resultados previos revelaron secreción de citoquinas proinflamatorias e inducción de osteoclastogénesis por parte de los sobrenadantes de células de nuestro modelo in Vitro de EG (SC). El objetivo es analizar la presencia de mediadores de osteoclastogénesis en los SC y evaluar el papel del TNF- $\alpha$  en dicho proceso. PBMC de controles normales se cultivaron en presencia de Condrutol  $\beta$ -epóxido (CBE), un inhibidor de la GBA, con el agregado de LPS. Los SC se utilizaron para tratar cultivos de una línea de monocitos humanos en presencia de M-CSF. Se determinó la inducción de osteoclastogénesis mediante el conteo de células TRAP+ y la medida de osteólisis por recuento de sitios de resorción utilizando una matriz ósea comercial, en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-TNF- $\alpha$ . Se observó un aumento en la cantidad de células TRAP+ multinucleadas y de sitios de resorción ósea en comparación con el control ( $p < 0,05$ ); ambos parámetros se redujeron en presencia del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ). En los sobrenadantes de cultivo de los osteoclastos diferenciados, se reveló un aumento significativo de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, aumento en la actividad metaloproteasa (MMP) neta medida por degradación de gelatina fluorescente, así como también aumentos en los niveles de quitotriosidasa, biomarcador utilizado en Enfermedad de Gaucher. Concluimos que el modelo de EG muestra niveles aumentados de osteoclastogénesis lo que podría contribuir a los problemas óseos presentes en la enfermedad y que uno de los mediadores responsables de dicho aumento sería la citoquina TNF- $\alpha$ . Por otro lado, también se observó que esta citoquina puede ser producida por los osteoclastos diferenciados dando lugar a un aumento en la osteoclastogénesis.

**085. (658) NUEVA VARIANTE MUTACIONAL DEL GEN FECH ASOCIADA A UN CASO GRAVE DE PORFIRIA CUTÁNEA ATÍPICA.**

Melito V.<sup>1</sup>; Colombo F.<sup>2</sup>; Granata B.<sup>3</sup>; Cano G.<sup>4</sup>; Infante L.<sup>5</sup>; Batlle A.<sup>6</sup>; Rossetti M.<sup>7</sup>; Parera V.<sup>8</sup>

CIPYP, CONICET, *Hospital de Clínicas, UBA, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA*<sup>1 2 7</sup>; CIPYP, CONICET, *Hospital de Clínicas, UBA*<sup>3 6 8</sup>; *Servicio de Dermatología, Hospital de Clínicas, UBA*<sup>4 5</sup>  
melito@qb.fcen.uba.ar

Las porfirias son enfermedades metabólicas producidas por fallas en el camino biosintético del hemo. Cada uno de los 8

tipos de porfiria resulta de la deficiencia enzimática parcial de alguna de las enzimas del camino, caracterizada por un patrón específico de acumulación y excreción de intermediarios. Nuestro objetivo fue diagnosticar a un paciente de 31 años con cuadro clínico y bioquímico ambiguo y grave manifestación cutánea: ampollas, hiperpigmentación, fragilidad cutánea, fotosensibilidad, eritrodancia, hipertricosis, lesiones oculares y ungueales, atrofia de falanges, sin síntomas agudos. El diagnóstico diferencial de porfirias se realiza mediante estudios bioquímicos. En este caso se requirió realizar estudios moleculares en los genes PPOX y FECH, asociados a Porfiria Variegata (PV) y Protoporfiria Eritropoyética (PPE) respectivamente. Se amplificaron y secuenciaron todos los exones y regiones flanqueantes de ambos genes que codifican para la protoporfirinógeno oxidasa y la ferroquelatasa, enzimas deficientes en la PV y en la PPE. Los estudios bioquímicos revelaron un índice de porfirinas plasmáticas característico de PV (9,81,  $\lambda=626$ ; VN:  $\leq 1,30$ ,  $\lambda=618$ ) elevada excreción de porfirinas fecales (1051  $\mu\text{g/g}$  seco, VN:  $\leq 130$   $\mu\text{g/g}$  seco) con patrón típico de PPE, sin excreción de porfirinas urinarias y precursores. En este caso, bioquímicamente atípico, el estudio genético estableció al diagnóstico diferencial, logrando identificar una nueva variante c.77 G>A del gen FECH que generó una mutación missense en el codón 26 del exón 2 (p.S26N), asociada en trans a un alelo de baja expresión formado por el haplotipo c.1-251 G, c.68-23 T, c.315-48 C, concordante con la forma autosómica dominante con penetrancia incompleta de PPE. Además de haber detectado una nueva mutación en el gen FECH, corroborando la heterogeneidad genética de las porfirias, debemos destacar la importancia del estudio genético en el diagnóstico de las porfirias con presentación atípica.

**086. (685) AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE PROTOPORFIRIA ERITROPOYETICA EN ARGENTINA**

Colombo F.<sup>1</sup>; Melito V.<sup>2</sup>; Granata B.<sup>3</sup>; Piñeiro M.<sup>4</sup>; Flagel 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, CIPYP, CONICET, Hospital de Clínicas, UBA, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA*<sup>1 2 7</sup>; *Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, CIPYP, CONICET, Hospital de Clínicas, UBA*<sup>3 4 5 6 8</sup>  
fpcolombo@hotmail.com

La Protoporfiria Eritropoyética (PPE) es un desorden hereditario de la biosíntesis del Hemo. Variantes de los genes FECH ó ALA-S2 contribuyen a la manifestación de PPE. Presenta herencia autosómica pseudodominante cuando se desencadena por variantes del gen FECH ó dominante ligada al cromosoma X cuando lo hace por variantes del gen ALA-S2 (PPDLX). El gen FECH presenta más de 178 mutaciones que asociadas en trans a un alelo de baja expresión, en particular a las variantes c.1-251G, c.68-23T y c.315-48C asociadas en cis (haplotipo GTC), contribuyen a modular la penetrancia de PPE. Nuestro objetivo fue determinar asociaciones de variantes genéticas causantes de la manifestación clínica de PPE para desarrollar un método de diagnóstico diferencial, profundizando el conocimiento del comportamiento de estas variantes en pacientes PPE, pacientes con otras porfirias y voluntarios sanos. Se analizaron 235 perfiles genéticos, entre pacientes PPE y familiares, pacientes con otras porfirias y voluntarios sanos, amplificando las regiones flanqueantes de los 11 exones y 5 variantes polimórficas del gen FECH. Todos los pacientes PPE, que presentaron la forma autosómica dominante de la enfermedad, asociaron en trans, un alelo de baja expresión del tipo GTC, cuyas 3 variantes polimórficas a su vez presentan un alto grado de cosegregación en nuestra población (frecuencia alélica 0,169). De 42 individuos portadores de mutaciones en el gen FECH, sólo 13 no asociaron en trans un alelo de baja expresión (portadores asintomáticos). En pacientes con otras porfirias, el haplotipo GTC se encuentra presente en niveles significativamente menores con respecto a la población control (frecuencia alélica 0,043\*); por lo tanto, la detección del haplotipo GTC en pacientes porfíricos con manifestación clínica compatible con PPE o ambigua se convirtieron en la mejor opción para direccionar en forma rápida y precisa el diagnóstico molecular del paciente. \* Test exacto de Fisher:  $P < 0,0017$ , (95% IC)

## INMUNOLOGÍA 1 E INFECTOLOGÍA 1

### 087. (32) ACCIÓN INMUNOMODULADORA DE CURCUMINA SOBRE POBLACIONES CELULARES CLAVE DEL SISTEMA INMUNE EN LA DIABETES TIPO I

Castro C.<sup>1</sup>; Barcala Tabarozzi A.<sup>2</sup>; Antunica Noguero M.<sup>3</sup>; Liberman A.<sup>4</sup>; Arzt E.<sup>5</sup>; Dewey R.<sup>6</sup>; Perone M.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires, CONICET, Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>; Instituto Tecnológico De Chascomus (IIB-INTECH), CONICET, Universidad Nacional de Gral. San Martín<sup>8</sup>*  
 carlonacastro@fbmc.fcen.uba.ar

La diabetes mellitus dependiente de insulina (T1D) es una enfermedad autoinmune mediada por linfocitos T que destruyen progresivamente las células  $\beta$  del páncreas. Los linfocitos Th1 promueven esta enfermedad y las células presentadoras de antígeno, por su parte, juegan un rol fundamental en el desarrollo de T1D. Curcumina (Cur; diferuloylmethane) es un potente antioxidante, anti-tumoral y anti-inflamatorio. Estudiamos el potencial terapéutico de Cur en el modelo de aceleración de diabetes por ciclofosfamida en el ratón NOD (non-obese diabetic). Resultados previos mostraron que Cur previene el desarrollo de T1D. En este reporte describimos la acción de Cur sobre algunas poblaciones celulares clave del sistema inmune involucradas en el desarrollo de T1D. Empleando transfecciones transientes de genes reporteros en células EL4 (linfoma T murino), Cur 20  $\mu$ M inhibió las actividades transcripcionales de Tbet (factor de transcripción maestro para la expresión de IFN $\gamma$  en células Th1) sobre sus elementos de respuesta (ER) (68%,  $p < 0.001$ ) y la del promotor del gen de IFN $\gamma$  (82%,  $p < 0.001$ ), y no afectó la actividad transcripcional sobre los ER de GATA-3. Esplenocitos de ratones NOD en cultivo, desafiados con PMA+Ionomomicina y tratados con Cur disminuyeron significativamente la expresión de Tbet en comparación con los controles (Western Blot). Además, la secreción de IFN $\gamma$  (ELISA) fue disminuída, en concordancia con la menor expresión de Tbet observada. También, estudiamos el efecto in vitro de Cur en DC derivadas de médula ósea de ratones NOD. Cur inhibió la expresión de MHC-II, CD40, CD80, CD86 estimuladas por LPS + IFN $\gamma$ . Observamos que Cur redujo significativamente los niveles de secreción de IL12p70, IL6 y TNF $\alpha$  (ELISA) en DC estimuladas con LPS + IFN $\gamma$ . La capacidad de Cur de retardar la aparición de T1D en ratones NOD estaría mediada por su acción inmunorreguladora sobre células presentadoras de Ag (DC) y células T.

### 088. (34) LOS GLUCOCORTICOIDES INHIBEN LA EXPRESIÓN DE INTERLEUQUINA-17A, PRINCIPAL CITOQUINA EFECTORA DEL LINAJE DE LINFOCITO T DE AYUDA 17

Antunica Noguero M.<sup>1</sup>; Aprile García F.<sup>2</sup>; Castro C.<sup>3</sup>; Barcala Tabarozzi A.<sup>4</sup>; Perone M.<sup>5</sup>; Liberman A.<sup>6</sup>; Arzt E.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires, CONICET, Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
 mariaantunica@fbmc.fcen.uba.ar

Los glucocorticoides (GCs) son ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes dado su efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor. Recientemente se ha identificado un nuevo linaje de linfocito T de ayuda (Th), Th17, implicado en la patogénesis de enfermedades autoinmunes. El factor de transcripción (FT) maestro de este linaje y principal responsable de la producción de su citoquina característica, interleuquina (IL)-17A, es ROR $\gamma$ t. Dado que IL-17A está asociada al desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, nuestro objetivo es estudiar el efecto de los GCs sobre la producción de esta citoquina y en particular sobre la actividad transcripcional de ROR $\gamma$ t con el fin de caracterizar el mecanismo molecular involucrado en la regulación de su actividad e identificar posibles blancos terapéuticos. Estudiamos el

efecto del GC sintético dexametasona (Dex) (10-100nM) sobre la actividad del promotor de IL-17A en ensayos reporteros en la línea de linfoblastoma T murino, EL4, que expresa ROR $\gamma$ t endógeno. Evaluamos el mecanismo molecular involucrado utilizando el inhibidor de histona-deacetilasas (HDACs) trichostatina A (TSA) (1  $\mu$ M). Analizamos la interacción entre el GR y ROR $\gamma$ t mediante ensayos de coimmunoprecipitación. Evaluamos la expresión de IL-17A en presencia de Dex por qPCR. Observamos que Dex inhibe la actividad del promotor mínimo de IL-17A clonado río abajo del enhancer CNS-2 (50%,  $p < 0.01$ ), fuertemente regulado por ROR $\gamma$ t. Esta inhibición se revierte en presencia del inhibidor de HDACs, TSA. También demostramos que el GR interactúa con ROR $\gamma$ t. Observamos que Dex inhibe la expresión de IL-17A en cultivos primarios de esplenocitos tratados con concanavalina A (ConA) (2.5  $\mu$ g/ml) (50%,  $p < 0.01$ ) y en la línea celular EL4 (27%,  $p < 0.01$ ). Concluimos que los GCs inhiben la actividad del promotor y expresión de IL-17A. El mecanismo molecular involucrado estaría mediado por interacción del GR con el FT clave, ROR $\gamma$ t, y el reclutamiento de HDACs.

### 089. (126) CÉLULAS DE LANGERHANS: SU PARTICIPACIÓN EN UNA VACUNA EXPERIMENTAL CONTRA MELANOMA B16-F1 MURINO

Ruiz M.<sup>1</sup>; Gazzaniga S.<sup>2</sup>; Mac Keon S.<sup>3</sup>; Campisano S.<sup>4</sup>; Bravo A.<sup>5</sup>; Wainstok R.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Biología Tumoral, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 4</sup>; Laboratorio de Biología Tumoral, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA, Fundación Instituto Leloir, IIBBA, CONICET<sup>3 6</sup>; Htal. Eva Perón, San Martín<sup>5</sup>*  
 ma.sol.ruiz@gmail.com

Las células de Langerhans (CL) son un subtipo de células dendríticas (CD) presentes en la epidermis. El objetivo general de este trabajo fue evaluar su participación en el mecanismo de protección antitumoral producida por la vacunación con CD cargadas con células de melanoma murino B16 apoptóticas/necróticas (Apo/Nec). Se evaluó la distribución de CL en el sitio de vacunación por inmunohistoquímica en cortes de pieles normales y sitios vacunados, a 24hs y 120hs post-vacunación. Se midió la capacidad migratoria de CD cutáneas ex vivo en respuesta al medio condicionado de CD-Apo/Nec, CD solas y Apo/Nec solas. Se analizó la capacidad de las CL de fagocitar células Apo/Nec in vitro, mediante cocultivo de suspensiones epidérmicas con Apo/Nec, ambas marcadas con colorantes vitales fluorescentes, y citometría de flujo. Resultados: a 24hs y 120hs post-4 vacunas CD-Apo/Nec se observó reclutamiento de células Langerina+ en sitios vacunados, localizadas principalmente en el infiltrado inflamatorio que rodea a la vacuna. No se detectaron diferencias en el número de células que migraron en respuesta al medio condicionado CD-Apo/Nec, CD ó Apo/Nec en comparación con el control (RPMI) (ANOVA 1 factor,  $p > 0.05$ ). En los ensayos de fagocitosis in vitro, las suspensiones epidérmicas utilizadas presentaron (3,4 $\pm$ 2) % de células Langerina+. A las 24hs de cocultivo se registró un (6 $\pm$ 2)% de fagocitosis, definida como el % de células doble positivas. Conclusión: ya que el sitio de vacunación ha sido descrito anteriormente como una estructura de tipo pseudolinfocito terciaria, con posible actividad en la generación de una respuesta inmune, la presencia de CL, formando parte del infiltrado inflamatorio, y su capacidad de fagocitar células Apo/Nec in vitro, sugieren una posible función de las CL como células captadoras de antígenos tumorales en el sitio de vacunación.

### 090. (218) ESTUDIO DEL FENOTIPO Y EFECTO PROTECTOR DE LAS CÉLULAS QUE COMPONEN UNA VACUNA A CÉLULAS DENDRÍTICAS CONTRA EL MELANOMA MURINO B16 F1

Campisano S.<sup>1</sup>; Gazzaniga S.<sup>2</sup>; Mac Keon S.<sup>3</sup>; Ruiz M.<sup>4</sup>; Kordich L.<sup>5</sup>; Mordoh J.<sup>6</sup>; Wainstok R.<sup>7</sup>  
*FCEN, UBA, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Biología Tumoral<sup>1 2 4</sup>; FCEN, UBA, Departamento de Química Biológica, Laboratorio de Biología Tumoral, Fundación Instituto Leloir<sup>3 7</sup>; FCEN, UBA, Departamento de*

*Química Biológica, Laboratorio de Homeostasis y Trombosis<sup>5</sup>; Fundación Instituto Leloir<sup>6</sup>  
scampisano@qb.fcen.uba.ar*

La vacunación con células dendríticas (CD) derivadas de precursores provenientes de médula ósea (MO), cargadas con células tumorales apoptóticas/necróticas (ApoNec) en ratones singeneicos induce inmunidad a largo plazo contra el melanoma murino B16 F1. Nuestro propósito fue evaluar el fenotipo de las células en la vacuna y su rol en la protección in vivo. Luego de incubar las células de MO con el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos murino durante 7 días, se separaron las células dendríticas CD11c+ (CD+) de las demás células CD11c- (CD-) con una columna de microesferas magnéticas anti-CD11c. Ambas poblaciones se analizaron cualitativa y cuantitativamente con May Grünwald-Giemsa y se evaluaron antígenos de superficie (CD11c, MHC II, F4/80, CD14, CD11b, Ly6G y CCR7) pre- y post-cultivo con ApoNec por citometría de flujo. Se identificaron células mononucleares y polimorfonucleares en ambas preparaciones, determinándose un porcentaje mayor de neutrófilos en la fracción CD- (Chi2 p<0,0001). La fracción CD- expresó un bajo porcentaje de células CD11c+ (9,7%) y de células CD11c- F4/80+ (13%) y un elevado porcentaje de Ly6-G (79,6%). En contraste, la fracción CD+ se enriqueció en CD11c+ (65%) y expresó Ly6-G (59,5%) y F4/80 (7,5%), de las cuales el 6,8% fueron CD11c+F4/80+. Ambas fracciones expresaron elevados porcentajes de CD11b (CD+: 68%; CD-: 79%); bajos niveles de CD14 (CD+: 2,8%; CD-: 1,2%) y de CCR7 (CD+: 3%; CD-: 3,4%). Después del cultivo con ApoNec aumentó la expresión de F4/80 en CD- (83%) y de MHC II en ambas fracciones (CD+: 37,3%; CD-: 46,3%). Asimismo, se realizaron experimentos de vacunación con CD/ApoNec, CD+/ApoNec y CD-/ApoNec, lográndose una protección de 50% para los animales vacunados con CD/ApoNec (Chi2 p=0,012), 20% para los ratones vacunados con CD-/ApoNec y 0% para los vacunados con CD+/ApoNec y PBS. Por lo tanto, la fracción CD- debe cooperar con la fracción CD+ en la conformación de la vacuna para generar protección.

**091. (294) EFECTOS DEL ADENOCARCINOMA DE PULMON MURINO LP07 SOBRE LOS NEUTROFILOS POLIMORFONUCLEARES**

Karas R.<sup>1</sup>; Klein S.<sup>2</sup>; Diament M.<sup>3</sup>  
*Dpto de Bioterio y Cáncer Experimental, Área de Investigación, Instituto de Oncología Angel H Roffo<sup>1,2,3</sup>  
rominah33@yahoo.com.ar*

Hemos determinado que durante su progresión, el tumor LP07 cursa con una inflamación crónica y leucocitosis a expensas de PMN (PMN-P). PMN-P obtenidos de cavidad peritoneal (tioglicolato 3%), presentaron mayor actividad de MPO y NADPH oxidasa. El tratamiento in vivo con indometacina (Indo, 10ug/mL oral), inhibió la actividad de estas enzimas, así como el crecimiento del tumor primario y las metástasis espontáneas. Objetivo: Evaluar si la portación del tumor LP07 y el tratamiento con Indo, modifican la funcionalidad de los PMN. Resultados: Evaluamos la velocidad de producción de H2O2 (ensayo de fluorescencia; uMol H2O2/min1x-106cell): PMN-P= 0.2±0.01; PMN de ratones normales (PMN-N)= 0.3±0.03; PMN de ratones portadores tratados con Indo (PMN-I)= 0.1±0.01 (PMN-I vs PMN-P y PMN-N: p<0.01). Estudiamos la viabilidad de los PMN (MTS-PMS) incubados por 20hs con medio condicionado de LP07 (MC-LP07) (% respecto de RPMI): PMN-N: 192±17 (vs RPMI p<0.001); PMN-P: 97±1.6 (vs RPMI p=ns); PMN-I: 139±0.2 (vs RPMI p<0.01). RPMI (%): PMN-N: 100±7; PMN-P: 147±9; PMN-I: 148±10 (PMN-N vs PMN-P PMN-I p<0.001). Evaluamos el efecto del MC-LP07 sobre la apoptosis de PMN-N en cultivos de 20hs (tinción con DAPI-IP) % células apoptóticas/ totales: 13.8±2.1 vs Control (RPMI): 38.6±2.7 (p<0.001). Mediante citometría de flujo analizamos las células CD11b-Gr1- en sangre de ratones. Analizamos la expresión de A) CD11b (marcador de la activación) (%/total) en portadores del tumor (P): 42±2; normales (N): 15±1 (vs P p<0.001); y portadores del tumor tratado con Indo (I): 1±0,3 (vs P p<.0.001). B) Expresión de Gr1 (marcador de diferenciación)(%/total): P: 58±5; N: 16±1 (vs P

p<0.001); I: 50±3 (vs P: ns). Conclusión: La portación del tumor activa y diferencia los PMN. Las células LP07 liberarían factores que aumentan la vida media de los PMN, disminuyendo la muerte celular programada. El tratamiento in vivo con Indo revierte los efectos causados por la portación del tumor.

**092. (317) EFECTO DE LA GEMCITABINA SOBRE LA INMUNOSUPRESIÓN ASOCIADA AL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN MURINO LP07**

Porte Alcon S.<sup>1</sup>; Blidner A.<sup>2</sup>; Klein S.<sup>3</sup>; Diament M.<sup>4</sup>  
*Dpto de Bioterio y Cáncer Experimental, Área de Investigación, Instituto de Oncología Ángel H Roffo<sup>1,2,3,4</sup>  
s.portealcon@gmail.com*

Las Células Mieloides Supresoras (MDSC) suprimen la respuesta inmune antitumoral, mediante la producción de óxido nítrico (ON) y la actividad de la enzima arginasa (ARG), entre otros. En diversos modelos tumorales murinos, el tratamiento in vivo con gemcitabina (GEM) disminuyó la población MDSC esplénica. Previamente determinamos que ratones portadores del adenocarcinoma de pulmón murino LP07 avanzado (P-LP07), presentan un aumento de MDSC en el bazo, comparado con ratones normales. Objetivo: Evaluar en el modelo LP07, si la depleción de las MDSC mediante el tratamiento con GEM permite establecer una respuesta antitumoral más eficiente. Resultados: Se evaluó la susceptibilidad in vitro de las células LP07 (cLP07) al tratamiento con GEM. Analizamos la proliferación celular (MTS-PMS) determinando una IC50=0.024 mg/ml (R2=0.99). El tratamiento in vivo de P-LP07 con 1 dosis/semana de 60 mg/kg de GEM i.p. (P+GEM) a lo largo de la evolución tumoral (mm3), inhibió el desarrollo neoplásico (día 30). P+GEM: 179±16; P-LP07: 870±75 (p<0.0001). El % de MDSC (CD11b+Gr1+) disminuyó en los bazos de P+GEM: 7±1 vs P-LP07: 29±2; (p<0.0001). La producción de ON en medio condicionado de esplenocitos (Spl) (reacción de Griess, nmol nitrito/106 Spl) fue menor en P+GEM: 0,024 vs P-LP07: 0.040 (p<0.001). También se observó una disminución en la actividad ARG (mg urea/mg proteína) en homogenato de bazo, P-LP07: 12±1 vs P+GEM: 9±0.4 (p<0.05). La respuesta inmune antitumoral se evaluó in vivo mediante el co-inoculo de cLP07 y Spl (relación 1:20, Test de Winn). Los Spl de P+GEM inhibieron la proliferación in vivo de las cLP07, en comparación con Spl de P-LP07 (232±19 mm3 vs 547±82 mm3, p<0.01). Conclusión: El tratamiento con GEM además de tener un efecto inhibitorio directo sobre las cLP07, logró establecer una respuesta antitumoral eficiente (Test de Winn). La reducción de la actividad ARG y el nivel de ON observados en P+GEM se correlaciona con la disminución de las MDSC en los bazos de P+GEM.

**093. (432) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA INTEGRINA ALFA V EN LOS EFECTOS PROLIFERATIVOS INDUCIDOS IN VIVO E IN VITRO POR TIROXINA (T4) EN CÉLULAS DE LINFOMA T MURINAS.**

Cayrol F.<sup>1</sup>; Valli E.<sup>2</sup>; Sterle H.<sup>3</sup>; Barreiro Arcos M.<sup>4</sup>; Genaro A.<sup>5</sup>; Cremaschi G.<sup>6</sup>  
*CEFYO<sup>1,2,3,4,5</sup>; CEFYO, FFyB, UBA<sup>6</sup>  
flor\_cayrol@yahoo.com.ar*

Las hormonas tiroideas (HTs) regulan, a través de mecanismos genómicos y no genómicos, la proliferación y diferenciación de distintos tipos celulares incluyendo los linfocitos. En varios tipos celulares se ha descrito que la integrina  $\alpha V \beta 3$  puede actuar como receptor para los efectos no genómicos de las HTs, sin embargo aun no se conoce si juega este papel a nivel linfocitario. A fin de verificar el papel de las integrinas  $\alpha V$  y  $\beta 3$  en los efectos de T4, estudiamos en líneas de linfomas T murinos su expresión, su modulación hormonal y su relación con la capacidad proliferativa celular. Adicionalmente comparamos estos resultados con los hallados en células de linfoma creciendo in vivo como tumor ascítico en ratones singeneicos. Encontramos, por microscopía confocal y por citometría de flujo, altos niveles de expresión de la integrina  $\alpha V$ , pero no de la  $\beta 3$ , en células de los linfomas T EI-4 y BW5147 y los mismos fueron regulados positivamente por incubación de las células durante 24 hs con T4 (10-7M). Este

aumento de la integrina  $\alpha V$  fue confirmado por el incremento de su ARNm ( $p < 0.01$ ) a las 6 h de cultivo con T4 y fue acompañado por el posterior (12 h) aumento del ARNm para PCNA ( $p < 0.05$ ). Estos efectos incluyeron además la activación rápida de señales purificadoras como la fosforilación de ERK. Adicionalmente, se generaron tumores ascíticos de linfomas EL-4 en ratones controles e hipertiroideos (por tratamiento con T4, r-T4). Dichos tumores tuvieron una mayor velocidad de crecimiento en r-T4 y las células purificadas del drenaje ascítico mostraron niveles incrementados del ARNm de PCNA y de un aumento de la integrina  $\alpha V$  por citometría de flujo ( $p < 0.05$ ). Estos resultados indican que la integrina  $\alpha V$  podría estar involucrada en las acciones no genómicas de HTs a nivel linfocitario, que su expresión estaría modulada por la T4 y que podría tener algún rol en los mecanismos que llevan al crecimiento celular inducido por la hormona tanto in vitro como in vivo.

**094. (438) ESTUDIO DE LA MODULACION EPITELIO-INTRAEPITELIO INTESTINAL EN UN PROCESO INFLAMATORIO POR INMUNODEFICIENCIA SECUNDARIA.**

Andrea G.<sup>1</sup>; Roux M.<sup>2</sup>; Calabrese G.<sup>3</sup>  
*Cátedra de Biología Celular y Molecular, FFyB, UBA<sup>1,3</sup>; Laboratorio de Glicoinmunobiología, Instituto de Cardiología Dr Taquini, UBA, CONICET<sup>2</sup>*  
*andreadanielagonzalez@live.com.ar*

Trabajos previos han demostrado que los antígenos dietarios inducen tolerancia oral al antígeno dextrina de la dieta y aumento de los linfocitos T  $\gamma\delta+$  tanto en la lámina propia como en los linfocitos intraepiteliales (LIEs) de la vellosidad intestinal. Además, la colocalización de esta subpoblación con los TCD8+ y los TNF- $\alpha$ + sugiere la presencia de un proceso inflamatorio en el modelo experimental de inmunodeficiencia secundaria. Recientemente se ha descrito que las células T  $\gamma\delta+$  están involucradas en la producción de IL17. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión de IL17 y de los factores de transcripción relacionados tanto con tolerancia oral como con la persistencia de inflamación en el modelo experimental de inmunodeficiencia secundaria por malnutrición proteica severa al destete. La expresión de IL17 fue estudiada en la fracción microsomal de células epiteliales intestinales (CIEs) por Western Blot. Un aumento significativo de IL17 fue encontrado en las CIEs de los animales R21 (2.6 vs 1.5 DO/ $\mu$ g de prot.; R21 vs C60  $P < 0.01$ ). Los LIEs TCD4+, CD8+ y  $\gamma\delta+$  fueron estudiados por microscopía confocal utilizando el método de doble inmunofluorescencia indirecta para investigar que fenotipo expresaba IL17 y/o FOXP3. Se determinó en los animales R21 que: 1) 70% de los LIEs T $\gamma\delta+$  coexpresaban IL17; 2) la localización de FOXP3 en el núcleo de las células CD8+(CD8+FOXP3+) fue del 45% y 3) la localización nuclear de FOXP3 en células CD4+(CD4+FOXP3+) fue menor al 18%. Conclusión: 1) los linfocitos T CD8+FOXP3+ son las principales células Treg en nuestro modelo experimental y 2) las células  $\gamma\delta+$  IL17+ contribuirían a la perpetuación de la inflamación tanto en la respuesta inmune innata, así como en las tardías de la inmunidad adaptativa.

**095. (490) REGULACIÓN DEL ESTADO TIROIDEO SOBRE EL DESARROLLO DEL LINFOMA T MURINO EL-4 CRECIENDO IN VIVO EN RATONES SINGENEICOS. PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA INMUNE (SI) E IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR INVOLUCRADAS.**

Sterle H.<sup>1</sup>; Valli E.<sup>2</sup>; Paulazo A.<sup>3</sup>; Cremaschi G.<sup>4</sup>; Barreiro Arcos M.<sup>5</sup>  
*CEFyBO, CONICET, UBA<sup>1,2,3,5</sup>; CEFyBO, CONICET, FFyB, UBA<sup>4</sup>*  
*lenki74@yahoo.com.ar*

Hemos demostrado que las hormonas tiroideas (HT) regulan in vitro la proliferación de las células del linfoma T murino EL-4, e in vivo modulan el desarrollo de dicho linfoma creciendo como tumor sólido en ratones singeneicos. El objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación de las HT sobre la progresión tumoral, analizando la funcionalidad del SI y la participación de las proteínas reguladoras del ciclo celular. Para ello, las células EL-4 fueron

inoculadas s.c. en ratones singeneicos hiper (H) o hipotiroideos (Hip) (por administración oral de T4 o PTU, respectivamente). Los animales H mostraron una mayor velocidad de crecimiento tumoral y una reducida sobrevida respecto de los eutiroides (Eu). Los Hip presentaron una velocidad de crecimiento menor, sin embargo desarrollaron más metástasis en riñón que los Eu o H. Análisis por RT-PCR en tiempo real a partir de ARNm de tumores sólidos indican un incremento en la expresión génica de las ciclinas A2, D1, D3 y E1 y una disminución de p21 y p27 en ratones H ( $p < 0.05$ ). Los Hip no mostraron diferencias significativas en la expresión de las ciclinas, pero incrementaron la expresión de p27. Los niveles de ARNm de Rb no fueron modulados por el estado tiroideo. La expresión génica de las metaloproteasas (MMP) 2 y 9 sólo se incrementó ( $p < 0.05$ ) en los animales H. Por otro lado, los ratones H mostraron in vitro una respuesta proliferativa linfocitaria incrementada (cuantificada por incorporación de [3H]-TdR) de células T y B frente a mitógenos, mientras que en los Hip estaba disminuida. La actividad de células NK (medida a través de la lisis de células YAC-1 marcadas radioactivamente) fue mayor en animales H comparados con los Eu e Hip ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que las HT modulan el desarrollo tumoral a través de la regulación de proteínas regulatorias del ciclo celular, de la expresión de MMP que podrían favorecer la angiogénesis y de la modulación del SI que podría limitar la formación de metástasis.

**096. (500) DESARROLLO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA LA DETECCIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES**

Viale D.<sup>1</sup>; Lloret P.<sup>2</sup>; Longinotti G.<sup>3</sup>; Ybarra G.<sup>4</sup>; Moina C.<sup>5</sup>; Rarizzani M.<sup>6</sup>  
*Escuela de Ciencia y Tecnología, Univ. Nac. de San Martín<sup>1</sup>; Laboratorio de Nanomateriales del Centro INTI-Procesos Superficiales<sup>2,3,4,5</sup>; Lab. de Neuro y Citogenética Molecular, ECyT, Univ. Nac. de San Martín<sup>6</sup>*  
*dviale@unsam.edu.ar*

El diagnóstico de muchas enfermedades humanas involucra la detección de bacterias, virus o proteínas causantes de la afección y este proceso puede demandar desde horas a semanas. El objetivo de este proyecto es la generación de un sistema de detección de biomarcadores moleculares. Este procedimiento involucra el desarrollo de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con alta capacidad de unión de ADN. La ventaja de las nanopartículas magnéticas unidas a moléculas que interactúan de modo específico con un biomarcador blanco es permitir, por magnetismo, la separación y pre-concentración del mismo. Nuestro proyecto propone utilizar aptámeros, un tipo de anticuerpos sintéticos formados por cadenas simples de ADN capaces de detectar y/o bloquear compuestos o proteínas, para la separación selectiva de muestras biológicas complejas y la detección de biomarcadores. En colaboración con el Laboratorio de Nanomateriales del Centro INTI-Procesos Superficiales se prepararon nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas, encapsuladas en una matriz esférica de dióxido de silicio con un diámetro de alrededor de 80nm conteniendo grupos funcionales aminos. A estas partículas magnéticas se les unió, mediante glutaraldehído, moléculas de estreptavidina recombinante producida en E.coli y purificada en nuestro laboratorio. El sistema estreptavidina-biotina posee una de las afinidades más fuerte que se conocen ( $K_d = 10-14M$ ). Este sistema fue utilizado para unir las nanopartículas recubiertas con estreptavidina a la biotina presente en los aptámeros de ADN elegidos. La capacidad de unión de estas partículas en procesos de separación magnética fue medida de forma indirecta mediante la cuantificación de ADN no unido (2175 sitios de unión por partícula). En conclusión, logramos obtener nanopartículas reciclables, recubiertas de estreptavidina, capaces de unir moléculas marcadas con biotina con 100 veces más capacidad que las disponibles comercialmente.

**097. (532) ANÁLISIS DE VARIABLES ASOCIADAS A LA RESISTENCIA/SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDERO EN LAS ETAPAS AGUDA Y CRÓNICA DE LA PRIMAINFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS (TS), EN RATONES CBI-IGE CON DISTINTO GENOTIPO**

Vasconi M.<sup>1</sup>; Kopp G.<sup>2</sup>; Bertorini G.<sup>3</sup>; Indelman P.<sup>4</sup>; Di Masso R.<sup>5</sup>; Hinrichsen L.<sup>6</sup>

*Instituto de Genética Experimental (IGE), Fac. Cs. Médicas, UNR, Área Parasitología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>1</sup>; Instituto de Genética Experimental (IGE), Fac. Cs. Médicas, UNR<sup>2</sup>; Área Parasitología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>3</sup>; Instituto de Genética Experimental (IGE), Fac. Cs. Médicas, UNR, CIC, UNR<sup>5</sup>*  
mdvasconi@yahoo.com.ar

La susceptibilidad a infecciones parasitarias está determinada por una compleja ecuación que resulta de la interacción entre el ambiente, el genotipo del hospedero y el genotipo del parásito. Aunque los parásitos requieren de la convivencia con su hospedero, éste lo reconoce como extraños y pone en juego mecanismos para eliminarlo. La compleja relación hospedero-parásito muestra la necesidad de contar con modelos experimentales que permitan el estudio de esta interacción. Las líneas CBi/C, CBi/L y CBi de la colonia CBI-IGE responden en forma distinta al desafío con dosis crecientes de Ts; la carga parasitaria aumenta al aumentar la dosis infectante pero la magnitud del incremento es diferente para cada genotipo: CBi/C y CBi son "susceptibles" y CBi/L "resistente". Por ello, se estudió el efecto del genotipo en el curso de la infección. Se usaron machos (n=36 por sexo) infectados por vía oral con dos larvas infectantes L1 de Ts por g de peso corporal, que se sacrificaron en el período agudo (6 y 13 días post-infección (p-i)) para analizar el número de parásitos adultos (nPA) y la fecundidad de las hembras (Fh), extraídos de una porción del intestino delgado, y en el crónico (30 días p-i) para estimar la carga parasitaria muscular (CP). No se observó efecto de sexo en nPA y CP. Tanto nPA como Fh disminuyeron entre los 6 y 13 días p-i en CBi/L (P<0.001). En CBi/C y CBi, nPA disminuyó (P<0.01) mientras que Fh no se modificó (P>0.05). CP fue baja en CBi/L y alta en CBi/C y CBi (P<0.0001). La resistencia de CBi/L sería atribuible una respuesta inmune temprana que crearía un ambiente inapropiado para el establecimiento de los adultos. La susceptibilidad de CBi/C y CBi podría deberse a una respuesta inmune tardía que facilitaría al parásito completar su ciclo biológico. La utilización de un modelo murino como las líneas CBI-IGE presenta la ventaja adicional de investigar la respuesta de un hospedero natural del parásito.

**098. (501) ESTUDIO DE MARCADORES FENOTÍPICOS DE ATENUACIÓN EN CEPAS DE VIRUS JUNIN RECUPERADAS DE INDIVIDUOS RECIENTEMENTE VACUNADOS CON LA CEPA JUNIN CANDID #1: ÍNDICES DE LETALIDAD Y PROTECCIÓN EN ANIMALES DE LABORATORIO.**

Gamboa G.<sup>1</sup>; Saavedra M.<sup>2</sup>; Maiza A.<sup>3</sup>; Mariani M.<sup>4</sup>; Rodrigues García Armoa G.<sup>5</sup>; Ambrosio A.<sup>6</sup>  
*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. JI Maiztegui<sup>1 2 3 4 6</sup>; Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil<sup>5</sup>*  
graciela2113@yahoo.com.ar

Candid #1 (C#1) es una vacuna segura y efectiva utilizada para prevenir la Fiebre Hemorrágica Argentina. En el año 2005 se realizó un Estudio Clínico Puente y durante el mismo se intentó el aislamiento por co-cultivo de células mononucleares de sangre periférica de 10 individuos vacunados y se logró aislar dos cepas de VJUN (65604 y 65727), identificadas por neutralización. El objetivo de este trabajo fue comparar las características fenotípicas de atenuación de las dos cepas recuperadas de vacunados con la vacuna C#1. Para ello se utilizaron ratones de diferentes edades (ratón recién nacido, de 10 a 12 días y adulto) y cobayos de 350 g. Se midieron los Índices de Eficiencia de Letalidad (IEL), de Infección (IEI) y de Protección (IEP). El ratón recién nacido fue el único que mostró letalidad con las tres cepas estudiadas, sin embargo para ratón de 10 a 12 días, ratón adulto y cobayo, ninguna de las cepas fue letal, aún para la más baja dilución inoculada. Los cobayos inoculados con las cepas recuperadas 65604 y 65727 y con la cepa C#1 no mostraron signos de enfermedad y resultaron protegidos al ser desafiados con la cepa

patógena P3790. Estudios previos demostraron que el ratón de 10 a 12 días y el cobayo de 350 g son los indicadores específicos de atenuación en las cepas de VJUN, los índices obtenidos en estos modelos fueron:

Cepa	Ratón de 10 a 12 días		Cobayos de 350g	
	IEL	IEI	IEI	IEP
Candid#1	>0.42	-1.41	-1.41	-1.90
65604	>2.46	-0.37	-0.37	-0.37
65727	>2.10	-1.40	-1.40	-1.52

Cepa	IEL	IEI
Candid#1(10-12d)	>3.11	-0.50
65604(10-12d)	>3.98	-1.40
65727(10-12d)	>3.70	-1.74

Los resultados presentados indican que estas cepas tienen un alto poder infectante y que son altamente protectoras. La comparación de estos índices demostró que las cepas 65604 y 65727 no presentan diferencias con respecto a C#1 y que mantienen las características de atenuación de la vacuna, considerándose que la posibilidad de revertir por un pasaje en humanos es poco probable.

**099. (335) PPAR $\gamma$  Y PPAR $\alpha$  MODULAN LA EXPRESIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON TRYPANOSOMA CRUZI**

Penas F.<sup>1</sup>; Vera M.<sup>2</sup>; Hovsepian E.<sup>3</sup>; Mirkin G.<sup>4</sup>; Sales M.<sup>5</sup>; Goren N.<sup>6</sup>  
*CEFYO<sup>1 2 3 5 6</sup>; Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA<sup>4</sup>*  
federicopenas@hotmail.com

La enfermedad de Chagas está relacionada con el establecimiento de procesos inflamatorios agudos y crónicos en diferentes tipos celulares, siendo los macrófagos un blanco importante para la infección por *Trypanosoma cruzi* (Tc). Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPAR), son factores de transcripción dependientes de ligandos que participan en la regulación del metabolismo lipídico y en la inflamación. 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14 PGJ2 (15d) y Wy14643 (Wy) agonistas de PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  respectivamente han sido implicados en la modulación inflamatoria. Sin embargo, el papel de estos ligandos en la enfermedad de Chagas aun no ha sido del todo explorado. Por dicho motivo, analizamos la respuesta inflamatoria y su modulación por 15d y Wy en macrófagos peritoneales obtenidos de ratones BALB/c infectados con una cepa aguda (RA) y otra crónica (K-98) de Tc. Los macrófagos aislados fueron cultivados a los 6 (RA) y 21 (K-98) días post infección. Se observó en ambos modelos mediante Western blot (Wb), expresión de óxido nítrico (NO) sintasa 2 (NOS2). Asimismo, ambas cepas de Tc aumentaron significativamente la liberación de NO por parte de los macrófagos ( $\mu$ M: Control: 9 $\pm$ 0,7; RA: 32,7 $\pm$ 3,5; K-98: 81,3 $\pm$ 4,3 p<0,01). El tratamiento con 15d o Wy, inhibió tanto la expresión de NOS2, como la liberación de NO (15d: 29,4%RA; 36,7%K-98. Wy: 38,9%RA; 46,5%K-98 p<0,05). Con el objeto de estudiar si las cepas RA y K-98 de Tc activan la vía de NF- $\kappa$ B, extractos citosólicos de macrófagos de ratones infectados fueron analizados mediante Wb. Observamos para ambas cepas la desaparición característica del inhibidor I $\kappa$ -B $\alpha$ , así como también el traslado de p65 al núcleo celular. Podemos concluir que tanto la cepa aguda, como la crónica de Tc inducen un aumento de mediadores inflamatorios activando la vía de NF- $\kappa$ B. Además, pudimos demostrar que los ligandos PPAR $\gamma$  y PPAR $\alpha$  serían potenciales moduladores inflamatorios en macrófagos peritoneales provenientes de ratones infectados.

**100. (100) EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL VIRUS DE HEPATITIS B EN LA CIUDAD DE MAR DEL PLATA**

Elizalde M.<sup>1</sup>; Campos R.<sup>2</sup>; Barbini L.<sup>3</sup>  
*Cátedra de Virología, FFyB, UBA, Laboratorio de Virología,*

Instituto Nacional de Epidemiología<sup>1,3</sup>; Cátedra de Virología, FFyB, UBA<sup>2</sup>  
mecheeli@hotmail.com

**Introducción.** El virus de hepatitis B (HBV) se clasifica en 8 genotipos (gts, A-H) con distribución geográfica característica. Dada la heterogeneidad de su genoma, se describen mutaciones en el determinante "a" del HBsAg (escape a la vacuna), el gen pol (resistencia a antivirales), el BCP en 1762-64 y el precore en G1896A (definen el fenotipo HBeAg [-]). **Objetivos.** Determinar la distribución de gts de HBV circulantes en Mar del Plata. Describir las variantes de HBsAg, pol, BCP-precure y proteína X (HBV-X). **Metodología.** Se analizaron 29 sueros con serología positiva (anti-core IgG y HBsAg). Se amplificó por nested-PCR el gen S (76-791), gen X, BCP y precure (1281-1957). Los productos se secuenciaron y alinearon con referencias de cada gt. Se genotipificó mediante análisis filogenético. Las secuencias del HBsAg, pol y HBV-X se obtuvieron por traducción de los genes correspondientes. **Resultados.** La filogenia (gen S) mostró al gt F como el más prevalente (72,4%), seguido por el gt A (13,8%) y los gts D y G (6,9%). El 34,5% de las muestras presentaron cambios en HBsAg, 5 relacionados con reducción en la antigenicidad (1 de ellas en el determinante "a"). Nueve pacientes (31%) mostraron cambios de aas en la polimerasa (4 asociados a resistencia a antivirales). En BCP-precure, el 81,25% presentó AGG en 1762-64, que se tradujo a KV en 130-131 de HBV-X (wild type, wt), el 12,5% evidenció TGA (gt G) que se tradujo a MT, y el 6,25% mostró TGG (gt F1b), traducido a MV. En 1896-98, el 83,3% mostró GGG (wt), mientras que el 16,7% presentó AGG (gts G y F4). **Conclusiones.** Se describe un predominio del gt F, nativo americano, respecto de los gts A, D y G de Europa y USA. Es el primer reporte de pacientes con gt G en Argentina. Las sustituciones de aas en HBsAg ocurren principalmente fuera del determinante "a". Se detectan mutaciones de resistencia a antivirales. La mayoría de las muestras presentan en BCP-precure nucleótidos wt, asociados al estadió HBeAg [+], y KV en 130-131 de HBV-X.

#### 101. (99) USO DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Mamone L.<sup>1</sup>; Gándara L.<sup>2</sup>; Di Venosa G.<sup>3</sup>; Rodríguez L.<sup>4</sup>; Buzzola F.<sup>5</sup>; Battle A.<sup>6</sup>; Casas A.<sup>7</sup>  
CIPYP<sup>1,2,3,4,6,7</sup>; Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>  
adriana@qb.fcen.uba.ar

La Terapia Fotodinámica (TFD) es un tratamiento que consiste en la administración de un compuesto fotosensibilizante (FS) que al ser iluminado induce muerte celular vía radicales libres. Recientemente, la TFD se propuso para el tratamiento de ciertas infecciones bacterianas. El objetivo de este trabajo fue investigar una colección de extractos de plantas autóctonas para encontrar nuevos FS para el control de infecciones bacterianas. Para el screening se estudió el efecto fotosensibilizador de 70 extractos metanólicos y acuosos frente a tres especies bacterianas. Para ello, los cultivos bacterianos se incubaron con diferentes concentraciones de los extractos y luego se irradiaron por 40 min. La viabilidad bacteriana se determinó por recuento de las UFC/ml en placas de agar. Las especies *Tabebuia impetiginosa* flor, *Solanum verbascifolium* flor, *Tecoma stans* flor y *Cissus verticillata* raíz fueron fototóxicas para *Staphylococcus epidermidis* pero no para las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Con *S. verbascifolium* (extracto metanólico) se observó una reducción estadísticamente significativa en las UFC/ml luego de la TFD luego de 1 h de preincubación con el FS (0,5 mg/ml) y 3 hr de iluminación (2x10<sup>8</sup> UFC/ml control vs. 5x10<sup>3</sup> tratado; p < 0,01, Mann-Whitney test). Los controles positivos con los FS azul de Toluidina y clorina e6 indujeron una disminución en 7 órdenes de magnitud las UFC/ml. *S. epidermidis* incorporó 12 ± 0,5 pg de extracto por UFC, de acuerdo a lo determinado fluorométricamente. Estos resultados resaltan el potencial de las especies vegetales como fuente de sustancias fotosensibilizantes. Actualmente se están aislando los compuestos fotoactivos encontrados.

## METABOLISMO Y NUTRICIÓN 1

#### 102. (28) INDICE DE MASA CORPORAL, NIVEL DE ACTIVIDAD FÍSICA Y PERFIL LIPÍDICO EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS

Fernandez I.<sup>1</sup>; Feliu M.<sup>2</sup>; Ferris P.<sup>3</sup>; Vidueiros S.<sup>4</sup>; Silva C.<sup>5</sup>; Pallaro A.<sup>6</sup>; Slobodianik N.<sup>7</sup>  
Cátedra de Nutrición, FFyB, UBA<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>  
ferni@ffyb.uba.ar

**Introducción:** La mayor incidencia de enfermedad coronaria se ha relacionado con un perfil lipídico anormal (colesterol total, triglicéridos y LDL-col elevados, HDL-colesterol bajo e índice de Castelli > 4,5). El sedentarismo y un elevado índice de masa corporal (IMC) pueden modificar el nivel de los lípidos y asociarse a la aparición de eventos coronarios. **Objetivo:** Analizar el IMC, el nivel de actividad física (AF) y el perfil de lípidos plasmáticos en un grupo de estudiantes universitarios. **Material y Métodos.** Se recolectó plasma en ayunas de un grupo de 90 alumnos (18 hombres y 72 mujeres) con edades comprendidas entre 25-30 años, que cursaron la materia Nutrición correspondiente al Ciclo Profesional de la Carrera de Bioquímica, entre los años 2003-2009. Se determinó la concentración de colesterol total (CT, mg%) y HDL-col (mg%) (método colorimétrico-Rvos.Wiener-equipos automatizado CCX-Abbott) y se calculó el Índice de Castelli (IC=CT/HDL). Cada alumno calculó su nivel de actividad física diaria y registró su peso y talla para calcular el IMC (P/T<sup>2</sup>). **Resultados.** Los valores obtenidos fueron (MEDIA+DE): Mujeres (CT: 165.8 ± 26.0; HDL: 58.5 ± 12.2; IC: 2.9 ± 0.7; AF: 1.7 ± 0.2; IMC: 21.2 ± 2.5) Hombres (CT: 168.1 ± 32.4; HDL: 51.2 ± 7.3; IC: 3.4 ± 1.0; AF: 1.7 ± 0.2; IMC: 24.8 ± 2.5). En forma general ambas poblaciones tienen IC < 4,5 y valores de IMC dentro del rango normal, a pesar de tener un nivel de actividad físico ligero (AF=1.40-1.70). Al analizar los grupos femenino y masculino se observa que sólo el 1% y 12 % supera el punto de corte IC>4.5, respectivamente, concomitante con un IMC > 24,9 en el 7% de las mujeres y 63% de los hombres. **Conclusiones.** De los datos obtenidos surge que la población masculina presenta un mayor riesgo de padecer futuras enfermedades cardiovasculares. Parcialmente financiado por la UBA (B-074).

#### 103. (29) LA ACCIÓN VASOPROTECTORA DEL FITOESTRÓGENO GENISTEÍNA ES CONDICIONADA POR LA PRESENCIA DE ESTRÓGENOS OVÁRICOS

Rauschemberger M.<sup>1</sup>; Sandoval M.<sup>2</sup>; Cesari N.<sup>3</sup>; Massheimer V.<sup>4</sup>  
Cátedra de Bioquímica Clínica II, BBYF, UNS, CONICET<sup>3,4</sup>; Cátedra de Bioquímica Clínica II, BBYF, UNS, Unidad Básica Química, Ciencias Básicas, UTN<sup>5</sup>  
mbrausch@criba.edu.ar

Considerando que los fitoestrógenos (FE) son propuestos como agentes que previenen enfermedades cardiovasculares en edad adulta, y que estrona (E1) es el principal estrógeno circulante en la menopausia, el objetivo fue evaluar los efectos conjuntos de genisteína (Gen) y E1 a nivel vascular. Se emplearon anillos de aorta (AA) y cultivos de células endoteliales y de células musculares (CE y CMLV) de ratas hembras jóvenes y adultas. Se midió agregación plaquetaria (AP) y producción de NO, en presencia ó ausencia de LPS. En AP, 5 min. de tratamiento con Gen, E1 ó Gen+E1 inhibieron la AP (45;38;48% s/c resp., p<0,05). En presencia de LPS, la AP fue máxima (98%), efecto revertido parcialmente si previo al agregado de LPS, los AA se exponen a los agonistas estrogénicos (57;46; 69 %AP, E1+LPS; Gen+LPS; E1+Gen+LPS resp., p<0,02). Sabiendo que el NO media la acción antiagregante de E1 y Gen, medimos el efecto de tratamientos conjuntos de E1 y el FE sobre la producción endotelial de NO. En CE de ratas jóvenes, 5 min. de tratamiento con E1; Gen; E1+Gen estimularon significativamente la síntesis del vasoactivo. En CE adultas, si bien los tratamientos individuales no mostraron diferencias significativas s/control, la adición conjunta estimuló la síntesis de NO (13,3±0,9 vs16,0± 0,9 nmoINO/mg prot, C vs E1+Gen, p< 0,05). A nivel muscular el LPS induce la síntesis de NO vía

NOSi. Se investigó la acción del FE y E1 sobre dicha acción del LPS, empleando cultivos CMLV. La presencia de Gen, agregada 5 h previo al tratamiento con LPS (21 h), inhibió la producción de NO inducida por LPS ( $184 \pm 1,3$  vs  $233 \pm 8,5$  nmol NO/mg prot resp.  $p < 0,02$ ). En cambio el pretratamiento simultáneo con Gen+E1 potenció la acción del proinflamatorio ( $172\%$  s/LPS). Estos resultados sugieren que, ante una injuria vascular, la potencial acción vasoprotectora de Gen (en términos de AP y producción de NO) depende del tipo celular, presencia de estrógenos ováricos y tiempo de exposición a los mismos.

**104. (38) LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINA C JUNTO CON ÁCIDO ALFA-LIPOICO PREVIENE EL INCREMENTO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA Y DE LOS NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN QUE PRESENTAN LAS RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA**

Reyes Toso C.<sup>1</sup>; Wallinger M.<sup>2</sup>; Balzer R.<sup>3</sup>; Ricci C.<sup>4</sup>; Reyes Toso M.<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*

La administración crónica de 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. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados se considera que el incremento en los niveles de anión superóxido estaría vinculado con su producción. Anteriormente se comprobó que el ácido alfa-lipoico -AL- reducía (pero no prevenía), el incremento de la presión arterial. En este trabajo se estudiaron los efectos de la administración (20 semanas) por vía oral, de vitamina C -VC- junto con 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 VC+AL, -C- ó F10%; 2- con VC+AL (50 mg/día de cada una), -C-VC+AL- ó F10%-VC+AL. Se controlaron: PAS, glucemias, prueba de tolerancia oral a la glucosa -PTOG-, triglicéridos -TG y 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 ( $P < 0,001$ ), los TBARS en plasma ( $P < 0,001$ ) y alteró la PTOG ( $P < 0,001$ ). Los TBARS en corazón e hígado también aumentaron-Test "t" Student ( $P < 0,01$  y  $0,001$ ). La dieta con F10% + VC-AL previno el incremento de la PAS y TBARS ( $P > 0,05$  vs C y C-VC+AL), y disminuyó el aumento de los TG y de la glucemia durante la PTOG (ANOVA  $P < 0,01$  y  $P < 0,05$  respectivamente). Estos resultados muestran que la administración crónica de VC+AL contrarresta el incremento de la PAS y de algunas variables metabólicas que ocurren con una dieta con F10%, en forma más efectiva que el AL sólo. Este efecto estaría parcialmente relacionado con la acción de la VC de mantener reducido al alfa-tocoferol endógeno, neutralizando sus efectos pro-oxidantes.

**105. (70) ESTRES OXIDATIVO EN GLÁNDULAS SALIVALES EN UN MODELO DE SJÖGREN EXPERIMENTAL**

Reides C.<sup>1</sup>; Ferreira S.<sup>2</sup>; Lasagni Vitar R.<sup>3</sup>; Llesuy S.<sup>4</sup>

*FFyB, UBA<sup>1 2 3 4</sup>*

*creides@ffyub.uba.ar*

El Síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad crónica de naturaleza autoinmune que destruye progresivamente la glándula salivar y lagrimal. Los ratones diabéticos no obesos (NOD), que desarrollan espontáneamente una histopatología semejante al SS e hiposalivación son el modelo más ampliamente aceptado para este síndrome. El objetivo del presente estudio fue determinar diferentes parámetros de estrés oxidativo en glándula salivar de un modelo experimental de SS. Se utilizaron ratones macho NOD ( $n=10$ , 6 meses) como grupo Sjögren (GS) comparándose con ratones BALB/C ( $n=12$ , 6 meses) como grupo control (GC). Con el objeto de determinar la ocurrencia de estrés oxidativo se evaluaron los siguientes marcadores: lipoperoxidación (TBARS),

glutación total (GSH) y las actividades de enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR) and tioredoxina reductasa (TR). Los TBARS en el GS fueron  $2,89 \pm 0,67$  nmol/ mg proteína (GC:  $0,83 \pm 0,11$  nmol/ mg proteína  $p < 0,05$ ). GSH en GS fue  $0,65 \pm 0,11$   $\mu$ mol/ g (GC:  $0,36 \pm 0,06$   $\mu$ mol/g  $p < 0,05$ ). La actividad de SOD en GS fue  $3,88 \pm 0,58$  U/ mg proteína (GC:  $1,86 \pm 0,27$  U/ mg proteína  $p < 0,01$ ). Los niveles de CAT en GS fueron  $0,49 \pm 0,06$  pmol/ mg proteína (GC:  $0,84 \pm 0,12$  pmol/ mg proteína  $p < 0,05$ ). La actividad de GR fue  $3,22 \pm 0,55$  nmol/min.mg proteína en el GS (GC  $2,12 \pm 0,24$  nm/min.mg proteína,  $p < 0,01$ ). TR fue  $2,20 \pm 0,31$  nmol/min.mg proteína en el GS (GC  $1,23 \pm 0,13$  nmol/min.mg proteína  $p < 0,005$ ). El estudio mostró un aumento en la peroxidación lipídica en la glándula salivar del GS evidenciada por un incremento en los valores de TBARS. A su vez se observó un incremento tanto en el GSH como en los antioxidantes enzimáticos SOD, GR y TR, con una disminución en los niveles de CAT. Estos resultados sugieren una respuesta al estrés oxidativo crónico en este modelo experimental. Son necesarios más estudios para clarificar el significado biológico de la disminución de CAT.

**106. (74) TOXICIDAD CRÓNICA DEL HIERRO, HOMEOSTASIS REDOX INTRACELULAR Y DAÑO OXIDATIVO IN VIVO EN HÍGADO Y CEREBRO.**

Ferrarotti N.<sup>1</sup>; Musacco Sebio R.<sup>2</sup>; Saporito Magriñá C.<sup>3</sup>; Massot F.<sup>4</sup>; Torti H.<sup>5</sup>; Ossani G.<sup>6</sup>; Repetto M.<sup>7</sup>

*Cátedra de Química General e Inorgánica, Cátedra de Análisis Clínicos I, Inmunología Clínica, FFyB, UBA<sup>1</sup>; Cátedra de Química General e Inorgánica, FFyB, UBA<sup>2 3 7</sup>; Cátedra de Física, FFyB, UBA<sup>4 5</sup>; Centro de Patología Experimental, Facultad de Medicina, UBA<sup>6</sup>*  
*ferrarot@ffyub.uba.ar*

Los niveles intracelulares del hierro (Fe) están regulados por proteínas de transporte y almacenamiento. La exposición crónica a Fe altera la homeostasis redox y genera daño oxidativo (DO). El objetivo de este trabajo fue comparar la toxicidad inducida por exposición crónica a Fe en hígado (H) y cerebro (Ce). Se administró FeCl<sub>2</sub> (1 g/L en agua de bebida) a ratas Sprague Dawley (250 g) durante 42 días. Se evaluó el DO en H y Ce y el tiempo de DO máximo respecto al control (C) ( $p < 0,01$ ) mediante: Quimioluminiscencia de órgano in vivo (QI), oxidación de lípidos (TBARS); oxidación de proteínas (carbonilos, CO), metabolitos del óxido nítrico (NO), homeostasis redox (glutatión (GSH)/GSSG); actividad de NADPHoxidasa, catalasa (Cat) y glutatión transferasa (GT). La concentración tisular de Fe (cFe) en H y Ce se determinó por absorción atómica y la anatomía-histopatología por microscopía óptica del H. Se observó: incremento del 118% en cFe a los 2 días de tratamiento y correlación positiva entre cFe y tiempo H ( $r: 0,76$ , C:  $65 \pm 2$  mg/g hígado); 100% de QI en H (C:  $12 \pm 1$  cps/cm<sup>2</sup>) y 16 veces en Ce (C:  $11 \pm 2$  cps/cm<sup>2</sup>), ambos a los 7 días; TBARS aumentó 100% en H a los 2 días (C:  $7 \pm 1$  nmol/g), y 62% en Ce a los 4 (C:  $6,4 \pm 0,4$  nmol/g). A los 4 días, en H, CO aumentó en un factor de 2,6 (C:  $115 \pm 19$  nmol/g) y NO 2,4 (C:  $0,32 \pm 0,04$  mmol/g); en Ce CO aumentó en un factor de 2,1 (C:  $111 \pm 3$  nmol/g), y NO de 1,7 a los 14 días (C:  $0,13 \pm 0,03$  mmol/g). A los 2 días disminuyó la actividad de Cat 67% (C:  $548 \pm 108$  pmol/g) y a los 7 días NADPHox un 14% (C:  $0,22 \pm 0,02$  nmol/min.g) en H. En Ce aumentó 43% GT (C:  $23 \pm 1$  U/g) a los 14 días. A los 2 días GSH/GSSG disminuyó 50% en H (C:  $0,49 \pm 0,01$ ) y 62% en Ce (C:  $0,28 \pm 0,01$ ). El Fe genera DO por exposición crónica en H y Ce, proporcional al tiempo de exposición y a la oxidación de biomoléculas. La oxidación de lípidos y la generación de NO son eventos previos al DO tisular y el evento primario promotor del DO sería la alteración de la homeostasis redox por consumo de GSH.

**107. (164) ACEITE ALTO OLEICO EN ALTA CONCENTRACIÓN: EFECTO SOBRE TRIGLICÉRIDOS, COLESTEROL Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN SUERO DE RATAS. ESTUDIO PRELIMINAR.**

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

Cátedra de Nutrición, FFyB, UBA<sup>1,2,3,5,6,7,8</sup>; Instituto Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, INTA-Castelar<sup>4</sup>  
pperris@ffy.uba.ar

**Introducción:** En la alimentación, los lípidos cumplen un rol muy importante siendo esencial conocer los ácidos grasos que la constituyen, para prevenir enfermedades crónicas y mejorar la calidad de vida. **Objetivo:** Estudiar el efecto de dieta con alto contenido de ácido oleico y en alta concentración, sobre triglicéridos(TG), colesterol total(CT) y capacidad antioxidante total(TAC) en suero de ratas en período de crecimiento activo. **Metodología:** Ratas Wistar al destete (21-23 días) fueron divididas en 2 grupos y alimentadas durante 10 y 40 días con: 1)dieta experimental al 20 % de proteína (caseína) y 50% de grasa aportada por aceite alto oleico (grupo AO) y 2)dieta normocalórica (grupo control:C). Ambas dietas aportan el resto de los nutrientes según AIN93. Se determinó el perfil de ácidos grasos por cromatografía gaseosa, calculándose la relación  $\omega 6/\omega 3$  de la dietas utilizadas AO:86/1; C:9/1. Al finalizar la experiencia las ratas fueron sacrificadas y en suero, se determinó la concentración de TG(mg/dl) y CT(mg/dl) por método enzimático-colorimétrico. TAC (mM-Trolox equivalentes) se determinó por técnica descripta por Miller NJ and Re R. Los resultados fueron expresados como Media +DE; con un nivel de significación \* (p<0.01):

GRUPOS	CT	TG	TAC
AO(10días)	71.0±10.6	67.0±15.9	1.20±0.08*
C(10días)	64.2±12.8	62.5±19.0	1.40±0.05
AO(40días)	96.3±13.2*	63.8±43.3	1.25±0.08*
C(40días)	74.3±12.4	66.2±38.8	1.45±0.18

**Resultados y discusión:** El grupo que recibió la dieta aportadora de alto oleico durante 40 días presentó valores de colesterol estadísticamente superiores al respectivo control. No se encontraron diferencias en la concentración de TG, entre los diferentes grupos experimentales. Por otra parte, TAC presenta valores estadísticamente inferiores al control, independientemente del tiempo de administración de la dieta. Estos hallazgos serían consecuencia de la alta concentración lipídica de la dieta sumado a la distorsión de la relación  $\omega 6/\omega 3$ . Financiado por UBACyT 20020100200078

**108. (174) EL AGREGADO DE OLIGOSACÁRIDOS NO DIGERIBLES A LA DIETA DURANTE EL CRECIMIENTO AUMENTA LA ABSORCIÓN Y RETENCIÓN DE CALCIO EN UN MODELO ANIMAL DE RATAS WISTAR**

Weisstaub A.<sup>1</sup>; Abdala V.<sup>2</sup>; Gonzalez Chaves M.<sup>3</sup>; Bryk G.<sup>4</sup>; Pellegrini G.<sup>5</sup>; Marotte C.<sup>6</sup>; Orzuza R.<sup>7</sup>; Zeni S.<sup>8</sup>; Zuleta A.<sup>9</sup>  
FFyB, UBA, Hospital de Clínicas, Sección Osteopatías Médicas<sup>1,2,3,4,5,6,7,8,9</sup>  
arweiss@ffy.uba.ar

**Introducción:** Durante el crecimiento para alcanzar el pico máximo de masa ósea es necesaria la ingesta de una dieta con alto contenido de calcio biodisponible. Por esto se recurre al agregado de oligosacáridos no digeribles que son fermentados por la flora colónica, provocando disminución del pH intestinal y aumento de solubilidad y absorción de minerales. **Objetivo:** determinar el impacto de dietas suplementadas con oligosacáridos no digeribles sobre la biodisponibilidad y retención de calcio en un modelo animal de ratas Wistar en crecimiento. **Materiales y métodos:** Ratas macho recién destetadas se alimentaron durante 60 días (Tf) con las siguientes dietas ad libitum (n=8/grupo): control (DC), a base de mezcla de fructooligosacáridos e inulina (DFOS) y a base de povidex (DPx). Los últimos cinco días se midieron consumos de dieta y se recogieron las heces para calcular absorción aparente de calcio (AaCa), a Tf se removió el ciego y se midieron peso y pH del contenido cecal y se determinaron contenido mineral óseo total (CMO) y DMO de tibia proximal (DMOt) y columna (DMOc) con un Densitómetro DPX Alpha 8034, con un software especial para pequeños animales. **Resultados:** El peso del ciego de DFOS y DPx fueron mayores a DC (g) (5.93±0.28 vs 4.31±0.71 vs 3.05±0.25; p< 0.001) mientras que

el pH de DFOS fue menor a DPx y DC (5.52±0.22 vs 6.85±0.17 vs 6.97±0.18; p<0.001). DFOS y DPx presentaron una mayor AaCa que DC (%) (91.3±5.2 vs 87.6±3.2 vs 71.1±3.3; p<0.001). El CMO (mg/g) fue: DFOS > DPx > DC (20.4±1.9 vs 17.1±2.0 vs 11.7±1.6; p<0.01). La DMOt (mg/cm2) de DFOS fue mayor a DPx y DC (266.0±14.8 vs 239.9±23.6 vs 220.1±15.3) y la DMOc (mg/cm2) de DFOS y DPx fueron mayores a DC (269.4± 25.7 vs 248.5±10.2 vs 231.5± 10.6). **Conclusiones:** El aumento de la fermentación de DFOS y DPx evidencia la existencia de actividad prebiótica en los oligosacáridos utilizados, lo que favorecería el aumento de la AaCa y retención de calcio durante el crecimiento. UBACyT 20020090200037

**109. (279) LA MADURACIÓN ÓSEA SE RELACIONA CON EL ESTADO RESPECTO DEL CALCIO A TRAVÉS DE MARCADORES DEL TIPO CTX EN NIÑOS PREPÚBERES**

Dupraz H.<sup>1</sup>; Rio M.<sup>2</sup>; Zeni S.<sup>3</sup>  
FFyB, UBA<sup>1,2</sup>; Facultad de Odontología<sup>3</sup>  
hedupraz@ffy.uba.ar

En niños prepúberes, el marcador óseo  $\alpha$ -CTX se ajusta a una curva de decaimiento con la edad mientras que  $\beta$ -CTX no muestra cambios en esa franja etaria. Buscando una forma de evaluar la maduración ósea a través de dichos marcadores, analizamos la relación  $\alpha/\beta$ , sobre la hipótesis de que esta se relacionara con el estado nutricional cálcico. **Objetivo:** Establecer la relación entre la adecuación respecto del Ca y la maduración ósea a través del comportamiento de la relación  $\alpha/\beta$  CTX en niños de 1° a 4° grado (6 a 10 años). **Metodología:** De un grupo de 200 niños escolares, de ambos sexos, se analizaron los 180 con datos para los 3 indicadores, determinados en la segunda orina de la mañana tomada en ayunas: Ca (AA), creatinina (Jaffé) y  $\alpha$  y  $\beta$  CTX (NB-Denmark). Los resultados se expresaron como cociente  $\alpha/\beta$ . El indicador Ca/Cr se evaluó con valores de referencia: Ca/Cr: <0,07, deficiente; 0,07-0,15, adecuado y > 0,15, elevado. Se utilizó test ANOVA con programa GraphPad. **Resultados:** Los resultados, analizados por grado, se muestran en la siguiente tabla:  $\alpha/\beta$  CTX expresado como X ± DS (n), según indicador cálcico (Ca/Cr)

GRADO	Deficiente (D)	Adecuado (A)	Elevado (E)
	(< 0.07)	(0.07-0.15)	(> 0.15)
1°	2,04 ± 1,56 (12)	1,61 ± 0,62 (14)	1,50 ± 0,72 (8)
2°	2,04 ± 0,54 (16)	1,46 ± 0,70 (17)	1,50 ± 0,69 (10)
3°	1,88 ± 1,23 (23)	1,36 ± 0,56 (17)	1,55 ± 0,49 (8)
4°	1,36 ± 0,46 (23)	0,99 ± 0,29 (15)	1,29 ± 0,50 (10)

Diferencias significativas (P<0.02) se encontraron en los niños del grupo A, no así en D ni E, este último con pocos casos (36 vs 59 y 74). **Conclusión:** La normal evolución de la relación  $\alpha/\beta$ , normal maduración ósea, depende en la infancia, de la adecuación nutricional cálcica.(UBACyT B060)

**110. (349) LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINA E Y ÁCIDO ALFA-LIPOICO EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL POR FRUCTOSA EN LA DIETA PREVIENE EL INCREMENTO DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA SIN DISMINUIR LA HIPERINSULINEMIA.**

Reyes Toso C.<sup>1</sup>; Linares L.<sup>2</sup>; Wallinger M.<sup>3</sup>; Planells F.<sup>4</sup>; Reyes Toso M.<sup>5</sup>; Ricci C.<sup>6</sup>  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,3,4,5,6</sup>

creyestoso@intramed.net

Las ratas que reciben fructosa en forma crónica desarrollan un cuadro de hipertensión arterial sistólica -PAS-, intolerancia a los carbohidratos, dislipidemia e hiperinsulinemia con resistencia insulínica, que guarda semejanzas con el síndrome metabólico que se presenta en el ser humano. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos involucrados se considera que el incremento en los niveles de insulina y radicales libres podrían estar vinculados con su producción. En este trabajo se estudiaron los efectos de la administración (20 semanas) por vía oral, de vitamina E -VE-



junto con AL (ambos con efecto anti-oxidante) sobre la -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 de c/unna), -C-VE+AL- ó F10%-VE+AL. Se controlaron: PAS, glucemias, prueba de tolerancia oral a la glucosa -PTOG-, insulina plasmática -In-, triglicéridos -TG, colesterol total -Cot- y 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 e In (P<0.001), el Cot (P<0.01), los TBARS en plasma y tejidos (P<0.001) y alteró la PTOG (P<0.001). La dieta con F10%+VE-AL previno el incremento de la PAS, TBARS, Cot (P>0.05 vs C y C-VC+AL), y disminuyó el aumento de los TG y de la glucemia durante la PTOG (ANOVA P<0.05 para ambas). La In no se modificó significativamente. Estos resultados muestran que la administración crónica de VE+AL previene el incremento de la PAS y de los niveles de lipoperoxidación (TBARS) que ocurren con una dieta con F10%, en forma más efectiva que el AL. Su mecanismo de acción parecería no depender de la disminución de la insulina plasmática sino que se podría deber en parte a su efecto antioxidante y a la disminución de los niveles de compuestos aldehídicos a nivel intracelular.

#### 111. (387) INFLUENCIA DEL NIVEL DE EXPOSICIÓN SOBRE EL PERFIL METABÓLICO DEL ARSÉNICO INORGÁNICO EN POBLACIONES CON DISTINTAS VARIANTES POLIMÓRFICAS DE LA ENZIMA ARSENITO METIL TRANSFERASA

Olmos V.<sup>1</sup>; Navoni J.<sup>2</sup>; Sassone A.<sup>3</sup>; Villaamil Lepori E.<sup>4</sup>  
Cátedra de Toxicología y Química Legal, FFyB, UBA<sup>1,2,3,4</sup>  
volmos@ffyb.uba.ar

El metabolismo del arsénico (As) inorgánico en humanos está influenciado por varios factores entre los que se encuentran el género, la edad y la presencia de variantes polimórficas de la enzima arsenito metil transferasa. El objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia del nivel de exposición sobre el perfil metabólico del As, en individuos expuestos crónicamente a través del agua de bebida. Para ello se realizó un estudio transversal en 195 personas habitantes de Chaco y Santiago del Estero. El estudio contó con la aprobación de un Comité de Ética y todos los participantes firmaron el consentimiento informado. Se obtuvieron muestras de orina y de células de descamación bucal de todos los participantes, y de agua de bebida de cada vivienda. El nivel de As en agua se midió por Generación de Hidruros-Espectrofotometría de Absorción Atómica (GH-EAA). El perfil metabólico [concentración urinaria del As inorgánico y los ácidos monometil arsónico (MMA) y dimetil arsínico (DMA)] se midió por HPLC-GH-EAA. La presencia del polimorfismo Met(287)Tre se investigó mediante PCR-RFLP. El análisis estadístico se realizó con el programa InfoStat. El rango de niveles de exposición fue muy amplio (de 13 a 1148 µg/l de As en agua). Se observó influencia del nivel de exposición sobre el perfil metabólico del As. El %MMA promedio (15,7) del grupo expuesto a 13 µg/l difirió significativamente (P=0,0001) del %MMA promedio (23,6) del grupo expuesto a 926 µg/l de As en agua. Esta influencia del nivel de exposición fue significativa (P=0,0155) en la población portadora de la variante silvestre del polimorfismo, mientras que en la población heterocigota fue no significativa (P=0,0518). Dado que un mayor %MMA es indicador de mayor susceptibilidad a sufrir los efectos deletéreos del As, estos resultados indicarían que, a exposiciones muy elevadas de As, ambas poblaciones serían igualmente susceptibles mientras que a bajos niveles de exposición la población silvestre es menos susceptible.

#### 112. (442) LÍPIDOS EN GLÁNDULA MAMARIA DE RATAS DEFICIENTES EN VITAMINA A

Vasquez Gomez M.<sup>1</sup>; Marra C.<sup>2</sup>; Giménez M.<sup>3</sup>;  
UNSL<sup>1</sup>; INIBIOLP CONICET<sup>2</sup>; UNSL, IMIBIO-SL, CONICET<sup>3</sup>  
gmvasque@unsl.edu.ar

En nuestro laboratorio observamos que la deficiencia de vitamina A altera el metabolismo de lípidos en hígado, corazón y aorta

asociado a alteraciones morfológicas. Previamente mostramos que la deficiencia de vitamina A provoca cambios morfológicos en glándula mamaria. (GM). No hay información sobre esta asociación en GM. Ratas hembras Wistar fueron separadas en grupos: C3, C6 AD3, AD6 R3 R6. Los grupos C se alimentaron con dieta suficiente en Vitamina A (VitA) por 3 y 6 meses. Los grupos AD recibieron dieta deficiente en vit A. los grupos R se realimentaron con vit A. Las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Las glándulas mamarias inguinales fueron separadas. Los lípidos fueron extraídos por el método de Folch y separados por TLC. Los ácidos grasos de fosfolípidos totales se separaron mediante HPLC. La expresión génica de citidilfosfolintransferasa (CT), reguladora de la síntesis de fosfatidilcolina, se determinó por RT-PCR. Se observó que el colesterol total aumento en ratas AD6 con respecto a AD3\*. El colesterol esterificado disminuyó en las ratas AD3 con respecto a C3\*\*. El colesterol libre aumento en los grupos C6, AD6 con respecto de los C3, AD3 respectivamente\*\*. Los fosfolípidos disminuyeron en grupo AD3 respecto del C3\*\*\*. Los ácidos grasos de los fosfolípidos totales (12:0,16:0,16:1n-7,18:0,18:2n-6,20:5n-3,22:5n-3,22:6n-3) del grupo de AD3 y AD6 disminuyeron respecto de C3 y C6 respectivamente. Los ácidos grasos: 18:1n-9,20:4n-6,22:4n-6,22:5n-6 de los fosfolípidos totales del grupo de AD3 y AD6 aumentaron respecto de C3 y C6\*\*. El mRNA de CT, de AD3 disminuyó respecto de C3\*\*\*\*. La deficiencia de vitamina A causa una alteración en el perfil lipídico de la glándula mamaria de rata virgen. Estos cambios en el contenido de colesterol, fosfolípidos y ácidos grasos provocarían alteraciones en la composición de las membranas de las células de la glándula mamaria de ratas vírgenes.\*p<0.05\*\*p<0.01\*\*\*p<0.001\*\*\*\*p<0.0001

#### 113. (517) ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS (AGI) N-9 Y N-3 DE DIFERENTES ORIGENES EN EL MANEJO NUTRICIONAL DE LA HIPERCOLESTEROLEMIA MODERADA (HCM)

Stranges A.<sup>1</sup>; Alsina E.<sup>2</sup>; Zago V.<sup>3</sup>; Gamba C.<sup>4</sup>; Gomez Echarren M.<sup>5</sup>; Ramos C.<sup>6</sup>; Scherier L.<sup>7</sup>; Friedman S.<sup>8</sup>; Macri E.<sup>9</sup>

Facultad de Odontología, UBA<sup>1</sup>; Cátedra de Bioquímica, Facultad de Odontología, UBA<sup>2,4,5,6,8,9</sup>; Lab Lípidos y Lipoproteínas-INFIBIOC, FFyB, UBA<sup>3,7</sup>  
andystranges@hotmail.com

Investigaciones previas demostraron el efecto hipolipemiente de AGPI, respecto a las grasas saturadas. Actualmente, se promocionan como saludables AGI de la familia n-9 presentes en numerosos productos alimentarios. Por otro lado, se sabe de los beneficios de los n-3 en ECV; sin embargo, se discute su efectividad cuando proceden de fuentes vegetales. Objetivo: estudiar en ratas con HCM, el efecto de dietas ricas en AGI n-9 y n-3 de diferentes orígenes sobre los lípidos séricos. Ratas Wistar macho(n=40, 21±2 días), al destete recibieron por 25 días dieta aterogénica(DA) con cantidades moderadas de colesterol (col) y grasa saturada (20%/p). A T25 se asignaron a uno de 5 grupos: CA(control aterogénico) continuó 25 días con dieta DA, n-3.P(pescado) y n-3.L(lino) recibieron aceites ricos en AGIn-3 más col y vitamina E(0,04%); mientras que los grupos n-9.GAO (girasol alto oleico refinado) y n-9.O(oliva virgen), recibieron aceites con n-9 más col. Durante la experiencia se registraron peso(g) y longitud(cm), consumo de alimento(kcal/100gpeso/día).Se midieron(mg/dL):T25 colesterol total(col-T), col.no-HDL. T50: col-T, TG, col-HDL, col-noHDL yTBARS(µmol/L).Resultados (media ± DE, ANOVA, SNK, Tamhane(p<0.05)). A T25, los animales desarrollaron HCM respecto a controles sanos (prueba t) col-T: 95±11y col-noHDL: 40±7 (p<0.001). A T50, no hubo diferencias significativas en consumo, peso o longitud. Los AGIn-3 produjeron el mejor perfil lipídico para TG(n-3.P 31±10 noDS n-3.L 39±6; n-3.P < n-9.O 44±9 noDS n-9.GAO 48±9 <CA 60±13(p<0.001)), Col-T (n-3.P 53±12 noDS n-3.L 67±18<n-9;O 101±27noDS n-9.GAO 103±19noDS CA 110±27(p<0.001) y Col-noHDL. n-9.GAO presentó mayor nivel de peroxidación lipídica (TBARS: n-3.P16,2±2,8 >CA10,1±1,8 noDS n-3.L12,2±1,6 noDS n-9.O12,5±1,6 ; todos < n-9.GAO 77,2±16,1(p<0.001). Por lo tanto, en el tratamiento de HCM de origen nutricional se obtienen mejores beneficios con el consumo de AGI de la familia n-3 ya sea de origen vegetal o animal. UBACYT 0008.

#### 114. (535) HÍGADO GRASO E INSULINORRESISTENCIA INDUCIDA POR ADMINISTRACIÓN DE DIETA RICA EN FRUCTOSA

Blaiotta C.<sup>1</sup>; Massa M.<sup>2</sup>; Castro M.<sup>3</sup>; Gagliardino J.<sup>4</sup>; Francini F.<sup>5</sup>

Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada 1 2 3 4 5  
carolina\_blaiotta@hotmail.com

Previamente demostramos que la administración de fructosa (DRF) durante tres semanas genera insulinorresistencia, tolerancia a la glucosa alterada e hígado graso. El objetivo de este proyecto fue determinar la secuencia cronológica de aparición de la insulinorresistencia y el hígado graso luego de administrar DRF. Metodología. Se emplearon ratas Wistar (180-200 g) divididas en grupos: a) control (C) con dieta comercial estándar más agua corriente de bebida y b) DRF, la misma dieta más fructosa 10% en el agua de bebida. A los 7, 14 y 21 días de tratamiento se midieron glucemias (G) (GOD-PAP), triglicéridemias (TG) (Kit comercial) e insulinemias (In) (RIA). En el hígado se determinó: a) contenido de TG y glucógeno y b) actividad de G6Pasa y Glucoquinasa (GQ). Resultados: (\*p<0.05 vs. C)

	C1	DRF1	C2	DRF2	C3	DRF3
In (ng/ml)	0,5±0,07	0,6±0,06	0,6±0,06	0,7±0,06	0,6±0,04	1,1±0,2*
G (mg/dl)	115±3	118±4	103±3	121±6	117±2	117±3
TG (mg/dl)	103±6	134±11*	112±15	172±15*	102±11	226±31*
GQ (mU/mg prot)	10±0,5	12±0,4*	9±0,8	16±1*	9±0,6	19±1*
G6Pasa (latencia%)	8±2	13±3	8±1	18±2*	7±1	15±1*
Glucógeno (µg/mg tej)	7,0±0,4	7,4±0,3	6,8±0,4	8,2±0,2*	8,4±0,3	10,8±0,4*
TG hepáticos (µg/100 mg tej)	304±13	470±59*	277±30	376±30	301±25	469±17*
Índice sensibilidad hepática a In (k/GPA x InPA)	203±37	169±16	181±26	150±13	158±10	108±15*

Conclusión: la administración de DRF induce asincrónicamente cambios metabólicos: a nivel hepático a la semana de tratamiento aumenta el depósito de TG, la actividad de la enzima GQ y G6Pasa (ciclo de sustrato). A nivel sanguíneo el aumento de los TG circulantes es el indicador más precoz de la DRF, mientras la hiperinsulinemia (reacción células B) recién aparece a las 3 semanas de tratamiento

#### 115. (549) EFECTO DIFERENCIAL DEL CONSUMO DE ÁCIDOS GRASOS MONOINSATURADOS SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO Y ÓSEO.

Alsina E.<sup>1</sup>; Martínez Reinoso J.<sup>2</sup>; Miksztołowicz V.<sup>3</sup>; Zago V.<sup>4</sup>; Suarez C.<sup>5</sup>; Ferreira Monteiro A.<sup>6</sup>; Scherier L.<sup>7</sup>; Friedman S.<sup>8</sup>; Macri E.<sup>9</sup>

Facultad de Odontología, UBA<sup>1</sup>; Cátedra de Bioquímica, Facultad de Odontología, UBA<sup>2 5 6 8 9</sup>; Lab Lípidos y Lipoproteínas-INFIBIO, FFyB, UBA<sup>3 4 7</sup>  
alsinaestefania@yahoo.com.ar

Los efectos beneficiosos encontrados en la dieta mediterránea (aceite de oliva=AO) llevaron a recomendar el consumo de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) para el tratamiento de la hipercolesterolemia (HC) nutricional. Actualmente, con el objeto de utilizar grasas saludables a menor costo, diferentes empresas alimentarias están sustituyendo, de manera creciente, grasas animales y aceites hidrogenados por aceites como el girasol alto oleico (AGAO). Objetivo: Estudiar en ratas con HC, el efecto de dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados (ω9) sobre los lípidos séricos y su relación con el contenido mineral óseo. Métodos: se utilizaron Ratas Wistar macho al destete, las cuales recibieron por 3 semanas (T3) una dieta aterogénica rica en grasa saturada (GS) y col, con el objeto de inducir HC nutricional. Luego por 5 semanas (T8), AGAO reemplazó GS por aceite de girasol alto oleico y AO reemplazó GS por aceite de oliva. Las dietas se administraron ad libitum durante las 8 semanas en las que se monitorearon zometría y consumo (kcal/100g peso corporal/día). A T3 se midió la colesterolemia total (col-t, mg/dL). A T8, se calculó el índice hepatosomático (IHS) y se determinaron: en suero (mg/dL) col, col- noHDL y TG y por DPX la densidad mineral ósea

(DMO, g/cm<sup>2</sup>) y el contenido mineral ósea (CMO, g). Resultados (media±DE.Anova.SNK): Los grupos no presentaron variaciones en el peso, longitud corporal, consumo e IHS. Sin embargo el col-t (AO 197,5±29,08 vs AGAO 245,67± 24,9) y el col- noHDL fueron menores en el grupo AO (AO 163,83 ±30,02 vs AGAO 213±28,66 (p<0.01). No se detectaron diferencias en CMO (AO 3,920±0,343 vs AGAO 4,175 ± 0,558) y DMO (AO 0,261±0,005 vs AGAO 0,255±0,005). Conclusión: Estos resultados sugieren que en manejo nutricional de HC los AGMI se comportan diferente. Los alimentos ricos en ω9 provenientes del AGAO no serían de elección. UBACyT 0008

#### 116. (551) CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NRF-2 EN TEJIDO ADIPOSITO DE RATAS OBRAS SPRAGUE DAWLEY

Santillán L.<sup>1</sup>; Carmona Y.<sup>2</sup>; Giménez M.<sup>3</sup>

IMIBIO, CONICET, UNSL<sup>1 2 3</sup>

lucassantillan2011@gmail.com

El Tejido Adiposo (TA) desempeña un papel principal en la homeostasis energética. El TA está diseminado en el organismo siendo un importante foco de investigación por el rol específico que la grasa juega en la patogenicidad de los desórdenes metabólicos como la obesidad. El estrés oxidativo (EO) ha sido implicado en la patogénesis de la obesidad. El objetivo de este trabajo fue investigar el metabolismo redox a través de la expresión de enzimas antioxidantes (SOD, GPx y CAT) y factor de transcripción NRF-2, en tejido adiposo perirenal (TAPR) en un modelo de ratas obesas. Se trabajó con un grupo control (C) de 7 ratas machos y 12 animales se dispusieron en jaulas individuales, alimentadas con dieta hipercalórica. Al final del experimento y de acuerdo a su peso el grupo de 12 animales se separó en 2 grupos: obesidad resistente (OR) y obesidad sensible (OS). El grupo C se alimentó con dieta control y los grupos OR y OS con dieta hipercalórica. Se les extrajo TAPR y se guardó a 80°C hasta su uso. Se extrajo RNA con el método de TRIzol y fue transcrito a cDNA. Alícuotas de 3 µl de cDNA fueron utilizados para amplificar por PCR. El gen de β actina se usó como control interno. Los productos fueron analizados en gel de agarosa al 2 % y cuantificados con el programa NIH Image J Software. La expresión de mRNA del gen GPx aumentó en el grupo OR respecto a los grupos OS y C. Los niveles de expresión del grupo OS fueron significativamente más bajos que el grupo C. La expresión de SOD en el grupo OS aumentó significativamente respecto al grupo C. No observamos diferencias en la expresión de mRNA de catalasa en los tres grupos estudiados. La expresión del NRF-2 estuvo aumentada significativamente en el grupo OR respecto al grupo OS. En el TAPR del grupo OR el aumento de la expresión de NRF-2 indujo una mayor protección de estos animales por parte de la GPx, lo que explicaría la resistencia a desarrollar obesidad en estos ratones.

#### 117. (621) PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES Y ÓXIDO NÍTRICO EN MITOCONDRIAS DE RATAS DIABÉTICAS. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON L- ARGININA.

Ortiz M.<sup>1</sup>; Lores-arnaiz S.<sup>2</sup>; Albertoni Borghese M.<sup>3</sup>; Balonga S.<sup>4</sup>; Filipuzzi A.<sup>5</sup>; Lavagna A.<sup>6</sup>; Cicerchia D.<sup>7</sup>; Majowicz M.<sup>8</sup>; Bustamante J.<sup>9</sup>

Cátedra de Biología Celular y Molecular, FFyB, UBA<sup>1 3 4 5 6 8</sup>; Cátedra de Físicoquímica, FFyB, UBA<sup>2 7 9</sup>

mortiz@ffy.uba.ar

Resultados previos en corteza cerebral de ratas diabéticas (D) mostraron una disfunción respiratoria asociada con despolimerización y descenso en la producción de óxido nítrico (NO). El objetivo de este trabajo fue evaluar la producción de radicales libres, la expresión de óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) y la nitración de proteínas (NP) en mitocondrias de corteza cerebral de ratas controles (C), tratadas con L-arginina (C+A), D y D tratadas con L-arg (D+A). La diabetes se indujo por inyección i.p. de estreptozotocina (70mg/kg). L-arg se administró por 4 días en el agua de bebida (620 mg/kg/día). Se determinó la producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), los niveles de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y de monoaminoxidasa (MAO). Los resultados se

expresaron como % respecto del control (C: 100%). Se analizó la expresión de nNOS y NP por Western Blot, expresando los resultados como la relación nNOS / tubulina y % respecto del C (C: 100%) respectivamente. En D aumentaron un 86% los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> vs C\*, siendo este efecto revertido parcialmente en D+A. La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disminuyó un 31% en D (0,22 ± 0,03 nmol/min.mg prot.) vs C (0,32 ± 0,03)\*, revirtiéndose dicho efecto en D+A. Los niveles de MAO disminuyeron un 54% en D (4,4 ± 0,1 nmol/min.mg prot.) vs C (9,6 ± 0,9)\*. Dicha disminución se revirtió en D+A. La expresión de nNOS disminuyó en D (0,67 ± 0,05) vs C (0,95 ± 0,09)\*, revirtiéndose dicho efecto en D+A. La NP disminuyó un 31% en D vs C\*\*, revirtiéndose dicho efecto en D+A. Para ninguna de las determinaciones hubo cambios en C+A. Estadística: ANOVA; \*p<0.05; \*\*p<0.01. Se concluye que en la diabetes a corto plazo existe un aumento de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La disminución en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría estar asociada a un descenso de la actividad de MAO. La expresión de la NOS asociada a la mitocondria así como la nitración de proteínas se encontraron disminuidas. El tratamiento con L-arg en los animales diabéticos revirtió dichos efectos.

### ENDOCRINOLOGÍA 1

118. (644) EFECTO DEL HIPOTIROIDISMO SOBRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES Y LA VIA DE SEÑALIZACIÓN DE PROLACTINA EN LA GLANDULA MAMARIA DE LA RATA LACTANDO.

Campo Verde Arbocco F.<sup>1</sup>; Navas P.<sup>2</sup>; Hapon M.<sup>3</sup>; Sanchez A.<sup>4</sup>; Jahn G.<sup>5</sup>

Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CCT<sup>1 2 3 4 5</sup>  
farbocco@mendoza-conicet.gob.ar

El hipotiroidismo (hipoT) genera alteraciones funcionales en la glándula mamaria con impacto directo en la lactancia, como disminución en la calidad de la leche, bloqueo parcial del reflejo de eyección inducido por succión y alteraciones en el metabolismo lipídico. Nos propusimos estudiar si estos efectos del hipoT están mediados por cambios en la expresión de receptores hormonales que regulan la función mamaria durante la lactancia y/o en la vía de señalización de prolactina (RPRL). Usamos ratas Wistar hembras hechas hipoT por administración de PTU (0,1 g/l) en el agua de bebida, sacrificadas en los días 2 y 14 de lactancia (L2 y L14, n=6-8). Se disecaron las glándulas mamarias inguinales para obtención de ARN y proteínas. Se midió por PCR en tiempo real el contenido de ARNm relativo al gen ribosomal S16, de los receptores de estrógeno  $\alpha$  y  $\beta$  (RE2 $\alpha$  y  $\beta$ ), de progesterona (RP4A+B y B), de hormonas tiroideas alfa y beta (RT $\alpha$  y  $\beta$ ) y de PRL (RPRL), y componentes de su vía de señalización, Stat5a, Stat5b, SOCS-1 y 3 y CIS y por Western Blot el contenido de RE2  $\alpha$ , RP4, TR $\alpha$  y  $\beta$  a nivel de proteínas. En L15 los niveles de ARNm de los TR, Stat5a y ER  $\alpha$  y  $\beta$  fueron más altos que en L2. El hipoT bloqueó los aumentos en los ER y Stat5a pero tendió a aumentar la expresión de los TR. No hubo cambios en los ARNm de RPRL y los otros componentes de su vía de señalización, mientras que el hipoT tendió a aumentar el RPB. A nivel de proteínas, el contenido de ER $\alpha$  y RPB fue significativamente mayor en L15 comparado con L2. El hipoT aumentó los niveles de PRB y de TR $\alpha$  en L15 y de TR $\beta$  en ambos días. Estos resultados sugieren que algunos de los efectos negativos del hipoT en tejido mamario lactante podrían estar mediados por bloqueos en la expresión de Stat5a y ERs, que estimulan la síntesis de leche y por el aumento en la expresión de PRB, factor inhibitorio. Además, el hipoT aparentemente induce la expresión de TR mucho más fuertemente a nivel de proteínas que de ARNm.

119. (542) ACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA Y PROAPOPTÓICA DE LA PROLACTINA EN LA ADENOhipófisis

Ferraris M.<sup>1</sup>; Zarate S.<sup>2</sup>; Jaita G.<sup>3</sup>; Magri M.<sup>4</sup>; Goffin V.<sup>5</sup>; Seilicovich A.<sup>6</sup>; Pisera D.<sup>7</sup>

IDIR, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; Facultad de Medicine Necker, Université Paris Descartes, Francia<sup>5</sup>  
mferraris@fmed.uba.ar

La prolactina (PRL) puede actuar de forma autocrina/paracrina sobre la adenohipófisis (ADH). Hemos demostrado que la inhibición de la señalización del receptor de PRL (PRLR) in vivo aumenta la tasa de proliferación celular en la ADH e incrementa el peso hipofisario, lo que sugiere un efecto antiproliferativo de la PRL. Con el objetivo de determinar la acción directa de la PRL a nivel hipofisario, estudiamos in vitro el efecto del antagonista del PRLR,  $\Delta 1$ -9-G129R-hPRL (A-PRLR) sobre la proliferación y apoptosis de células somatotropas GH3, que secretan constitutivamente PRL. La inhibición de la señalización de PRL indujo un incremento de la tasa de proliferación (incorporación de bromodeoxiuridina, BrdU, CTRL 7.5%, A-PRLR 12.0%, p<0.05, X2). La evaluación del ciclo celular por citometría de flujo (FACS) mostró un incremento en el porcentaje de células en la fase S (CTRL 26.2±5.2%, A-PRLR 41.1±4.9%, p<0.05, t de Student). Además, el A-PRLR disminuyó el porcentaje de células apoptóticas (TUNEL, CTRL 3.6%, A-PRLR 2.2%, p<0.05, X2; % de células hipodiploides, FACS, CTRL 32.8±1.8%, A-PRLR 27.3±19.6%, p<0.05 t de Student). Estos resultados sugieren que la PRL actúa como un factor autocrino/paracrina antiproliferativo y proapoptótico sobre la ADH. Para evaluar las acciones directas de la PRL in vivo, ratas ovariectomizadas fueron inyectadas con PRL ovina (oPRL, 1 mg/kg, 6 h, ip). La oPRL incrementó el porcentaje de células apoptóticas (células hipodiploides, FACS, CTRL, 10.0±1.5%, oPRL 21.9±5.2%, p<0.05, t de Student), y disminuyó el porcentaje de células BrdU positivas (FACS) y el porcentaje de células en la fase G2/M (CTRL 9.4±1.6%, oPRL 5.0±0.6% p<0.05, t de Student). Nuestras observaciones indican que la prolactina está involucrada en la renovación de células adenohipofisarias actuando como un factor antiproliferativo y proapoptótico. Alteraciones en este sistema de control fisiológico pueden conducir al desarrollo y progresión de tumores hipofisarios.

120. (48) INSULINA EN MITOCONDRIA: REGULACIÓN DE LA PIRUVATO DESHIDROGENASA

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

Nosotros demostramos que la enzima degradante de insulina (EDI) facilita el transporte de la insulina al mitoplasto y que la degradación de la insulina participa en la regulación del transporte. En este trabajo estudiamos una de las razones por las cuales la insulina es transportada al mitoplasto. Objetivos - Determinar si la insulina internalizada regula la piruvato deshidrogenasa (PDH). Métodos - EDI se obtuvo de músculo de rata por sucesivos pasos cromatográficos. Mitocondrias hepáticas fueron aisladas según Parson y recuperadas a 37°C, oxígeno 100%. De acuerdo al protocolo se colocó 14C1-pirúvico, EDI y/o insulina. La reacción se detuvo en frío con el agregado de hidróxido de hiamina y ácido sulfúrico 2 mM. El 14C02 liberado se leyó en un contador de centelleo líquido. Resultados - Previamente se estudiaron: concentración proteica, concentración de ácido pirúvico y tiempo de reacción en la determinación de PDH. En las condiciones seleccionadas se determinó que PDH inhibida por 250  $\mu$ M ATP era activada por EDI (1200 ng, p<0.05 y 1700 ng, p<0.002). EDI 544 y 1700 ng/tubo activaba PDH inhibida por ATP, pero este incremento era inhibido (6 ng/tubo, p<0.0005) o activado por la insulina (12 ng/tubo, p<0.002). El estudio de PDH en condiciones basales (sin inhibición por ATP) demostró que la insulina inhibe PDH con dosis de 1 y 2 ng/tubo (p<0.005) para luego volver a sus valores. Conclusión - La insulina regula PDH en mitoplastos a través de mediadores y directamente por su presencia. El mecanismo molecular de esta regulación debe estudiarse.

121. (131) DISMINUCION DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO VÍA ESTRÉS OXIDATIVO EN LA DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL

Rodríguez V.<sup>1</sup>; Peralta López M.<sup>2</sup>; Rivoira M.<sup>3</sup>; Tolosa De Talamoni N.<sup>4</sup>

Lab. Dr. Cañas, Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, FCM, UNC<sup>1 2 3 4</sup>  
valerod2003@yahoo.com.ar

La Diabetes mellitus (Dm) se asocia con alteraciones en la homeostasis del calcio. Sin embargo, los mecanismos moleculares desencadenados por la Dm en intestino y sus implicancias en la absorción de calcio no han sido dilucidados. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la Dm sobre la absorción intestinal de calcio y los mecanismos involucrados. Se utilizaron ratas Wistar machos adultas, las cuales se dividieron en controles y tratadas con estreptozotocina (60 mg/kg de peso). Se evaluó la absorción de Ca+2 por técnica del asa intestinal ligada in situ. El glutatión total, la actividad de fosfatasa alcalina (FA) y enzimas del sistema antioxidante se determinaron por espectrofotometría. La expresión de los genes involucrados en el transporte transcelular (Ca+2-ATPasa, intercambiador Na+/Ca+2, TRPV6 y calbindina D9K) y paracelular (claudina 2 y 12) del catión se determinó por RT-PCR. A los 5 días post-inducción se observó reducción en la absorción de calcio en las ratas diabéticas ( $0,57 \pm 0,07$  vs controles:  $1,40 \pm 0,10$  nmoles  $45\text{Ca}+2/\text{mL}$  plasma,  $p < 0,001$ ). La actividad de FA (presumiblemente involucrada en la entrada de Ca+2 al enterocito) disminuyó en las ratas diabéticas en comparación con la de las ratas controles. Dado que esta enzima es sensible a los cambios redox, es probable que la disminución de su actividad esté mediada por estrés oxidativo, a juzgar por la disminución en el contenido de glutatión intestinal y el incremento en la actividad de catalasa. La expresión de los genes de la vía transcelular no se modificaron pero la expresión del gen de claudina 2 se incrementó con la inducción diabética. En conclusión, la Dm experimental a corto plazo (5 días) inhibe la absorción intestinal de calcio con signos de estrés oxidativo. Es probable que la mayor expresión génica de claudina 2 sea un mecanismo compensatorio desencadenado por la disminución de la absorción intestinal de calcio.

#### 122. (124) PEPTIDO SIMILAR AL GLUCAGON TIPO 1 (GLP1) EN EL CONTROL CENTRAL DEL PESO CORPORAL.

Burgueño A.<sup>1</sup>; Carabelli J.<sup>2</sup>; Fernandez Gianotti T.<sup>3</sup>; Gonzales Mansilla N.<sup>4</sup>; Sookoian S.<sup>5</sup>; Pirola C.<sup>6</sup>  
*Dpto de Genética y Biol Mol de Enfermedades Compejas, Instituto de Investigaciones Médicas, IDIM, CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup> alburgueno@conicet.gov.ar*

Glp1 regula la glucemia y la ingesta de alimento. Nos propusimos estudiar si Glp1 y la leptina comparten la misma vía de regulación del balance energético. Ayunamos ratas wistar de 20 semanas por 72hs y les administramos en forma subcutánea leptina (Lep:10µg/rata), exenatide, un análogo estable de Glp1 (Exe:5µg/rata) o vehículo (V: PBS+BSA1%) cada 12hs (n=8/grupo). Las ratas tratadas con V presentaron una notoria disminución del peso corporal (PC:  $p < 0,005$ ), el peso del tejido adiposo visceral (PTA:  $p < 0,02$ ), la glucemia ( $p < 0,00001$ ) y la leptina plasmática ( $p < 0,0000004$ ) vs el control sin ayunar (C). Observamos que el ayuno provocó una disminución en el nivel de expresión diencefálica del receptor de Glp1 (Glp1r) ( $p < 0,0002$  vs C) y en la isoforma larga del receptor de leptina (ObRb) ( $p < 0,05$  vs C). Tanto la Lep como el Exe provocaron algunas respuestas similares (aunque de distinta magnitud) en los parámetros estudiados, como por ej: disminuyeron la presión arterial (PA: Lep:  $p < 0,02$  y Exe:  $p < 0,00005$  vs V), aumentaron la glucemia (Lep:  $p < 0,001$  y Exe:  $p < 0,000001$  vs V), aumentaron los niveles de expresión del gen de proopiomelanocortina (Pomc, precursor de  $\alpha$ -MSH) a nivel central (Lep:  $p < 0,01$  y Exe:  $p < 0,02$  vs V) y no tuvieron efecto sobre la expresión del gen ObRb. En cambio, solo la Lep produjo un aumento de la expresión de Glp1r a nivel central ( $p < 0,04$  vs V). Además la relación PTA/PC correlacionó negativamente con la expresión de Glp1r ( $R = -0,51$   $p < 0,008$ ) y de Trh ( $R = -0,53$   $p < 0,04$ ). De estos resultados puede inferirse que, sobre algunos de los parámetros estudiados, ambas hormonas producen un efecto similar pudiendo proponerse que estarían involucradas en la misma vía reguladora por lo que postulamos que los efectos de Glp1 a nivel central podrían deberse a la activación del sistema simpático por TRH.

#### 123. (120) VALIDACIÓN IN VIVO E IN SÍLICE DE UN MODELO MATEMÁTICO DE LA HOMEOSTASIS DEL SISTEMA GLUCOSA (G)-INSULINA (I).

Lombarte M.<sup>1</sup>; Acciarri O.<sup>2</sup>; Campetelli G.<sup>3</sup>; Aguirre M.<sup>4</sup>; Basualdo M.<sup>5</sup>; Rigalli A.<sup>6</sup>  
*Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>1 2 4 6</sup>; CIFASIS, CONICET<sup>3 5</sup> mercedes\_lombarte@yahoo.com.ar*

La diabetes mellitus afecta a millones de personas en el mundo. El desarrollo de tecnologías para su control ha conducido al planteo de modelos matemáticos. Estos modelos tienen un alto número de parámetros y se requieren metodologías complejas para su estimación. En trabajos anteriores hemos planteado un nuevo modelo simplificado del sistema G-I para la rata normal y una metodología de estimación y optimización de sus parámetros a partir de los valores plasmáticos de G e I luego de la ingesta de G. El objetivo de este trabajo fue su validación in silice e in vivo. Este modelo tiene dos ecuaciones diferenciales que representan las variaciones de G e I, expresadas en función de sus valores plasmáticos e incluye constantes asociadas al funcionamiento hepático (k4), absorción intestinal (ka y k0), y consumo tisular (k2 y k3) de G, así como desaparición plasmática (k6) y secreción (k1) de I. La validación del modelo consiste en perturbar el sistema y observar su respuesta. En este trabajo se modificaron las constantes k1 y k2. La validación in silice se realizó empleando la herramienta Simulink de MatLab observándose variaciones esperadas en las curvas de G e I en plasma. Para la validación in vivo se usaron 15 ratas Sprague-Dawley que se dividieron en tres grupos: 1- tratadas con NaF, (el NaF disminuye la secreción de I), 2- con entrenamiento físico diario, de manera de aumentar el consumo periférico de G y 3- controles. En todos los grupos se estimaron los parámetros del modelo, observando una disminución en el parámetro k1 ( $0,084 \pm 0,089$ ,  $p = 0,026$ ) en ratas tratadas con NaF y un aumento en el parámetro k2 ( $0,0233 \pm 0,02128$ ,  $p = 0,007$ ) en ratas que realizaron actividad física respecto de ratas controles en ambos casos ( $k1 = 0,6887 \pm 0,5212$ ,  $k2 = 0,0004 \pm 0,0007$ ), modificaciones que coinciden con lo esperado para las perturbaciones introducidas. Se concluye que el modelo matemático reproduce adecuadamente las perturbaciones introducidas al sistema.

## NEUROCIENCIAS 1

#### 124. (2) ANTICUERPOS SÉRICOS PROVENIENTES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO DISPARAN EL PROCESO APOPTÓTICOS EN CÉLULAS DE LA LINEA A-253: PARTICIPACION DE CASPASA-3 Y MMP-3

Reina S.<sup>1</sup>; Borda E.<sup>2</sup>  
*Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA<sup>1 2</sup> sreina@yahoo.com*

En el síndrome de Sjögren primario (SSp) se reportó un incremento del proceso apoptótico (PA) en las glándulas exócrinas asociando así su participación en la patogénesis del daño glandular en esta autoinmunidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar si los anticuerpos anti-mAChR del subtipo M3, contenidos en la fracción de IgG sérica de pacientes con SSp, son capaces de disparar el PA en una línea celular A-253. Estudiamos el PA, la participación de la caspasa-3 y de la metaloproteinas-3 (MMP-3) en el PA, a través de cultivo celular, de la transferencia terminal de deoxinucleótidos (TUNEL) e inmunoenzimáticos ensayos. Utilizamos una IgG antipéptido M3 (IgG-M3), purificada utilizando un péptido sintético correspondiente al 2do dominio extracelular del mAChR M3 humano. Los resultados demuestran que los IgG-M3 inducen el PA de las células A-253 de manera concentración y tiempo dependiente [IgG-M3:90%,  $1 \times 10^{-8}$ M, 24h; Pilocarpina:85%,  $1 \times 10^{-7}$ M, 24h; IgG normal:18%; basal:12%, n=8]. Este incremento se acompañó por un incremento en la generación de inosítoles fosfato (InsP) [InsP: IgG-M3:226% $\pm$ 14; Pilocarpina:206% $\pm$ 16, n=6]. Ambos procesos fueron inhibidos por la atropina (bloqueante de los mAChR), como por el péptido sintético M3, respectivamente. El PA mostró un incremento en la actividad de la caspasa-3 [IgG-M3:7.91 $\pm$ 06;Pilocarpina:8.81 $\pm$ 07], y de la MMP-3 [IgG-M3:600 $\pm$ 50; Pilocarpina:520 $\pm$ 45;IgG normal:65 $\pm$ 5.8;basal:60 $\pm$ 5.1, n=6], y este

incremento fue bloqueado por el J104794 (inhibidor del mAChR subtipo M3). El mecanismo intracelular responsable de los efectos biológicos de la IgG-M3 involucra a la fosfolipasa C, la calcio-calmodulina, y el calcio extra- e intra-celular, ya que el mismo fue inhibido por U-73122, W-7, verapamil, BAPTA y BAPTA-AM, respectivamente. En conclusión, la IgG-M3 sérica purificada de pacientes con SSp media el PA de las células A-253 contribuyendo así a la destrucción y/o atrofia de las glándulas salivales en el SSp con la consiguiente xerostomía.

**125. (8) RITMO SUEÑO – VIGILIA DE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO DURANTE UNA MISIÓN SIMULADA AL PLANETA MARTE**

Vigo D.<sup>1</sup>; Ogrinz B.<sup>2</sup>; Wan L.<sup>3</sup>; Bersenev E.<sup>4</sup>; Tuerlinckx F.<sup>5</sup>; Van Den Bergh O.<sup>6</sup>; Aubert A.<sup>7</sup>

*Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, Department of Psychology, University of Leuven, CONICET<sup>1</sup>; Department of Psychology, University of Leuven<sup>2,3,5,6</sup>; State Science Center of Russian Federation, Institute of Biomedical Problems of Russian Academia of Science<sup>4</sup>; Laboratory of Experimental Cardiology and Interdisciplinary Centre for Space Studies, University of Leuven<sup>7</sup>*  
dvigo1973@gmail.com

Introducción: la permanencia prolongada en el espacio se asocia a la exposición a condiciones de microgravedad y confinamiento, que determinan modificaciones en la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA). Objetivo: analizar si el confinamiento por sí mismo altera el ritmo sueño – vigilia de la actividad autonómica cardíaca, en el contexto del estudio piloto del proyecto Mars500 (Agencia Espacial Europea – Instituto de Problemas Biomédicos de Moscú). Diseño del Estudio: se obtuvieron registros ECG de 24 hs antes, durante (30, 70 y 100 días) y después de 105 días de confinamiento en los seis miembros de la tripulación que participaron de la misión. Se obtuvieron los intervalos RR del ECG para evaluar la actividad del SNA mediante análisis de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) durante la vigilia y el sueño. Los periodos de sueño-vigilia fueron determinados ajustando una onda cuadrada a los datos. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante un análisis ANOVA de medidas repetidas. Resultados: durante el confinamiento, se observó en los periodos de vigilia una menor frecuencia cardíaca media y un aumento de los componentes de VFC de muy baja, baja y alta frecuencia, con una disminución relativa del componente de baja frecuencia. La VFC durante los periodos de sueño permaneció constante, disminuyendo las diferencias de VFC entre el sueño y la vigilia. Conclusiones: los cambios en la VFC observados durante el confinamiento reflejan un aumento de la actividad parasimpática en la vigilia. Diversos factores pueden dar cuenta de esta observación incluyendo una exposición reducida a condiciones de luz natural o cambios en el estado de ánimo asociados al aislamiento. A su vez, la pérdida del predominio simpático durante la vigilia puede ser importante en diversos procesos centrales relacionados con el rendimiento.

**126. (60) PROGESTERONA (PROG) AUMENTA LA EXPRESIÓN DE GENES DE PROTEINAS DE MIELINA Y ATENÚA LA INFLAMACION DE LA MEDULA ESPINAL EN UN MODELO DE ESCLEROSIS MULTIPLE (EM)**

Garay L.<sup>1</sup>; González Deniselle M.<sup>2</sup>; Lima A.<sup>3</sup>; Roig P.<sup>4</sup>; De Nicola A.<sup>5</sup>

*IBYME, Dto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,5</sup>; IBYME<sup>3,4</sup>*  
laurainesgaray@gmail.com

La Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE) constituye un modelo animal de EM. Ambas enfermedades presentan desmielinización, inflamación y degeneración del Sistema Nervioso Central. Anteriormente demostramos que el pretratamiento con PROG, mejora el grado clínico y disminuye la pérdida de la proteína básica de mielina (MBP) y proteína proteolipídica (PLP) en la médula espinal de ratones EAE. En este trabajo investi-

gamos si estos efectos beneficiosos involucran mecanismos transcripcionales a nivel de la mielina y de la inflamación local. Se analizaron 3 grupos experimentales: control (CTRL), EAE sin tratamiento (EAE) y EAE implantados con un pellet de 100 mg de PROG 7 días antes de la inducción de la enfermedad (EAE+PROG). A nivel de la médula espinal se estudió mediante PCR en tiempo real la acción hormonal sobre: 1) la mielina, analizando la expresión del ARNm de MBP, PLP y de los factores de transcripción NKx2.2 y Olig1; 2) marcadores proinflamatorios, midiendo el ARNm de CD11b (reactividad microglial) y de TNF $\alpha$ . Los resultados (veces de aumento respecto a control) demostraron que el tratamiento con PROG reestableció en parte la disminución del ARNm de MBP observada en los animales EAE respecto a los controles (CTRL 1 $\pm$ 0.02, EAE: 0.49 $\pm$ 0.06 vs. EAE+PROG:0.73 $\pm$ 0.09;p<0.05).El ARNm de PLP mostró una tendencia similar. Más aún, la disminución del ARNm de NKx2.2 y Olig1 observada en los ratones EAE fue contrarrestada por el tratamiento con PROG (EAE: 0.6 $\pm$ 0.1 vs. EAE+PROG: 1.1 $\pm$ 0.2, p<0.05, EAE: 0.28 $\pm$ 0.02 vs. EAE+PROG:0.4 $\pm$ 0.1,p<0.05, respectivamente). Por otro lado, los ARNm de CD11b y TNF $\alpha$  aumentaron 4.5 $\pm$ 0.8 y 29 $\pm$ 5.7 veces en EAE vs control, y descendieron con PROG a 2.2 $\pm$ 0.1 y 9.9 $\pm$ 3.1 respectivamente. Estos resultados demuestran que los beneficios clínicos inducidos por el tratamiento con PROG en los animales EAE, se acompañan de un aumento en la expresión de genes que favorecen la mielinización a la vez que disminuye la expresión de marcadores proinflamatorios.

**127. (65) LA PROGESTERONA INHIBE LA GLIOSIS REACTIVA Y ESTIMULA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS OLIGODENDROCITOS LUEGO DE UNA INJURIA DE LA MÉDULA ESPINAL**

Labombarda F.<sup>1</sup>; Gonzalez S.<sup>2</sup>; Lima A.<sup>3</sup>; Roig P.<sup>4</sup>; De Nicola A.<sup>5</sup>

*IBYME, Dto de Bioquímica Humana, Fac Med, UBA<sup>1,2,5</sup>; IBYME<sup>3,4</sup>*  
florlabombarda@gmail.com

La lesión medular (SCI) produce astrogliosis, activación de la microglía, demielinización y proliferación de precursores de oligodendrocitos (OPC). Previamente, hemos descrito que la progesterona (PG) estimula la proliferación de OPC y los diferencia a células maduras. En este trabajo estudiamos el efecto de la PG sobre las otras poblaciones gliales (astrocitos y microglía) a fin de dilucidar si el efecto remielinizante del esteroide involucra la modulación de la gliosis reactiva. Ratas macho con transección completa de la médula espinal recibieron tratamiento agudo (3d) o crónico (21d) con PG (16mg/kg). Para estudiar la proliferación y la diferenciación de las células gliales las ratas recibieron BrdU (50mg/kg) 48 y 72 hs post injuria y fueron sacrificadas 3d o 21d post-SCI. Los estudios de doble inmunofluorescencia y microscopía confocal mostraron un aumento en la proliferación de astrocitos s100+, Ox-42+ (microglía) y células NG2+ (OPC), y una activación de astrocitos GFAP+ después de 3 días de SCI (p<0.001 CTL vs SCI, ANOVA). Veintidós días después de la SCI los astrocitos maduraron a células GFAP+ y disminuyó el número de oligodendrocitos maduros (CC1+) (p<0.001 CTL vs SCI, ANOVA). El tratamiento agudo con PG inhibió la proliferación de astrocitos y microglía, mientras que el crónico inhibió la activación de los mismos (p<0.01 SCI vs SCI+PG. ANOVA). La PG estimuló la proliferación de los OPC luego de 3d pero las células BrdU+/NG2+ decrecieron luego de 21 d (p<0.05 SCI vs SCI+PG. ANOVA) El aumento de la densidad de células BrdU+/CC1+ luego de 21d de tratamiento con PG sugiere la diferenciación de los OPC a oligodendrocitos maduros. En conclusión, los efectos de la PG luego de SCI involucran: a) la inhibición de la astrogénesis y la activación astrocitaria; b) efectos antiinflamatorios por la inhibición de la proliferación y activación de la microglía; c) proliferación de OPC y la diferenciación de los mismos contribuyendo al proceso de remielinización.

**128. (87) RATONES CNP::EGFP ADULTOS: UN MODELO APROPIADO PARA DESMIELINIZACIÓN CRÓNICA**

Millet V.<sup>1</sup>; Marder M.<sup>2</sup>; Pasquini L.<sup>3</sup>

*Cátedra de Química biológica Patológica, FFyB, UBA, IQUIFIB, CONICET<sup>1,3</sup>; IQUIFIB, CONICET<sup>2</sup> violemillett@gmail.com*

Ratones transgénicos CNP::EGFP expresan la proteína verde fluorescente(EGFP) bajo el promotor de 2-3-cyclic nucleotide 3-phosphodiesterase(CNPasa) en oligodendrocitos(OLG) y células de Schwann, resultando una herramienta muy utilizada en el estudio de estas células. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos animales no han sido nunca confrontados con aquellos obtenidos en un animal wild type(WT). El agregado de cuprizona(CPZ) en la dieta produce una desmielinización masiva en distintas áreas del cerebro, siendo su extensión dependiente de la cepa y la edad del ratón utilizado. Nuestro objetivo fue evaluar la vulnerabilidad de animales WT y CNP::EGFP adultos a la desmielinización por CPZ. CNP::EGFP fueron más susceptibles a esta desmielinización, evaluada por la disminuida expresión de MBP, y el reclutamiento aumentado de OLG progenitores, astrocitos y microglia. Esta vulnerabilidad incrementada se debe a la presencia de una desmielinización basal en estos animales. CNP::EGFP mostraron una disminución del grosor del cuerpo calloso, en la inmunoreactividad a MBP y CNPasa, en el número de axones mielinizados, las vueltas de la mielina y el G-radio. Estos ratones transgénicos mostraron una distribución axonal más dispersa en la corteza, evaluada por co-tinción con NF200 y MBP así como una disminución en el número de células NeuN+ en la región hipocámpal CA3. CNP::EGFP presentaron una incrementada activación microglial y astrogial, un aumento en la peroxidación lipídica y en el reclutamiento de OLG progenitores de morfología atípica. CNP::EGFP muestran una disminución en la locomoción, la actividad exploratoria y un déficit motriz. Teniendo en cuenta nuestros resultados, los CNP::EGFP adultos podrían considerarse un modelo de desmielinización crónica siendo una herramienta útil para evaluar terapias futuras para enfermedades desmielinizantes, como la Esclerosis Múltiple, dado estas patologías presentan una desmielinización crónica con degeneración axonal.

**129. (556) FURTHER EVIDENCE OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE IN THE 6-HYDROXYDOPAMINE-INDUCED HEMIPARKINSONIAN MICE**

Aguiar Jr A.<sup>1</sup>; Prediger R.<sup>2</sup>; Latini A.<sup>3</sup>  
*Universidade Federal de Santa Catarina<sup>1,2,3</sup>  
aderbalaguia@gmail.com*

**Introduction.** Parkinson's disease is a prevalent progressive neurodegeneration of the basal ganglia. **Hypothesis.** Our hypothesis is that exercise might also afford neuroprotection against dopaminergic neuronal death and motor dysfunction in experimental Parkinsonism models. **Objectives.** The main objective is investigating the potential of physical exercise as a modifying-disease agent of Parkinsonism. **Experimental design.** Mice were exercised during six weeks on a treadmill before the striatal lesion, and the evolution of hemiparkinsonism were followed for four weeks. **Methods.** Male C57BL/6 mice (8 weeks, 25-30 g) were assigned to two groups: untrained and runners, using a blood-lactate-controlled exercise during 6 weeks. After it, we injected 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 4 µg) or vehicle in the right midstriatum (AP 0.4, ML 1.8, DV 3.5). Rota-rod performance, cylinder task and apomorphine-induced rotations (0.6 mg/kg, s.c.) were weekly assessed during 4 weeks following stereotaxic surgery, when animals were perfused to immunohistochemistry analysis. **Results.** In the cylinder task, 6-OHDA induced an asymmetry forepaw use with significant different degrees (F2,16=11.9, P<0.05) in sedentary (60-80%) and exercised animals (20-40%). Rota-rod performance demonstrated a significant poor performance of 6-OHDA-lesioned mice than vehicle-treated animals, while exercise ameliorated these motor impairments (F3,96=47.1, P<0.05). Apomorphine challenge of 6-OHDA-lesioned animals showed a significant progressive contralateral rotation levels in sedentary animals, which was not observed in the trained mice (F2,124=3.5, P<0.05). Exercise also prevented the 6-OHDA-induced decreased of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the striatum (F1,26=3.7, P<0.05) and substan-

tia nigra pars compacta (F1,44=30.2, P<0.05) of 6-OHDA-treated animals. **Conclusion.** Our evidences are coherent with this statement due to modifying-disease effects induced by exercise in 6-OHDA-treated hemiparkinsonian mice.

**130. (273) NEUROPROTECCIÓN DEL DAÑO GLAUCOMATOSO EN RATAS POR LA INDUCCIÓN DE TOLERANCIA ISQUÉMICA**

Belforte N.<sup>1</sup>; Sande P.<sup>2</sup>; De Zavalía N.<sup>3</sup>; Fernandez D.<sup>4</sup>; Silberman D.<sup>5</sup>; Chianelli M.<sup>6</sup>; Rosenstein R.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Dto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFYBO, CONICET<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>  
nicolasbelforte@hotmail.com*

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa que involucra diversos mecanismos patogénicos como el daño por isquemia/reperfusión. Se ha demostrado que el pre y post-condicionamiento protegen a la retina frente al daño isquémico agudo. El objetivo de este trabajo fue examinar el efecto de una aplicación semanal de pulsos de isquemia retiniana en un modelo experimental de glaucoma en ratas inducido por inyecciones de condroitín sulfato (CS). Se inyectó CS(40%) o vehículo bilateralmente en la cámara anterior del ojo de ratas Wistar macho adultas durante 10 semanas. La isquemia retiniana fue inducida por aumento de la presión intraocular (PIO) a 120 mmHg por 5 min una vez por semana, comenzando luego de la 6ta inyección intracameral. A las 10 semanas de tratamiento se evaluó: la PIO, la función retiniana (electrorretinograma, (ERG)) y de la vía visual (potenciales visuales evocados (VEPs)), la histología de la retina y nervio óptico (NO) y la peroxidación lipídica (determinación de malonildialdehído). Los pulsos breves de isquemia no afectaron el aumento de la PIO inducido por CS. En ojos inyectados con CS se observó una disminución significativa (p<0.01) en la amplitud de las ondas a y b del ERG y los VEPs (p<0.01). La aplicación de pulsos de isquemia revirtió estas alteraciones funcionales. Las inyecciones de CS indujeron una disminución significativa (p<0.01) en el número de células positivas para dos marcadores específicos de células ganglionares (NeuN y Thy-1), en el número de axones del NO (p<0.01) y el número de células apoptóticas (p<0.05). La aplicación de pulsos de isquemia preservó la estructura de la retina y el NO. La peroxidación lipídica aumentó significativamente (p<0.01) en ojos inyectados con CS, en tanto que los pulsos de isquemia disminuyeron este parámetro. Estos resultados indican que la inducción de tolerancia isquémica podría constituir una avenida fértil para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento del glaucoma.

**131. (175) CUERPO CALLOSO EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA DEL PLANO SAGITAL MEDIO: VARIACIONES DE ZONAS DE SU SUPERFICIE CON LA EDAD EN AMBOS SEXOS (PARTE 1)**

Merlo A.<sup>1</sup>; Gómez E.<sup>2</sup>; Miño J.<sup>3</sup>; Albanese A.<sup>4</sup>; Albanese E.<sup>5</sup>  
*Facultad de Medicina, USAL<sup>1,2,3,4,5</sup>  
amerlo@salvador.edu.ar*

En SAIC 2003 mostramos en un grupo femenino disminución con la edad de superficies de la imagen sagital media del cuerpo calloso (CC). **OBJETIVO:** determinar las medidas de superficie de zonas de la imagen del CC en el plano sagital medio de ambos sexos en dos rangos de edad. **MATERIAL Y MÉTODO.** En imágenes digitalizadas del plano sagital medio de resonancias magnéticas de 48 sujetos femeninos y 48 masculinos, diestros, sin diagnóstico de enfermedades neurológicas ni psiquiátricas, se limitaron tres zonas del CC cada una contenida en sectores circulares de ángulos adyacentes de 60 grados. Por el programa Scion Image for Windows se midieron las superficies en cm2 de la zona anterior que contiene al genu, la media relacionada con el cuerpo y la posterior que contiene al esplenio. Se calculó la media ± ES de los valores por sexo y rango de edad (41-60 y 61-84 años). Para el estudio estadístico se utilizó el análisis de varianza. **RESULTADOS.** Los valores de superficies (media ± ES en cm2) en los rangos de 41-60 y 61-84 años en la zona anterior

del grupo femenino son  $2.55 \pm 0.07$  y  $2.20 \pm 0.04$  y del masculino  $2.54 \pm 0.06$  y  $2.19 \pm 0.06$ , en la zona media del grupo femenino  $1.16 \pm 0.03$  y  $1.07 \pm 0.02$  y del masculino  $1.18 \pm 0.05$  y  $1.01 \pm 0.03$  y en la zona posterior del grupo femenino  $2.42 \pm 0.04$  y  $2.35 \pm 0.03$  y del masculino  $2.38 \pm 0.06$  y  $2.25 \pm 0.05$ . Las diferencias entre rangos de edad, no entre sexos, son estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ , ANOVA). **CONCLUSIÓN.** Las superficies de zonas del CC en el plano sagital medio de resonancia magnética que constituyen la totalidad de la imagen sagital media del CC no difieren significativamente entre sexos. En ambos sexos disminuyen a partir de los 61 años.

## ONCOLOGÍA 2

### 132. (220) SEGURIDAD Y TOLERABILIDAD DE LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA (QTM), COMBINANDO CICLOFOSFAMIDA (CY) Y CELECOXIB (CEL), EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA AVANZADO (PCMA) 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>; Scharov y O.<sup>7</sup>

*Instituto de Genética Experimental, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>1 2 4 6 7</sup>; Instituto de Oncología y Especialidades Médicas<sup>3</sup>; Laboratorio Cibic<sup>5</sup> graciaela.scharovsky@gmail.com*

La quimioterapia metronómica (QTM) consiste en la administración crónica, a intervalos regulares, de drogas quimioterapéuticas en dosis menores a la dosis máxima tolerada, sin periodos de descanso prolongados. El efecto terapéutico se logra por inhibición de la angiogénesis tumoral presentando escasos efectos secundarios. El objetivo fue evaluar la seguridad, toxicidad y tolerabilidad de la QTM con Cy + Cel para el tratamiento de PCMA (Ensayo clínico Fase I/II en curso, aprobado por Comité de Bioética y A.N.M.A.T.) durante su primera etapa. El plan de tratamiento consistió en 50mg Cy + 400mg Cel/día vía oral. Los eventos adversos fueron registrados y clasificados según los criterios CTCAE (Common Terminology Criteria for Adverse Events) y seguidos hasta su resolución. La calidad de vida se evaluó con cuestionario FACT-B (Functional Assessment of Cancer Therapy Breast) y escala ECOG. El tiempo de permanencia de las pacientes (N=13) varió de 4 a 64 semanas (Mediana=13). La toxicidad asociada al tratamiento fue muy baja: Hematológica (2/13, Grado I y II, que revirtieron con reducción transitoria de la dosis de Cy), Gástrica (4/13, Grado I) que revirtieron con la administración de un gastroprotector. No se observó toxicidad renal, hepática o cardíaca asociada a la terapia. La calidad de vida evaluada con la escala ECOG presentó un score aumentado en 3/10 (30%), no mostró modificaciones en 2/10 (20%) y una mejora en 5/10 (50%) pacientes. Los resultados del cuestionario FACT-B no mostraron diferencias significativas al analizar las diferentes variables. Se observó enfermedad estable (EE) en 9/13 pacientes cuya duración fue de 12 a 64 semanas (Mediana=18) y respuesta parcial (RP) en 1/13. El tratamiento mostró baja toxicidad, excelente tolerabilidad y se acompañó de actividad antitumoral en PCMA, incluso en aquellas pacientes resistentes a Cy, en la dosis máxima tolerada, en líneas previas. La calidad de vida no se modifica o mejora en un alto porcentaje de pacientes.

### 133. (309) E2F1/BRCA1 REGULAN LA TRANSCRIPCIÓN DE ATM EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Moiola C.<sup>1</sup>; De Luca P.<sup>2</sup>; Meiss R.<sup>3</sup>; Vazquez E.<sup>4</sup>; De Siervi A.<sup>5</sup> *Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Dto de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 4 5</sup>; Academia Nacional de Medicina<sup>3</sup> cmoiola@qb.fcen.uba.ar*

Los defectos en el mantenimiento de la integridad genómica y su reparación favorecen la progresión tumoral. Se ha demostrado que mutaciones en el gen de ATM (ataxia telangiectasia mutada), una quinasa que participa en la reparación del ADN y el control del ciclo celular en respuesta al daño doble cadena en el ADN, contribuyen a un aumento en la inestabilidad genómica. Además,

polimorfismos en ATM son considerados como factor de riesgo para desarrollar cáncer de próstata (PCa), viéndose incrementado aún más en individuos portadores de mutaciones del supresor tumoral BRCA1. Nuestro objetivo es comprender los mecanismos moleculares que conducen a estos desbalances y favorecen la progresión de la enfermedad. Para ello nos focalizamos en el estudio de la regulación transcripcional de ATM en líneas celulares de PCa. Mediante RT-qPCR y ensayos con genes reporteros determinamos que las proteínas BRCA1 y E2F1 co-regulan la expresión de ATM. Además, identificamos sitios putativos de unión para E2F1 en la secuencia promotora de ATM y verificamos por ChIP que BRCA1 se asocia en la región cercana al sitio de inicio de la transcripción (-0,5 Kb). Considerando que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos inducen daño en el ADN y teniendo en cuenta el rol de ATM en la respuesta al estrés genotóxico, evaluamos el efecto de distintos agentes sobre la expresión de ATM. Determinamos que la Doxorubicina (1uM) y su análogo, la Mitoxantrona (1uM), disminuyeron la actividad del promotor de ATM ( $p < 0,05$ ), mientras que el Etopósido (5uM) y el Metotrexato (200uM) no produjeron cambios significativos. Más aún, este efecto se ve incrementado en células PC3 que sobre-expresan BRCA1. Finalmente, mediante inmunohistoquímica y RT-qPCR, encontramos que la expresión de ATM en los tumores generados como xenotransplantes en ratones nude inculados con células PC3 que tienen silenciada la expresión de BRCA1, fue significativamente menor cuando se los comparó con el control.

### 134. (498) ESTUDIO EXPERIMENTAL DE TERAPIA POR CAPTURA NEUTRÓNICA EN BORO (BNCT) PARA EL TRATAMIENTO DE METÁSTASIS HEPÁTICAS

Trivillin V.<sup>1</sup>; Pozzi E.<sup>2</sup>; Buitrago Montañez N.<sup>3</sup>; Cardoso J.<sup>4</sup>; Colombo L.<sup>5</sup>; Thorp S.<sup>6</sup>; Molinari A.<sup>7</sup>; Garabalino M.<sup>8</sup>; Heber E.<sup>9</sup>; Monti Hughes A.<sup>10</sup>; Miller M.<sup>11</sup>; Itoiz M.<sup>12</sup>; Aromando R.<sup>13</sup>; Nigg D.<sup>14</sup>; Quintana J.<sup>15</sup>; Schwint A.<sup>16</sup> *Comisión Nacional de Energía Atómica<sup>1 2 3 6 7 8 9 10 11 15 16</sup>; Instituto de Oncología Dr. Angel H. Roffo<sup>4 5</sup>; Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Odontología, UBA<sup>12 13</sup>; Idaho National Laboratory, Idaho Falls, Idaho, EE.UU<sup>14</sup> trivilli@cnea.gov.ar*

Se propuso BNCT como potencial tratamiento de metástasis hepáticas de cáncer de colon, múltiples, bilobares, irresecables, resistentes a quimioterapia. El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia terapéutica y la potencial toxicidad de BNCT para el tratamiento de metástasis hepáticas en un modelo experimental en rata con 3 dosis de irradiación en el reactor nuclear RA-3. Los cálculos dosimétricos se basaron en estudios de biodistribución con borofenilalanina (BPA). Los animales con tumor se dividieron en los siguientes grupos, BPA-BNCT (A, B y C): BNCT mediado por BPA, Haz Solo: sin BPA, expuesto al mismo rango de fluencia de neutrones térmicos que los grupos BPA-BNCT, Sham: control sin irradiación. La dosis física total a tumor con BPA-BNCT fue: (A)  $9 \pm 1$  Gy (B)  $13 \pm 3$  Gy o (C)  $17 \pm 3$  Gy. El hígado normal recibió de 6-10 Gy. La superficie de los nódulos tumorales se midió pre-irradiación. Los animales se sacrificaron a las 3 semanas. Se evaluó la superficie y peso tumoral post-tratamiento y se calculó la relación superficie Post/pre-tratamiento (Tabla).

Tratamiento	Superficie Post/Pre-Tratamiento	Peso Tumoral o Post-Tratamiento(mg)
Sham	$5 \pm 3$	$346 \pm 302$
Haz Solo	$3 \pm 2$	$140 \pm 106$
BPA-BNCT (A)	$1.2 \pm 1.0$	$24 \pm 24$
BPA-BNCT (B)	$0.5 \pm 0.2$	$19 \pm 16$
BPA-BNCT (C)	$0.4 \pm 0.1$	$5 \pm 2$
Peso tumoral pre-tratamiento (grupo adicional)		$56 \pm 39$

En el grupo BPA-BNCT (C) se observó toxicidad en piel e intestino que afectó la recuperación post-tratamiento de los animales. Sin embargo no se observó toxicidad en hígado normal (ni a nivel macroscópico ni histológico) en ninguno de los grupos evaluados. La dosis de  $13 \pm 3$  Gy en tumor optimizaría la relación

entre beneficio terapéutico y toxicidad. La diferencia entre el grupo BPA-BNCT (B) y los grupos Haz Solo y Sham fue estadísticamente significativa (ANOVA  $p \leq 0.001$ ) para ambos parámetros evaluados. El BPA-BNCT induce una remisión parcial significativa del nódulo tumoral experimental a las 3 semanas post-irradiación sin toxicidad en hígado normal.

**135. (59) LA COMBINACIÓN DE INMUNOTERAPIA GENÉTICA Y GEN SUICIDA PROLONGA EL TIEMPO LIBRE DE ENFERMEDAD Y LA SOBREVIDA GLOBAL EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO.**

Villaverde M.<sup>1</sup>; Combe K.<sup>2</sup>; Wei M.<sup>3</sup>; Glikin G.<sup>4</sup>; Finocchiaro L.<sup>5</sup>  
*Instituto de Oncología Angel H Roffo*<sup>1,4,5</sup>; *Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Paris, France*<sup>2,3</sup>  
 marcelavillaverde@hotmail.com

A pesar de los múltiples tratamientos propuestos para el melanoma, su pronóstico permanece incierto, demandando la implementación de estrategias combinadas que aumenten la baja efectividad de los tratamientos individuales. Nuestro laboratorio desarrolla con éxito desde hace más de 10 años los primeros protocolos clínicos veterinarios latinoamericanos de terapia génica contra el melanoma canino. El objetivo del presente trabajo fue validar un protocolo (adyuvante de cirugía) que combina la efectividad del gen suicida con genes que inmuno estimulan de manera específica la respuesta contra el melanoma en un modelo murino. Brevemente, en ratones C57Bl6/J se inyectaron intradermicamente  $3 \times 10^6$  células de B16F-10. Cuando el volumen tumoral alcanzó los 250 mm<sup>3</sup> (medido diariamente con calibre) fueron tratados 3 veces por semana intratumoralmente con lipoplexes conteniendo el gen control ( $\beta$ gal) o el gen suicida (HSVtk) y la prodroga (GCV), solos o en combinación con la vacuna subcutánea compuesta de un extracto celular de melanoma B16F-10 y lipoplexes conteniendo los genes hIL-2 y mGM-CSF (vax). Todos los tumores fueron resecaados quirúrgicamente cuando alcanzaron un volumen de 1500 mm<sup>3</sup>. Durante la cirugía, los márgenes peritumorales fueron inyectados con  $\beta$ gal o HSVtk y GCV. Las condiciones iniciales de tratamiento se restablecieron la semana siguiente a la operación. Los resultados demostraron que, los grupos  $\beta$ gal+vax, HSVtk y HSVtk+vax postergaron significativamente la recaída local (Kaplan-Meier, log rank test:  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente) comparado con  $\beta$ gal. Más aún, el tratamiento completo HSVtk+vax mostró un aumento en la supervivencia global con respecto a  $\beta$ gal y  $\beta$ gal+vax (Kaplan-Meier, log rank test:  $p < 0.05$ ). Por otro lado, la visualización del estado metabólico mediante 18FDG/PET SCAN sugiere una importante activación del sistema inmune únicamente en el grupo que recibió el tratamiento completo HSVtk+vax. Por último, cabe destacar que no se han encontrado efectos adversos relacionados al tratamiento. Estos resultados coinciden con los logrados por nuestro laboratorio en los protocolos clínicos veterinarios, justificando el uso de la terapia combinada como medio más efectivo para el tratamiento de la enfermedad. EL conjunto de los resultados obtenidos en tanto en el modelo de melanoma murino como en el melanoma espontáneo canino, alientan la realización de ensayos clínicos en pacientes humanos portadores de melanoma maligno.

**136. (444) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERACIÓN PEROXISOMAL-ALFA (PPARA) EN LA INICIACIÓN DE LA CARCINOGENESIS HEPÁTICA**

Casella M.<sup>1</sup>; Monti J.<sup>2</sup>; Parody J.<sup>3</sup>; Ceballos M.<sup>4</sup>; Pisani G.<sup>5</sup>; Carnovale C.<sup>6</sup>; Carrillo M.<sup>7</sup>; Alvarez M.<sup>8</sup>  
*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Cátedra de Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR*<sup>1,7,8</sup>; *Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)*<sup>2,3,4,6</sup>; *Cátedra de Morfología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR*<sup>5</sup>; *Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET)*  
 casellamlaura@hotmail.com.ar

PPARA es un receptor nuclear implicado en procesos metabólicos, inmunes e inflamatorios y en diferenciación y proliferación celular de tejidos normales y neoplásicos. La relación entre PPARa

y cáncer no está aclarada: algunos estudios postulan propiedades carcinogénicas de PPARa, mientras que otros lo muestran con actividad anti-neoplásica. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que en preneoplasia hepática hay activación de PPARa. Por otro lado, se sabe que el estrés oxidativo (EO) es clave en el desarrollo tumoral. Quercetina (Q) es un flavonoide con propiedades anti-oxidantes e inhibitorias de PPARa. La reducción del EO por Q previene el desarrollo de tumores hepáticos. Objetivo: evaluar el efecto de la inhibición de PPARa sobre el desarrollo tumoral hepático, diferenciándolo del efecto producido por modificaciones del EO. Ratas Wistar macho adultas con preneoplasia hepática (iniciadas-promovidas) fueron tratadas con Q 20 mg/kg (Q20); MK866 1 mg/kg (MK) inhibidor de PPARa no anti-oxidante; ácido ascórbico 75 mg/kg (ASC) anti-oxidante no inhibidor de PPARa; o dejadas sin tratar (IP). La determinación del EO mediante detección de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico mostró reducción en Q20 (-45%\*) y ASC (-35%\*). Los niveles nucleares de PPARa medidos por inmunoblot disminuyeron significativamente en Q20 (-67%\*) y MK (-50%\*). La cuantificación de los focos preneoplásicos mostró una reducción significativa del tamaño de los mismos en Q20 (-58%\*) y MK (-60%\*), pero no en el grupo ASC. El índice de proliferación determinado por inmunohistoquímica de PCNA se mostró disminuido en Q20 (-25%\*) y MK (-52%\*) con respecto a IP. En dichos grupos se observó un aumento significativo de células en fase G2 del ciclo celular (\* $p < 0.05$ ). En conclusión, la activación de PPARa en etapas tempranas del desarrollo tumoral hepático es crítica para el proceso carcinogénico y su aporte al desarrollo de la preneoplasia es independiente de los efectos producidos por el EO.

**137. (451) EL FLAVONOIDE SILIBINA MEJORA EL EFECTO ANTITUMORAL DE LA RADIOTERAPIA SOBRE CÉLULAS DE CÁNCER DE VEJIGA HUMANO**

Prack Mc Cormick B.<sup>1</sup>; Eiján A.<sup>2</sup>; Sandes E.<sup>3</sup>  
*Instituto de Oncología Angel H Roffo, Área de Investigación*<sup>1,2,3</sup>  
 b.mcprack@gmail.com

La radioterapia (RT) es ampliamente utilizada en el tratamiento tumoral, sin embargo las células tumorales pueden adquirir resistencia, derivando en recurrencia y fracaso en muchos pacientes. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B activa vías de supervivencia en respuesta a la radiación, siendo un posible blanco terapéutico para mejorar el efecto de la RT. Ciertos flavonoides tienen la capacidad de bloquear la vía NF- $\kappa$ B. Por esto analizamos la capacidad del flavonoide silibina (Sb) de mejorar el efecto antitumoral de la RT sobre células de cáncer de vejiga T24, evaluando: 1) viabilidad celular en función de las dosis de RT (0-6 Gy) y Sb (0-100  $\mu$ M) (MTS), 2) muerte celular (tinción con DAPI de células adheridas y naranja de acridina de cuerpos apoptóticos (ca) del sobrenadante); 3) Activación de NF- $\kappa$ B (translocación nuclear de p65 por WB). La Sb sola mostró inocuidad a la dosis óptima para la terapia combinada (40  $\mu$ M). A las 72 h del tratamiento, la terapia combinada presentó mayor actividad citotóxica que la RT (Viabilidad. 4 Gy: 83%, 4Gy+Sb: 63%, 6Gy: 67%, 6Gy+Sb: 47%.  $p = 0.001$ ), efecto superado a las 120 h cuando la recuperación de las células tratadas con RT es bloqueada en la terapia combinada (4 Gy: 93%, 4Gy+Sb: 55%, 6Gy: 76%, 6Gy+Sb: 39%.  $p = 0.003$ ). A nivel nuclear, a 72 h del tratamiento se observaron núcleos apoptóticos y micronúcleos en células tratadas con RT, y en aquellas tratadas con la terapia combinada se encontraron pocos núcleos en su mayoría apoptóticos. El número de ca en el sobrenadante incrementó con la terapia combinada (control:  $4 \times 10^4$  ca/ml, Sb:  $4 \times 10^4$  ca/ml, RT:  $11 \times 10^4$  ca/ml, RT+Sb:  $22 \times 10^4$  ca/ml). A nivel molecular, la translocación de NF- $\kappa$ B al núcleo gatillada por la RT fue bloqueada por Sb. Nuestros resultados muestran que Sb incrementa la capacidad citotóxica de la RT en parte bloqueando la vía NF- $\kappa$ B. Estas evidencias sugieren un posible rol radiosensibilizante y ameritan continuar con su estudio.

**138. (259) LA METALOTIONEÍNA 1G (MT1G) SENSIBILIZA LAS CÉLULAS TUMORALES COLORRECTALES A DISTINTOS TRATAMIENTOS QUIMIOTERAPÉUTICOS.**



Arriaga J.<sup>1</sup>; Levy E.<sup>2</sup>; Rocca Y.<sup>3</sup>; Roberti M.<sup>4</sup>; Aris M.<sup>5</sup>; Barrio M.<sup>6</sup>; Mordoh J.<sup>7</sup>; Bianchini M.<sup>8</sup>  
 CIO-FUCA<sup>1 2 3 4 6 8</sup>; Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CO-NICET<sup>5</sup>; CIO-FUCA, Fundación Instituto Leloir-IIBBA-CO-NICET<sup>7</sup>  
 jm\_arriaga@yahoo.com.ar

Las metalotioneínas (MTs) son una familia de proteínas de secuencia aminoacídica conservada que difieren en sus regiones génicas regulatorias. Dado el alto contenido y la disposición estructural de sus cisteínas, las MTs poseen capacidad de quelar zinc y diversas drogas electrofílicas con gran afinidad, además de poseer alta actividad antioxidante. Debido a estas propiedades, muchos estudios han propuesto a estas proteínas como factores de resistencia a agentes quimioterapéuticos, aunque esta depende del tipo de droga y estirpe celular involucrados. Teniendo en cuenta resultados previos en los que demostramos que la metalotioneína 1G (MT1G) es la isoforma más sub-expresada en el tejido tumoral colorrectal, hemos sobre-expresado la MT1G en la línea CACO-2, para evaluar su posible rol en la resistencia o sensibilidad a agentes quimioterapéuticos utilizados en la clínica, como oxaliplatino (OXA), cisplatino (CDDP) y 5-fluorouracilo (5-FU). Mediante curvas dosis-respuesta, demostramos que las células que sobre-expresan MT1G (CACO-MT1G) poseen mayor sensibilidad a OXA y 5FU, ( $\Delta IC_{50} = -51\%$ ;  $p < 0,01$ ) pero no al CDDP. Estudios de apoptosis por Anexina V-Ioduro de Propidio muestran que las CACO-MT1G poseen mayores niveles de apoptosis tanto en condiciones basales, como estimuladas con OXA ( $p < 0,05$ ). Luego notamos que la estimulación de las CACO-2 con zinc promueve la sobre-expresión de todas las MTs 1 y 2, pero sobretodo de la isoforma 1G. Usando células CACO-2 resistentes al OXA, demostramos que la adición de Zn potencia el efecto inhibitorio del OXA ( $\Delta IC_{50} = -48\%$ ;  $p < 0,01$ ). Así, demostramos que la MT1G es capaz de sensibilizar células colorrectales al tratamiento con OXA y 5-FU (agentes de primera línea de tratamiento en cáncer colorrectal), a la vez que el agregado de Zn a dichos tratamientos podría mejorar su efectividad terapéutica. Estudios ulteriores serán necesarios para validar estos hallazgos en el contexto clínico.

**139. (232) "EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE FGFR-3 EN CARCINOMAS Y GLÁNDULAS MAMARIAS MURINAS TRATADAS CON FGF2 O MPA"**

Sahores A.<sup>1</sup>; Giulianelli S.<sup>2</sup>; Cerliani J.<sup>3</sup>; Góngora A.<sup>4</sup>; Lanari C.<sup>5</sup>; Lamb C.<sup>6</sup>  
 IBYME<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 anuchisahores@hotmail.com

En trabajos previos demostramos que el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF2) es capaz de reemplazar al acetato de medroxiprogesterona (MPA) induciendo el crecimiento de tumores hormono dependientes (HD), mientras que el antiprogéstano RU486 inhibe el crecimiento tumoral. Sin embargo, en la glándula mamaria murina el tratamiento prolongado con MPA o FGF2 induce hiperplasias paraductales e intraductales, respectivamente. Con el objetivo de investigar los mecanismos involucrados en la regulación del crecimiento normal y neoplásico inducidos por MPA y FGF2, estudiamos la expresión de los receptores de FGF (FGFR), en particular del FGFR-3. Estudiamos glándulas mamarias de hembras vírgenes BALB/c tratadas durante 1 mes con FGF2 (1  $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$ ; bomba osmótica subcutánea [sc]) o con MPA (15 mg/ratón; sc) solos o combinados con RU486 (12 mg/kg/ratón; sc). Además se trataron tumores C4-HD con vehículo, MPA, FGF2 o FGF2+RU486 durante 10 días. En las glándulas mamarias tratadas con MPA observamos por inmunohistoquímica un aumento de la marca nuclear y disminución de la marca citoplasmática de FGFR-3 respecto al control ( $p < 0,01$ ) o al tratado con FGF2 ( $p < 0,01$ ). En las hembras tratadas con FGF2 predominó la marca intensa y citoplasmática. Por inmunofluorescencia comprobamos la polarización basal de la marca en células luminales (CK8+). En los tumores C4-HD el tratamiento con MPA y FGF2 indujo principalmente una marca nuclear del FGFR-3, mientras que en los tumores tratados con RU486, en regresión, la marca fue

exclusivamente citoplasmática y de membrana. Esta marcación, en contraste con la marca nuclear presente en tumores proliferando sugiere que podría estar relacionada con mecanismos de regresión por antiprogéstanos. Podemos concluir que el MPA y el FGF2 regulan diferencialmente la expresión de FGFR-3 en la glándula mamaria y de manera similar en los tumores C4-HD sugiriendo que los cambios en la señalización se adquirieron durante el proceso carcinogénico.

## ENDOCRINOLOGÍA 2

**140. (636) EVIDENCIAS DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA SENESCENCIA CELULAR EN LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL HIPOFISARIO**

Sabatino M.<sup>1</sup>; Petiti J.<sup>2</sup>; Sosa L.<sup>3</sup>; Gutiérrez S.<sup>4</sup>; Glaser V.<sup>5</sup>; Latini A.<sup>6</sup>; Torres A.<sup>7</sup>; De Paul A.<sup>8</sup>  
 Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC<sup>1 2 3 4 7 8</sup>; Laboratorio de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Centro de Ciencias Biológicas, Universidade de Santa Catarina<sup>5 6</sup>  
 jetama@hotmail.com

Los adenomas hipofisarios son afecciones benignas con escasa prevalencia de transformación maligna, sugiriendo mecanismos intrínsecos como la senescencia celular que podrían actuar frenando el desarrollo neoplásico. Nuestro objetivo fue determinar la contribución de la senescencia celular como mecanismo protector anti-tumoral en el desarrollo del adenoma inducido experimentalmente por estrógeno. Ratas macho de la cepa Wistar fueron estrogenizadas por implantación subcutánea de cápsulas con 30mg de benzoato de estradiol por 10, 20, 40 y 60 días. Grupo control: animales implantados con cápsulas vacías. Se determinó proliferación celular por inmunocitoquímica para Ki67. Se analizaron diferentes parámetros asociados a senescencia: actividad de  $\beta$ -galactosidasa por histoenzimología; expresión de proteínas de fusión (MFN1) y fisión (DRP1) mitocondrial, p21 (en fracciones citoplasmáticas y nucleares), IL-6 y pATM asociado a respuesta al daño del DNA (DDR) por western blot. Estadística: ANOVA-Fisher. Los datos revelaron que la hiperplasia inducida por estrógeno exhibió una respuesta proliferativa bifásica con un aumento significativo inicial a los 10 y 20 días de tratamiento, seguido por una disminución a los 60 días de estimulación ( $p < 0,05$ ). Este descenso de la proliferación estuvo acompañado por incrementos significativos de beta-galactosidasa, de las proteínas de MFN1 y de DRP1 así como de la citoquina IL-6. Además, se observó un incremento significativo en la expresión de p21, especialmente en la fracción nuclear lo cual estaría asociado con su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular. También se detectó activación de la DDR medida por un aumento en la fosforilación de ATM ( $p < 0,05$ ). Los resultados sugieren que durante el desarrollo de la hiperplasia inducida por estrógeno se activarían vías moleculares asociadas a la senescencia celular. Estas señales podrían relacionarse a un mecanismo regulatorio de la proliferación y desarrollo de tumores adenohipofisarios.

**141. (588) CRONOLOGÍA DE APARICIÓN Y CORRELACIÓN ENTRE CAMBIOS METABÓLICOS Y FUNCIÓN INSULAR INDUCIDOS POR DIETA RICA EN FRUCTOSA (DRF)**

Román C.<sup>1</sup>; Borelli M.<sup>2</sup>; Maiztegui B.<sup>3</sup>; Blaiotta C.<sup>4</sup>; Massa M.<sup>5</sup>; Gagliardino J.<sup>6</sup>  
 Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 lisiroman@hotmail.com

La administración de DRF durante 21 días induce hipertrigliceridemia, insulinoresistencia (IR), hiperinsulinemia y aumento de la secreción de insulina (SI) en respuesta a la glucosa (G). Objetivo: estudiar la cronología de aparición de esos cambios inducidos por la DRF. Métodos: ratas Wistar macho alimentadas con dieta comercial estándar divididas en 2 grupos: Control (C) y con DRF (10% en el agua de bebida) durante 7, 14 y 21 días (DRF1, DRF2 y DRF3). Al término de esos períodos se extrajeron muestras de sangre para determinar: G, insulina(I) y Triglicéridos

(TG). Se calculó el HOMA IR y el HOMA B. Si se incubaron 5 islotes a 37°C, durante 1 h. Resultados:

Parámetros metabólicos						
	C1	DRF1	C2	DRF2	C3	DRF3
I (ng/ml)	0,5±0,07	0,6±0,06	0,6±0,06	0,7±0,06	0,6±0,04	1,1±0,2*
G (mg/dl)	115±3	118±4	103±3	121±6	117±2	117±3
TG (mg/dl)	103±6	134±11*	112±15	172±15*	102±11	226±31*
HOMA IR	3,78±0,49	4,90±0,42	3,96±0,35	5,23±0,46*	4,60±0,32	8,10±1,18*
HOMA B	39,41±5	47,19±5,24	45,79±5,31	53,48±5,18	48,45±3,52	78,48±1,12*

\*  $p < 0.05$

Secreción de I (ng/islote/h)						
	C1	DRF1	C2	DRF2	C3	DRF3
3.3 mM	0,17 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,01
8.3 mM	0,96 ± 0,08*	0,70 ± 0,10	1,22 ± 0,07	1,21 ± 0,09	0,78 ± 0,09	1,34 ± 0,09*#
16.7 mM	1,35 ± 0,13	1,24 ± 0,09	2,04 ± 0,17	1,70 ± 0,11	1,16 ± 0,15	2,13 ± 0,12*#

\*C vs F, # F vs F,  $p < 0.05$ . Conclusiones: la DRF aumenta significativa y tempranamente (7 días de tratamiento) el nivel de TG plasmáticos, mientras que la IR y el aumento de la función insular se manifiesta a los 21 días: esto sugiere que los cambios inducidos por la DRF en la función B insular serían consecutiva a los ocurridos previamente en la función de otros tejidos como el hígado y el tejido adiposo.

#### 142. (11) EFECTOS DE LA TERAPIA GÉNICA CON TIMULINA SOBRE LAS POBLACIONES ADENOHIPOFISARIAS EN RATONES NUDE.

Martines E.<sup>1</sup>; Regianni P.<sup>2</sup>; Bracamonte M.<sup>3</sup>; Luna G.<sup>4</sup>; Goya R.<sup>5</sup>; Cónsole G.<sup>6</sup>  
*Universidad Adventista del Plata, Cátedra B de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>1</sup>; Cátedra B de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, INIBIOLP-CONICET<sup>2 3 4 6</sup>; INIBIOLP-CONICET<sup>5</sup>*  
 evmartines@hotmail.com

**Introducción:** La interacción entre timo y sistema neuroendocrino es clave durante el período perinatal. Existe una comunicación bidireccional en el eje timo-pituitario, hallándose receptores de hormonas pituitarias en las células epiteliales tímicas. **Objetivo:** Implementar terapia génica neonatal (TGN) mediante vector adenoviral RAD-FTS (timulina) en ratones inmunodeficientes. **Material y métodos:** Se utilizaron ratones nude hembras(H)-machos(M) heterocigotos nu/+ y homocigotos nu/nu que se inyectaron i.m. RAD-FTS o RAD-GFP (control) con (108 UFP). El día 71 se sacrificaron y se midió timulina. Se inmunomarcaron poblaciones adenohipofisarias mediante un sistema anti-HH-EnVision. Registros por videomicroscopía: tamaño celular TC ( $\mu\text{m}^2$ ) y densidad celular DC ( $\times 10^{-4}$ ). **Resultados:** Lactotropas: ( $P < 0.01$ ) TC: H 52,1±4 vs FTS 65,4±6; M 45,1±3 vs 53,5±5 sin cambios en DC. Somatotropas: ( $P < 0.01$ ) DC: H 26,2±3 vs FTS 36,8±4; M 32,1±2, vs 46,7±3 sin cambios en TC. Tirotropas: ( $P < 0.01$ ) DC: H 2,6±1 vs FTS 3,2±1; M 2,3±0,5 vs 3,8±1 y TC ( $P < 0.01$ ) H: 47,6±5 vs 75,9±4; M 46,7±7 vs FTS 76±9. Corticotropas: ( $P < 0.01$ ) DC: H 3,7±1, vs FTS 5,2±1; M 3,3±1 vs 4,8±1 y TC ( $P < 0.01$ ) H: 47±6 vs 58±7; M 44±5 vs FTS 58±7. Foliculotropas: ( $P < 0.05$ ) DC: 5±0,4 vs FTS 10,2±2; M 4,3±0,3 vs 9,7±2 y TC ( $P < 0.01$ ) H: 72,4±4 vs 98±6; M 73±5 vs FTS 131±6. Luteinizantes: ( $P < 0.01$ ) DC: 5,8±0,3 vs FTS 10,7±2; M 4,7±0,6 vs 10,2±1 y TC ( $P < 0.01$ ) H: 72±5 vs 99±8; M 72±4 vs FTS 141±10. Timulina sérica: ( $P < 0.001$ ) (fg/ml) M: FTS 285±34 vs 32±4 y H FTS 280±41 vs 36±5. **Conclusión:** Se sugiere efecto restaurativo de la TGN con timulina sobre las poblaciones adenohipofisarias nude. Esta estrategia resultaría eficaz para prevenir las deficiencias detectadas en el eje timo-pituitario de modelos atímicos.

#### 143. (80) MECANISMO DE AUTORREGULACIÓN DE LA FUNCIÓN TIROIDEA: ROL DEL 2-iodohexadecanal

Rossich L.<sup>1</sup>; Thomasz L.<sup>2</sup>; Nazar M.<sup>3</sup>; Salvarredi L.<sup>4</sup>; Masini-repiso A.<sup>5</sup>; Pisarev M.<sup>6</sup>; Juvenal G.<sup>7</sup>  
*Comisión Nacional de Energía Atómica<sup>1 2 4 6 7</sup>; Depto. de Bqca. Clínica, Facultad de Ciencias Ocas, UNC<sup>3 5</sup>*  
 esyu@hotmail.com

**Introducción:** La glándula tiroidea capta yodo para sintetizar hormonas tiroideas, el cual además cumple un rol autoregula-

torio a través de la síntesis de lípidos iodados, los cuales han sido identificados en glándulas tiroideas de distintas especies animales. De estos se han identificado y caracterizado dos: la 6-yodo-11,14-eicosatrienoico -  $\delta$ - lactona (IL - $\delta$ ) y el 2-yodo-hexadecanal (IHD). **Objetivo:** Determinar y comparar el efecto del yodo y del IHD en diferentes parámetros tiroideos. **Metodología y Resultados:** Se realizaron ensayos de captación de <sup>125</sup>I sobre células FRTL-5. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de IHD y KI en presencia de hormona tiroidea estimulante (TSH). Se observó que el IHD disminuye la captación del halógeno. Los datos obtenidos fueron correlacionados con ensayos de Western Blot para los genes NIS, Tg y TPO. Se observó que el IHD moduló negativamente la síntesis de Tg; NIS y TPO. Se extrajo ARN total de células FRTL-5 que fueron tratadas con dosis crecientes de IHD y KI durante 24 hrs. en presencia de TSH y de TSH + MMI y se realizó PCR cuantitativa. Se observó una regulación negativa sobre la expresión de los genes tiroideos (NIS, Tg, TPO, Duox-1, Duox-2, PAX8, TITF1 and FOXE1) por parte de IHD. Esta regulación negativa se pudo confirmar mediante la transfección de células FRTL-5 con construcciones que contienen las regiones promotoras de NIS, Tg, TPO, Duox 1 y Duox 2. **Conclusión:** El IHD es un posible candidato como intermediario del yodo en el mecanismo autorregulatorio de la glándula tiroidea.

#### 144. (96) EFECTO DE HIF-1 SOBRE EL PROMOTOR DE HORMONA DEL CRECIMIENTO HUMANO

Haedo M.<sup>1</sup>; Sapochnik M.<sup>2</sup>; Fuertes M.<sup>3</sup>; Gerez J.<sup>4</sup>; Renner U.<sup>5</sup>; Stalla J.<sup>6</sup>; Stalla G.<sup>7</sup>; Arzt E.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 3 4 8</sup>; Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania<sup>5 6 7</sup>*  
 mhaedo@fbmc.fcen.uba.ar

La hipófisis se caracteriza por ser un tejido con baja concentración de oxígeno. El factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) está regulado por la presencia de oxígeno y constituye el factor de transcripción más importante en la respuesta adaptativa a hipoxia (HPX), y su expresión está documentada en adenomas de hipófisis. Demostramos que HPX, y particularmente HIF-1, modulan, a nivel transcripcional, la expresión de hormona del crecimiento (GH). Esta modulación es independiente de elementos de respuesta a HIF-1 (HREs). Al ver este efecto, tuvimos como objetivo ver qué elementos de respuesta en el promotor de GH median el efecto de HIF-1. Mediante ensayos de transfección transiente de un gen reportero conteniendo diferentes longitudes del promotor de GH acoplado al gen de la luciferasa en células GH3, pudimos comprobar que el efecto de HIF-1 se mantiene aún con el promotor mínimo humano (-145 hGH-LUC) ( $p < 0,05$ ). En esta región del promotor mínimo existen sitios de unión de CREB y Pit-1. Por lo tanto, nos enfocamos sobre estos factores de transcripción, sobreexpresándolos solos o combinados con HIF-1 en diferentes concentraciones, y observamos: a) PIT-1 y CREB por sí solos activan al promotor ( $p < 0,05$ ); b) cuando se combina Pit-1 con HIF-1 se observa un efecto aditivo máximo cuando se utilizan cantidades subsaturantes (0,1  $\mu\text{g}$  > 0,3  $\mu\text{g}$ ) ( $p < 0,05$ ), indicando que comparten esta vía; c) al combinar HIF-1 y CREB, se observan efectos similares. Concluimos que en el promotor humano de GH el efecto estimulado de HIF-1 no es ejercido a través de HREs, sino a través de los sitios Pit-1 y CREB.

#### 145. (91) LA DISMINUCIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA (ERA) ASOCIADA AL ENVEJECIMIENTO ESTÁ LIGADA A PROCESOS EPIGÉNICOS DE METILACIÓN DE ADN

Moreno-piovano G.<sup>1</sup>; Varayoud J.<sup>2</sup>; Rossetti M.<sup>3</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>4</sup>; Luque E.<sup>5</sup>; Ramos J.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
 gmoreno@fbc.unl.edu.ar

Los estrógenos modulan la actividad del hipocampo, un área del cerebro relacionada con la memoria. Dicha modulación es mediada principalmente por el receptor de estrógenos alfa (REa) que se expresa en el hipocampo de forma sexualmente dimórfica. No obstante, no se conoce de qué manera la edad puede afectar la regulación de la expresión del REa en la corteza y el hipocampo. Con el objetivo de evaluar la influencia del envejecimiento normal sobre la expresión del ERA en el hipocampo utilizamos ratones hembra CF-1 jóvenes (4 meses) y adultos mayores (11 meses). Los hipocampos completos fueron extraídos mediante microcirugía y procesados de manera individual. La expresión del ARNm y la actividad transcripcional relativa de los promotores de A, C y F del gen ERA fueron evaluadas por RT-PCR en tiempo real. Mediante el análisis combinado de bisulfitación-restricción (COBRA) se determinaron alteraciones en la metilación de ADN de islas CpG ubicadas en las inmediaciones de los exones A y C. Los ratones adultos mayores mostraron una disminución significativa en la expresión del ARNm del ERA respecto a los ratones jóvenes ( $p < 0,05$ ). Al considerar la actividad relativa de cada uno de los promotores, observamos una disminución significativa en la actividad de los promotores A y C ( $p < 0,001$ ) en los animales de 11 meses, mientras que la actividad del promotor F se mantuvo sin cambios ( $p = 0,99$ ). Paralelamente, los niveles de metilación de los promotores A y C fueron mayores en los animales de 11 meses respecto a los jóvenes. Estos resultados demuestran que el envejecimiento está asociado a una disminución en la expresión del ERA en el hipocampo, mediada en parte, por una disminución en la actividad transcripcional de los promotores A y C. Asociado a la edad, detectamos un aumento en la metilación del ADN de regiones regulatorias específicas del gen de ERA, lo que indicaría que un mecanismo epigenético estaría interviniendo en la menor actividad transcripcional del gen.

**146. (106) CANALES DE POTASIO ACTIVADOS POR CALCIO (BKCA) REGULAN LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA EN CÉLULAS DE LEYDIG.**

Matzkin M.<sup>1</sup>; Siebert S.<sup>2</sup>; Spinnler K.<sup>3</sup>; Rossi S.<sup>4</sup>; Kunz L.<sup>5</sup>; Mayerhofer A.<sup>6</sup>; Calandra R.<sup>7</sup>; Frungieri M.<sup>8</sup>  
 IBYME CONICET, Cátedra de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>; Universidad Ludwig Maximilians, Munich<sup>2 3 5 6</sup>; IBYME CONICET<sup>4 7</sup>  
 maeugmatzkin@hotmail.com

Los canales iónicos ligando- y voltaje-dependientes son conocidos por su acciones en células excitables (células nerviosas y musculares). Sin embargo, han sido hallados también en células no-excitables. Recientemente, se describió la presencia de canales de potasio activados por calcio (BKCa) en células ováricas involucradas en la modulación de la esteroidogénesis. El objetivo del presente trabajo ha sido caracterizar la presencia de canales BKCa en el testículo. Se utilizaron biopsias testiculares provenientes de pacientes que presentan hiperandrogenismo y testículos de hámsteres Dorados (*Mesocricetus auratus*) adultos. La expresión de los canales BKCa se evaluó por inmunohistoquímica y RT-PCR. Dichos canales fueron localizados en las células de Leydig del testículo humano y del hámster. Las células de Leydig de hámsteres fueron purificadas a través de un gradiente discontinuo de Percoll y pre-incubadas con Iberiotoxina (50 - 100 nM, I), un bloqueante de canales BKCa. Se detectó un aumento significativo en la producción de testosterona (pmol/millón de células de Leydig) evaluada en presencia de concentraciones sub-máxima (5 mUI/ml, M5) y máxima de hCG (100 mUI/ml, M100) (control:  $2.58 \pm 0.09$ , M5:  $5.17 \pm 0.54$ , M5 + I:  $7.16 \pm 0.02$ , M100:  $121.47 \pm 1.20$ , M100 + I:  $134.55 \pm 1.17$ ,  $n=4$ ,  $P < 0.05$ ). Dicho efecto estimulador no fue asociado a cambios en la expresión de StAR (PCR en tiempo real). Células de Leydig del hámster fueron también incubadas en presencia del colorante fluorescente DIBACn(3) sensible a cambios en el potencial de membrana y hCG (M100), con o sin tratamiento previo con Iberiotoxina (100 nM). hCG hiperpolarizó las membranas celulares. Este efecto fue bloqueado mediante el pre-tratamiento con Iberiotoxina. En conclusión, este trabajo describe la existencia de canales BKCa en el testículo humano

y del hámster. Estos canales modularían la producción de testosterona en las células de Leydig a través de modificaciones en el potencial de membrana.

**147. (210) ANALISIS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN RATONES CARENTES DEL RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO**

Burghi V.<sup>1</sup>; Giani J.<sup>2</sup>; Miquet J.<sup>3</sup>; Muñoz M.<sup>4</sup>; Tobli J.<sup>5</sup>; Masternak M.<sup>6</sup>; Bartke A.<sup>7</sup>; Turyn D.<sup>8</sup>; Dominici F.<sup>9</sup>  
 IQUIFIB, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 9</sup>; Laboratorio de Medicina Experimental, Hospital Alemán<sup>8</sup>; Department of Internal Medicine, Geriatrics Research, Southern Illinois University, School of Medicine, Springfield, USA<sup>6 7</sup>  
 valeriaburghi@hotmail.com

Los ratones con delección del gen que codifica para el receptor de la hormona de crecimiento (GHR-/-) presentan resistencia a la hormona de crecimiento (GH), reducción del peso corporal, aumento de la sensibilidad a insulina y de la duración de la vida. Además, presentan disminución de la presión arterial sistólica, niveles plasmáticos de renina disminuidos y protección frente al desarrollo de nefropatía diabética. Se desconoce de qué manera las alteraciones en la acción de la GH afectan la expresión de los principales componentes del SRA in vivo. El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre la resistencia a GH y la abundancia de diferentes componentes del SRA en el corazón y el riñón de ratones GHR-/- y de sus controles normales. Se determinaron los niveles locales de angiotensina (Ang) II y Ang-(1-7); la abundancia proteica de los receptores AT1, AT2 y Mas como también de las enzimas convertidoras de Ang: ECA y ECA2. No se detectó modificación en los niveles de Ang II, determinada por inmunohistoquímica, entre ratones GHR-/- y sus controles normales. Mediante esta técnica se detectó un aumento tanto en los niveles de Ang-(1-7) ( $p < 0,002$ ) como en la expresión del receptor Mas ( $p < 0,002$ ), junto con una disminución del receptor AT1 ( $p < 0,002$ ) en ambos tejidos de los ratones GHR -/-. La expresión del receptor AT2 en el corazón de los ratones GHR -/- aumentó significativamente ( $p < 0,006$ ) mientras que su abundancia en el riñón no se modificó. No se hallaron modificaciones en la expresión de la ECA en los ratones GHR-/-, pero sí en la de ECA2 que presentó un marcado aumento ( $p < 0,002$ ) tanto en el riñón como en el corazón de estos animales. Estos resultados fueron corroborados mediante la técnica Western Blot. La sobreexpresión del eje ACE2/Ang (1-7)/receptor Mas observada en ratones GHR -/- podría tener un papel protector de las funciones cardíacas y renales contribuyendo de esta manera al retraso del envejecimiento que presenta este modelo animal.

**148. (224) DISRUPCIÓN GONADOTRÓFICA PROVOCADA POR EL DI-2 (ETHYL HEXYL PHTHALATE) EN RATAS MACHO DURANTE LA MADURACIÓN SEXUAL: ROL DEL SISTEMA GABAÉRGICO.**

Samaniego Y.<sup>1</sup>; Carbone S.<sup>2</sup>; Reynoso R.<sup>3</sup>; Scacchi P.<sup>4</sup>; Cardoso N.<sup>5</sup>; Ponzo O.<sup>6</sup>  
 Laboratorio de Endocrinología, Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 oponzo@fmed.uba.ar

Previamente hemos demostrado que el Di-2 (ethyl hexyl phthalate) (DEHP) produce cambios ontogénicos en la regulación del eje reproductor de ratas macho expuestas durante la gestación y lactancia. Los objetivos fueron estudiar: a) el efecto de la exposición postnatal a DEHP sobre la secreción de gonadotropinas en ratas macho, en distintas etapas de la diferenciación sexual. b) si el sistema GABAérgico participa en los cambios de gonadotropinas inducidos por el DEHP. Ratas Wistar macho ( $n = 8-10$  / grupo) fueron expuestas a DHEP (30 mg/kg) en agua de bebida, desde el nacimiento hasta el sacrificio a los 30, 45 y 60 días de edad. Los controles recibieron agua libre de DHEP. En el grupo de 60 días se administró agonistas GABAérgicos tipo A: Muscimol (M) 1 mg/kg (ip) y tipo B: Baclofen (B) 10 mg/kg (ip) 1 hora presacrificio. Se determinó concentración plasmática de LH y FSH por RIA. Se consideró como significativo  $p < 0.05$ . El DEHP aumentó LH plas-

mática en todas las edades (30 d: C: 22.8±3.2; DEHP: 186.7±57.7; 45 d: C: 11.1±3.2; DEHP: 171.7±20.8; 60 d: C: 3.2±1.1; DEHP: 5.9±0.6; ng/ml, p<0.01). El aumento de LH provocado por el DEHP a los 60 días fue revertido por Muscimol, pero no por Baclofen (DEHP: 5.9±0.6; DEHP+M: 3.06±0.6, p<0.05; DEHP+B: 3.9±1.1 ng/ml). Los niveles de FSH aumentaron significativamente con DEHP (p<0.05) solamente a los 60 días (30 d: C: 195.3±20.3; DEHP: 230.9±31.4; 45 d: C: 189.2±17.3, DEHP: 215.6±25.1; 60 d: C: 95.1±20.2, DEHP: 226.2±26.9 ng/ml). El aumento de FSH provocado por el DEHP a los 60 días no fue revertido por Muscimol ni Baclofen (DEHP: 226.2±26.9, DEHP+M: 244.5±27.1, DEHP+B: 161.1±79.3 ng/ml). Se concluye que la exposición postnatal de ratas macho al DEHP estimula la secreción de LH en diferentes etapas del desarrollo, mientras que solo lo hace con la FSH a los 60 días de edad. El sistema GABAérgico estaría involucrado a través del receptor tipo A en la acción disruptora del DEHP sobre la secreción de LH de ratas macho adultas.

**149. (253) CONSECUENCIAS DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL PERINATAL EN EL POSTERIOR DESARROLLO DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR UNA DIETA RICA EN FRUCTOSA**

Alzamendi A.<sup>1</sup>; Castrogiovanni D.<sup>2</sup>; Spinedi E.<sup>3</sup>; Giovambattista A.<sup>4</sup>

*Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CONICET, CICPBA<sup>1 2 3 4</sup>*

*neuroend@imbice.org.ar*

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la ingesta de fructosa en exceso por la madre lactante induce alteraciones metabólo-endócrinas en sus crías macho adultas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de una dieta rica en fructosa (DRF, 10% p/v en el agua de bebida) administrada a ratas macho adultas nacidas de madres que consumieron DRF durante la lactancia. Ratas hembra S-D preñadas fueron divididas, inmediatamente seguido al parto, en dos grupos alimentados ad libitum y recibiendo como bebida agua (MC) o DRF (MF). Entre el destete y el día 60 de vida, las crías C y F (provenientes de MC y MF, respectivamente) recibieron alimento ad libitum y bebieron solamente agua. El día 60 de vida se generaron diferentes subgrupos experimentales, todos alimentados ad libitum, y bebiendo durante 3 semanas agua (grupos CC y FC, la primer letra indica el tratamiento de la madre, y la segunda el de la vida adulta) o DRF (grupos CF y FF). Se registró diariamente el peso corporal (PC) y se sacrificaron el día 81 de vida, recolectamos sangre para la posterior cuantificación de glucosa (G), triglicéridos (TG), insulina (I) y leptina (LEP) circulantes; y se diseccionó y pesó el tejido adiposo retroperitoneal (TARP). Los hallazgos indicaron cambios significativos (p<0,05) en los PCs (vs. sus respectivos PCs del día 60) de los animales, siguiendo la progresión: CF>FC=FF>CC. Las ratas CF mostraron un aumento significativo (p<0,05 vs CC) de TG y LEP. En los animales FC se encontró un significativo (vs CC; p<0,05) incremento de G y LEP. Las ratas FF presentaron un aumento significativo (p<0,05) de G vs. CC, CF y FC; de TG vs. CC y FC; y de LEP vs. CC, CF y FC. No observamos cambios de I. La masa de TARP fue mayor en los grupos CF y FF vs CC (p<0,05). Los resultados indican que la intervención nutricional materna, durante el periodo de lactancia, genera un fenotipo en las crías, altamente susceptible al desarrollo de Síndrome Metabólico durante la edad adulta. (PICT 2007-1051).

**150. (262) IMPACTO DE LA MODIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANDRÓGENICA PREPUBERAL SOBRE LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN LA RATA MACHO ADULTA**

Ongaro Gambino L.<sup>1</sup>; Castrogiovanni D.<sup>2</sup>; Giovambattista A.<sup>3</sup>; Spinedi E.<sup>4</sup>

*Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CONICET, CICPBA<sup>1 2 3 4</sup>*

*ongaroluisina@imbice.org.ar*

Es conocido que los esteroides sexuales desempeñan un rol modulador de la insulino-sensibilidad del organismo; particularmente, las evidencias disponibles indican que el medio endógeno

androgénico se relaciona con estados de resistencia a la insulina. En el presente estudio hemos evaluado el efecto de la intervención pre-puberal sobre la actividad endógena androgénica sobre cambios de la insulino-sensibilidad en la rata macho adulta (día 100 de vida). Los grupos de ratas estudiadas fueron: a) las que recibieron un tratamiento neonatal (día 5 de vida) con flutamida (FTM; 1.75 mg s.c.), un bloqueador del receptor de andrógeno no esteroideo, b) aquellas orquidectomizadas (ODX) el día 25 de vida; y c) sus respectivos controles (CTR), grupo constituido por animales tratados neo-natalmente con vehículo solamente y sometidos a cirugía testicular no ablativa el día 25 de vida. Luego del sacrificio, se recolectó sangre para determinar la concentración plasmática de: glucosa (G), Insulina (I), triglicéridos (TG), adiponectina y factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$ . Inmediatamente, se diseccionó un trozo de tejido adiposo epididimal (TAE) para la cuantificación de ARNm de IRS-1. Nuestros resultados indicaron los siguientes cambios significativos (p<0,05 vs. CTR): 1) en animales FTM y ODX ocurrió una disminución en los niveles circulantes de G, I, TG y adiponectina, y un aumento en los correspondientes de TNF $\alpha$ . Finalmente, los niveles de expresión en TAE de ARNm para IRS-1 resultaron significativamente (p<0,05 vs. CTR) mayores en los grupos FTM y ODX. Nuestro trabajo sustenta el efecto modulador del andrógeno endógeno sobre la insulino-sensibilidad periférica, e indica que una modificación temprana (neo-natal/pre-puberal) de la actividad androgénica incrementa la sensibilidad a la insulina. Nuestro postulado está sustentado, al menos parcialmente, por el aumento en la expresión génica de IRS-1 en el TAE de los animales FTM y ODX. (PIP 0704)

**151. (363) ALTERACIONES DEL EJE REPRODUCTOR EN EL SÍNDROME METABÓLICO. EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA.**

Cardoso N.<sup>1</sup>; Scacchi Bernasconi P.<sup>2</sup>; Cardinali D.<sup>3</sup>; Scacchi P.<sup>4</sup>; Reynoso R.<sup>5</sup>

*Laboratorio de Endocrinología, Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 5</sup>; Laboratorio de Endocrinología, Instituto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica Argentina<sup>3 4</sup>*  
*ncardoso@fmed.uba.ar*

Existen evidencias sobre alteraciones de la función reproductiva en pacientes con Síndrome Metabólico (SM). Por otra parte, ha sido descripto que la melatonina (Mel) es capaz de reducir el peso corporal, la adiposidad intraabdominal y la insulina, por lo que se sugiere que el tratamiento con Mel podría mejorar el SM y restaurar la función reproductiva. El objetivo del presente trabajo fue estudiar las alteraciones del eje reproductor de ratas macho adultas con SM por ingesta de fructosa y evaluar los efectos de la administración de Mel en estos animales. Se estudiaron cuatro grupos de animales, (n=10/grupo), sometidos a los siguientes tratamientos, administrando los mismos en el agua de bebida; grupo 1: etanol al 0,1% (control), grupo 2: fructosa al 10% (Fru), grupo 3: Mel 25 mg/l, grupo 4: Fru+Mel. Se determinaron los niveles de LH (RIA, ng/ml) y testosterona sérica (EQLIA, nmol/l), peso corporal y pesos relativos de testículos. Los niveles de LH aumentaron con el tratamiento con Fru respecto del control (33±2 vs 45±3, p<0.05), efecto que fue revertido por Fru+Mel (20±2 vs 45±3, p<0.001). La testosterona disminuyó significativamente con los tres tratamientos al compararlos con el control, (2.10±0.01 vs 0.102±0.001 p<0.001, 0.12±0.01 p<0.001, 0.15±0.02 p<0.001); mientras Fru+Mel incrementó significativamente el valor de testosterona respecto de Fru (0.102±0.001 vs 0.15±0.02, p<0.01). El tratamiento con Fru incrementó significativamente el peso corporal respecto al grupo control (351±1 vs 400±1, p<0.001), efecto no revertido por Fru+Mel. Fru disminuyó el peso relativo testicular respecto del control (0.441±0.002 vs 0.404±0.001, p<0.01; efecto no modificado por el tratamiento conjunto. La reversión de los efectos de Fru sobre los niveles de LH y testosterona por Mel sugieren que ésta podría mejorar la función reproductora de la rata macho con SM.

**152. (401) EFECTO DEL INGAP-PP SOBRE LA ACTIVIDAD DE PI3K Y EL METABOLISMO DE GLUCOSA INSULAR**

Maiztegui B.<sup>1</sup>; Román C.<sup>2</sup>; Gagliardino J.<sup>3</sup>; Borelli M.<sup>4</sup>  
 CENEXA, UNLP, CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
 barmaiztegui@hotmail.com

El INGAP-PP aumenta la secreción de insulina (SI) y la masa de células B, sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual produce esos efectos. Objetivo: Estudiar el efecto del agregado de INGAP-PP sobre la actividad y la expresión proteica de glucoquinasa (GQ), el metabolismo de glucosa (G) y la asociación de PI3K (subunidad p85) con IRS-1 en islotes de ratas normales cultivados. Métodos: aislamos islotes pancreáticos de ratas Wistar macho normales (digestión con colagenasa) y los cultivamos durante 4 días en RPMI 1640 pH 7,4, conteniendo 2 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 5% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina y 10 mM G, con o sin el agregado de INGAP-PP (10 µg/ml). Posteriormente preincubamos los islotes con G 3,3 mM a 37°C por 45 min y luego los incubamos con diferentes concentraciones de G para medir SI, metabolismo de G (producción de 14CO<sub>2</sub> y 3H<sub>2</sub>O), actividad (producción de G-6-P) y expresión proteica (Western blot) de GQ y asociación PI3K/IRS-1 (IP y Western blot). Resultados: C vs. INGAP-PP (\* p<0,05): SI (ng/islote/h): 3,3 mM G: 0,26 ± 0,03 vs. 0,34 ± 0,07; 8,3 mM G: 1,59 ± 0,19 vs. 2,63 ± 0,32\*; 16,7 mM G: 2,89 ± 0,26 vs. 4,66 ± 0,45\*. Oxidación de glucosa: 14CO<sub>2</sub> (pmol/ islote/ 120 min): 3,3 mM G: 0,34 ± 0,04 vs. 0,48 ± 0,07; 8,3 mM G: 0,37 ± 0,06 vs. 0,74 ± 0,12\*; 16,7 mM G: 0,63 ± 0,10 vs. 1,43 ± 0,14\*. Utilización de glucosa: 3H<sub>2</sub>O (pmol/ islote/ 120 min): 3,3 mM G: 1,30 ± 0,22 vs. 1,78 ± 0,32; 8,3 mM G: 1,98 ± 0,25 vs. 3,15 ± 0,40\*; 16,7 mM G: 3,28 ± 0,40 vs. 5,78 ± 0,65\*. Actividad GQ (pmol/ islote/h): 2,44 ± 0,65 vs. 4,77 ± 0,27\*. Expresión proteica GQ (%): 100 vs. 191,7 ± 3,8\*. PI3K (p85) asociada a IRS-1 (%): 100 vs. 183,3. Conclusiones: El INGAP-PP aumentaría la SI vía activación de GQ y aumento del metabolismo de glucosa y la activación de PI3-K explicaría su efecto sobre la masa de células B.

**153. (459) EFECTO DE LA DIABETES TIPO 2 Y EL TRATAMIENTO CON METFORMINA SOBRE EL POTENCIAL OSTEOGÉNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATA.**

Tolosa M.<sup>1</sup>; Chuguransky S.<sup>2</sup>; Sedlinsky C.<sup>3</sup>; Schurman L.<sup>4</sup>; Cortizo A.<sup>5</sup>; Mccarthy A.<sup>6</sup>; Molinuevo M.<sup>7</sup>  
 GIOMM, Departamento de Cs Biológicas, Fac. Cs. Exactas, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
 maria\_jose\_tolosa@hotmail.com

En pacientes con Diabetes, se observa frecuentemente osteopenia, osteoporosis y un aumento en la incidencia de fracturas no traumáticas. Recientemente hemos encontrado que la Metformina posee efectos osteogénicos ex vivo e in vivo: (a) estimula la proliferación, diferenciación y mineralización de células progenitoras de médula ósea (CPMO); (b) en ratas no diabéticas mejora la microarquitectura del hueso trabecular femoral y (c) en ratas diabéticas tipo I y no diabéticas, incrementa la reparación de lesiones óseas inducidas. En este trabajo estudiamos que efecto tiene la Diabetes leve inducida por estreptozotocina-nicotinamida en ratas sobre la capacidad osteogénica de CPMO; así como la modulación de este efecto por un tratamiento oral con Metformina. Para ello, ratas Sprague-Dawley machos adultos fueron divididos en 4 grupos: Control sin tratamiento -C; Metformina 100 mg/kg/día -M; Diabéticas -D y Diabéticas + Metformina -DM durante 15 días. Las CPMO se aislaron del canal femoral y se subcultivaron en DMEM-10% FBS (Basal) o un medio osteogénico (con beta-glicerofosfato y ácido ascórbico) durante 7, 15, 21 días. Se evaluó la expresión de fosfatasa alcalina (FAL), la producción de colágeno tipo I (Col1), la mineralización (Min) y la expresión de Runx2. Bajo condiciones basales, no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos. Luego de 15 días de diferenciación osteogénica, las CPMO de ratas D mostraron una disminución significativa en todos los parámetros estudiados Col1 (4 veces menos), FAL (3 veces menos), mineral (21 días, 2,5 veces menos) y expresión de Runx2 (2,3 veces menos). La metformina incrementó dichos parámetros en los grupos M y DM. En conclusión, la metformina actúa como un agente osteogénico que es capaz

de revertir parcialmente las acciones deletéreas de la diabetes. Estos hallazgos podrían ser mediados a través de la regulación del factor de transcripción osteoblástico Runx2.

**154. (478) EL CADMIO INDUCE CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA Y DE LAS HORMONAS ADENOHIPOFISARIAS**

Miler E.<sup>1</sup>; Duvilanski B.<sup>2</sup>  
 Instituto de Química y Físico-Química Biológicas-FFYB-UBA<sup>1 2</sup>  
 emiler@ffyub.uba.ar

El Cadmio (Cd2+) es un contaminante ambiental con efectos adversos sobre la salud humana. Este metal es capaz de actuar como un disruptor endocrino. Previamente demostramos que el Cd2+ induce la proliferación de las células adenohipofisarias vía el receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ). Objetivo: Investigar los efectos del Cd2+ sobre la expresión del RE $\alpha$  y de las hormonas adenohipofisarias. Cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas hembras adultas jóvenes (Wistar), en un medio libre de rojo fenol y con suero fetal bovino adsorbido, se incubaron con Cd2+ (10 nM) o vehículo (control, C) por diferentes tiempos. La prolactina (PRL) en el medio se midió por RIA; la expresión del ARNm por PCR semicuantitativa y la expresión de proteínas por Western blot. El Cd2+ incrementó la expresión del ARNm del RE $\alpha$  a las 8 y 24 hs (expresión relativa RE $\alpha$ , % del C: 8 hs: 138.7 ± 9.6, p<0,05; 24 hs: 141.6 ± 2.0, p<0,01) mientras que la disminuyó a las 72 hs de exposición (Cd2+: 60.0 ± 2.3, p<0.05). También aumentó la expresión de la proteína (expresión relativa RE $\alpha$ , % respecto al C: variante 66 kDa: 8 hs: Cd2+: 169.6 ± 15.0, p<0.05; variante truncada 46 kDa: 8 hs: Cd2+: 217.3 ± 23.9, p<0.05). El Cd2+ estimuló la liberación de PRL en forma tiempo-dependiente y aumentó la expresión del ARNm de PRL (expresión relativa PRL, % del C: 8 hs: Cd2+: 169.9 ± 18.3, p<0.05; 24 hs: Cd2+: 180.3 ± 15.5, p<0.01). Un antagonista del RE $\alpha$  (ICI 182,780, 10<sup>-7</sup> M) impidió el aumento en la expresión del ARNm de PRL inducido por el metal (ICI: 89.8 ± 13.2, Cd2+: 192.4 ± 13.2, p<0,01 vs C, Cd2+ + ICI: 90.9 ± 5.0, p<0,01 vs Cd2+). El Cd2+ estimuló la expresión de LH (expresión relativa LH, % respecto del C: 8 hs: 138.6 ± 10.7, p<0,05; 24 hs: 145.1 ± 2.9, p<0,01). El Cd2+, a bajas concentraciones, actúa como xenoestrógeno aumentando la secreción de PRL y la expresión de LH así como también modificando la expresión del RE $\alpha$  y de una de sus variantes de "splicing" en las células adenohipofisarias.

**155. (482) EFECTO DEL TRATAMIENTO PROLONGADO CON ACTH DE CÉLULAS ADRENOCORTICALES MURINAS: INDUCCIÓN DE MECANISMOS ANTIOXIDANTES Y RESPUESTA ESTEROIDOGÉNICA**

Giordanino E.<sup>1</sup>; Repetto E.<sup>2</sup>; Sanchez R.<sup>3</sup>; Mercáu M.<sup>4</sup>; Astort F.<sup>5</sup>; Martínez Calejman C.<sup>6</sup>; Arias P.<sup>7</sup>; Cymerlyng C.<sup>8</sup>  
 UBA Facultad de Medicina-Dpto de Bioquímica Humana, CEFYBO-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 8</sup>; UBA Facultad de Medicina-Depto de Fisiología<sup>7</sup>  
 elianfg@gmail.com

Se ha demostrado que en diversas situaciones fisiológicas o patológicas que cursan con un incremento en la producción adrenocortical de esteroides, la actividad del sistema P450 mitocondrial adrenocortical genera especies reactivas del oxígeno (ROS) y se ha postulado una correlación de los efectos dañinos del incremento de ROS con una disminución de la capacidad de respuesta esteroideogénica celular. En el presente trabajo se evaluó el efecto del tratamiento con ACTH en la línea celular adrenocortical murina (Y1) en cuanto a parámetros de estrés oxidativo y capacidad de respuesta celular a la hormona. Los resultados indicaron que las células tratadas con ACTH durante 24 horas mostraron mayores niveles de lipoperoxidos (CON: 12.16 ± 1.79 vs. ACTH: 20.89 ± 2.31 µM/mg prot, p<0.05, n=6) sin diferencias en la producción basal de ROS. El pretratamiento con ACTH disminuyó la generación de ROS inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (43046 ± 6186 vs. 28707 ± 1480 en UA/µg, p< 0.01, n=3) y produjo un aumento en los niveles de HO-1 (ARNm y proteínas), mayor actividad de

glutación peroxidasa (CON:  $266,4 \pm 54,6$  vs  $722,0 \pm 119,7$  mU/ $\mu$ g prot,  $p < 0,05$ ,  $n=3$ ) y menor actividad de catalasa (CON:  $16,59 \pm 1,58$  vs. ACTH:  $7,81 \pm 0,22$   $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/ $\mu$ g prot,  $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). No se encontraron cambios significativos en los niveles de GSH intracelulares ni en la actividad ni expresión de SOD. En cuanto a la capacidad esteroidogénica de las células, se observó un incremento en la expresión de StAR ( $0,85 \pm 0,02$  vs  $1,81 \pm 0,11$ ,  $p < 0,001$   $n=3$ ) en concordancia con una mayor producción "basal" de P4 (CON:  $0,55 \pm 0,06$  vs. ACTH 24 h:  $13,50 \pm 0,62$  ng/ml/mg prot  $p < 0,001$   $n=3$ ). Adicionalmente, las células Y1 pretratadas con ACTH conservaron la capacidad de respuesta aguda a la hormona. Concluimos entonces que el tratamiento prolongado con ACTH induce mecanismos de defensa antioxidante en las células Y1 que preservan la respuesta hormonal adecuada de las células.

**156. (584) EL 17 $\beta$ -ESTRADIOL A TRAVÉS DEL RE $\alpha$  ESTIMULA LA TRANSLOCACIÓN DEL RE $\alpha$  ENDÓGENO INTRACELULAR A LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y ACTIVA LA VÍA PKC/ERK1/2 EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS NORMALES**

Gutiérrez S.<sup>1</sup>; Sosa L.<sup>2</sup>; Petiti J.<sup>3</sup>; Mukdsi J.<sup>4</sup>; Cambiasso M.<sup>5</sup>; De Paul A.<sup>6</sup>; Torres A.<sup>7</sup>

Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET<sup>5</sup>  
silvina\_gutierrez@hotmail.com

En continuación con investigaciones previas en las que demostramos que la actividad secretoria y proliferativa de células adenohipofisarias es regulada por E2 con la participación RE de membrana, nos propusimos analizar la modulación de los diferentes pools de RE por acción del 17 $\beta$ -estradiol (E2) en adenohipofisis. Cultivos primarios adenohipofisarios de rata hembra se trataron con 10 nM de E2 y con un agonista del RE $\alpha$  (PPT) por 0, 5, 15 y 30min. Se inmunomarcó el RE $\alpha$  mediante microscopía electrónica (ME, técnica de células intactas) y confocal (MC), citometría de flujo (FACS, en células sin permeabilizar) y por western blot (WB, por biotilación de proteínas de superficie). Además, se detectó la activación de PKC (por MC) y de ERK1/2 (por WB). Análisis estadístico ANOVA-Fisher. Nuestros resultados muestran la presencia del RE $\alpha$  en la membrana plasmática de lactotropas, gonadotropas y somatotropas por inmunomarcación con ME. Mediante biotilación de proteínas de superficie se detectó el full-length del RE $\alpha$  ( $\approx 66$  KDa) en la fracción del pellet (proteínas de membrana) siendo esta expresión incrementada por E2 y PPT, en el sobrenadante (proteínas intracelulares) se observó además una isoforma de  $\approx 55$  KDa. Mediante MC el RE $\alpha$  fue identificado en núcleo y citoplasma y luego de la estimulación con E2 o PPT fue detectado además en la membrana plasmática, colocalizando con el marcador de membrana Concanavalin A. El  $7,7 \pm 0,6$  de lactotropas expresaron RE $\alpha$  en la superficie mediante FACS, incrementando  $23,0 \pm 2,1$  % la intensidad de fluorescencia luego del tratamiento con E2. A partir de los 5 min de estímulo con E2 o PPT se detectó activación de la vía PKC/ERK1/2. Nuestros resultados demuestran que el RE $\alpha$  está localizado en la superficie de células adenohipofisarias normales sugiriendo que el E2 a través del RE $\alpha$  estimula la translocación del RE $\alpha$  endógeno intracelular a la membrana plasmática.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 2

**157. (52) EL ESTRÉS MECÁNICO INDUCE LA EXPRESIÓN DE TNFALFA EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS EN CULTIVO CON CARACTERÍSTICAS DE DIFERENCIACIÓN LACTOGENICA**

Romarowski A.<sup>1</sup>; Kordon E.<sup>2</sup>; Quaglini A.<sup>3</sup>  
IFIBYNE-CONICET, FCEyN - UBA<sup>1 2 3</sup>  
anaromarowski@gmail.com

En la mama, el destete genera la producción de factores locales que median la apoptosis masiva del epitelio secretorio post-lactancia. Se ha postulado que el estrés mecánico (EM),

resultante de la acumulación de leche, podría estar involucrado en la inducción temprana de estos factores. Para probar esta hipótesis, utilizamos un dispositivo diseñado y validado en nuestro laboratorio que permite ejercer EM a células creciendo en cultivo sobre una membrana flexible. Previamente reportamos que el EM aplicado a células epiteliales mamarias (HC11) induce la expresión de c-fos, la expresión y secreción de LIF y la fosforilación de STAT3, ERK1/2 y JNK. Nuestros resultados actuales muestran que el EM induce, en las mismas condiciones, la expresión de tnf- $\alpha$  a nivel de ARNm, analizado por RT-PCR cuantitativa. Además, usando inhibidores farmacológicos, determinamos que la quinasa ERK1/2 mediaría la inducción de c-fos, pero no la de tnf- $\alpha$ , en la cual estaría involucrada la vía de JNK. Por otro lado, para lograr que nuestro modelo se asemeje más a lo que sucede in vivo, donde las células epiteliales mamarias reciben el EM estando completamente diferenciadas, se trataron células HC11 crecidas sobre membranas flexibles con hormonas lactogénicas (HL). Observamos que, aún en ausencia de HL, las HC11 creciendo sobre el sustrato flexible presentan niveles detectables de pSTAT5a (por Western blot) y  $\beta$ -caseína (RT-PCR semicuantitativa), marcadores de diferenciación mamaria. Este efecto a nivel bioquímico, correlacionó, a nivel morfológico, con estructuras y disposiciones celulares en 2 y 3 dimensiones, características de células mamarias bien diferenciadas. En conclusión, nuestros resultados muestran que en células mamarias HC11 con algunas características de diferenciación lactogénica, el EM es capaz de inducir la expresión del ligando de muerte TNF-alfa, sugiriendo que el estiramiento sería capaz de generar respuestas similares en las células de mamas in vivo luego del destete.

**158. (105) PARTICIPACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR-KB EN LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN MUSCARÍNICA QUE REGULAN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS SCA-9**

Español A.<sup>1</sup>; Maddaleno M.<sup>2</sup>; Goren N.<sup>3</sup>; Sales M.<sup>4</sup>  
CEFYBO-CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
aespan\_1999@yahoo.com

Se ha descrito que el factor nuclear-kB (NF-kB) está involucrado en la tumorigénesis. Las enzimas óxido nítrico sintasa (NOS), arginasas (A) y ciclooxigenasas (COX) son efectoras de la señalización muscarínica y hemos demostrado previamente que la activación de receptores muscarínicos, juega un rol central en la progresión tumoral. Investigamos el rol del NF-kB como modulador de la expresión de las enzimas NOS, A, COX que por estimulación muscarínica, regulan la proliferación de células tumorales de glándula submaxilar murina SCA-9. La proliferación se determinó por el método de MTT como porcentaje respecto del basal (células sin tratamiento) (100%); la actividad de NOS midiendo la producción de nitrito (NO<sub>2</sub>-) por el método de Griess, la actividad de A detectando la formación de urea por un método colorimétrico, la actividad de COX detectando por RIA PGE<sub>2</sub> y la expresión proteica por Western blot. El agonista muscarínico carbacol (Carb) (10-9M) aumentó la proliferación en un  $136 \pm 3\%$  ( $p < 0,001$  vs. basal). Este efecto se revirtió al preincubar con el antagonista atropina (10-6M) o con los inhibidores de: NOS2 (aminoguanidina 10-3M), NOS3 (1134 10-5M), A (NOHA 10-4M), COX (indometacina 10-6M) o COX-2 (NS-398 10-5M) ( $p < 0,001$  vs. Carb). También observamos que el efecto estimulante del Carb se redujo al preincubar las células con 10-5M de IMD354 o MG132, inhibidores de la vía NF-kB ( $p < 0,001$  vs. Carb). El Carb además incrementó en forma NF-kB dependiente la expresión de las enzimas NOS2, AII, NOS3 y COX-1 y aumentó la producción de NO<sub>2</sub>-:  $172 \pm 17\%$ ; urea:  $272 \pm 16\%$  y PGE<sub>2</sub>:  $183 \pm 8\%$  ( $p < 0,001$  vs. basal). El agregado de IMD354 redujo la producción de NO<sub>2</sub>-:  $41 \pm 9\%$ , urea:  $37 \pm 8\%$  y PGE<sub>2</sub>:  $51 \pm 3\%$  ( $p < 0,001$  vs. Carb). Concluimos que la estimulación muscarínica promueve la proliferación de células SCA-9 por activación de las enzimas NOS, A y COX y este efecto esta mediado por la participación de la vía NF-kB

**159. (183) ESTUDIO DE LOS EFECTOS BIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE LECITINA DESTINADAS AL TRANSPORTE DE PEQUEÑOS RNA DE INTERFERENCIA (SIRNA)**

Gándola Y.<sup>1</sup>; Irene P.<sup>2</sup>; Pérez S.<sup>3</sup>; Carlucci A.<sup>4</sup>; Sotelo A.<sup>5</sup>; Turyn D.<sup>6</sup>; González L.<sup>7</sup>  
 Departamento de Química Biológica, FFyB UBA<sup>1 2 5 6 7</sup>;  
 Departamento de Tecnología Farmacéutica de Farmacia  
 y Bioquímica, UBA<sup>3 4</sup>  
 gandolayami@hotmail.com

El silenciamiento de genes por interferencia con RNA es un proceso natural que implica la degradación de mRNA. El mayor impedimento para la utilización de esta tecnología con fines terapéuticos es la vehiculización de estas moléculas. Nuestro grupo ha caracterizado nanopartículas de lecitina capaces de unir siRNA, las cuales representan plausibles sistemas para la vehiculización de siRNA. El objetivo de este trabajo es analizar citotoxicidad y efectos biológicos de nanopartículas de lecitina sobre células de cáncer de mama para evaluar su potencial uso como carriers de siRNA. Se usaron dispersiones de lecitina 2% p/v preparadas en buffers isotónicos (pH 5 y 7). La citotoxicidad y efectos sobre proliferación celular se analizaron en células de cáncer de mama MCF-7 mediante un ensayo basado en la reducción del cloruro de tetrazolium. La degradación de PC produce segundos mensajeros implicados en la señalización intracelular, por lo que se analizó la activación y expresión de proteínas activadas por los mismos: Erk 1/2 y mTOR. También se evaluó si las nanopartículas de lecitina modifican la expresión del EGFR, molécula susceptible de silenciamiento génico para terapia anti-tumoral. Altas concentraciones de lecitina en ausencia de suero resultaron citotóxicas, mientras que no lo fueron en presencia de suero. Los estudios de fosforilación y contenido proteico de mTOR se correlacionan con los resultados de citotoxicidad de las dispersiones de lecitina, ya que a mayores concentraciones del fosfolípido la fosforilación de mTOR disminuye respecto a las células sin tratar. La expresión del EGFR es inducida por altas concentraciones de PC, lo cual se correlacionó con el incremento de la fosforilación de Erk1/2. Los resultados descriptivos sugieren que el uso de bajas concentraciones de fosfatidilcolina es adecuado para la vehiculización de siRNA por no resultar citotóxico y por que no modifica la expresión de proteínas pro-tumorogénicas como el EGFR.

**160. (203) LA METILACIÓN AFECTA LA CAPACIDAD MIGRATORIA INVOLUCRANDO AL CANAL DE SODIO EPITELIAL (ENAC) EN LA LÍNEA 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

En ensayos de reparación de la herida en la línea celular BeWo, derivada de trofoblasto humano, demostramos que la aldosterona influye en la migración celular a través de sus efectos sobre el canal de sodio epitelial (ENaC). Aldosterona produce un aumento en la probabilidad de apertura del canal debido a su activación por proteólisis y/o metilación de la subunidad  $\beta$ . El objetivo de este trabajo es determinar el papel de la metilación en la migración de células BeWo, y si se ven afectadas las corrientes y la expresión de ENaC. Evaluamos la capacidad migratoria de las células realizando una herida en las monocapas y midiendo el porcentaje cicatrizado a las 6 h. Las células BeWo estimuladas con el inhibidor de la metilación 3-deazaadenosina (3-DZA, 200  $\mu$ M) cubrieron una menor superficie de las heridas (12.9 $\pm$ 1.5%), que las cultivadas sin inhibidor (45.1 $\pm$ 2.0%), ( $p < 0.05$ ,  $n = 12$ ). Observamos un incremento en la reparación de la herida en células tratadas con 3-DZA, en presencia de 200  $\mu$ M del donante de metilos S-adenosilmetionina (AdoMet) (27.3 $\pm$ 2.4%), comparado con células en ausencia del mismo (12.9 $\pm$ 1.5 %) ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ). Ensayos de proliferación celular indican que la migración es el principal factor involucrado en este fenómeno. En presencia de 3-DZA observamos una reducción de casi la mitad del valor en las corrientes de ENaC sensibles al amiloride (Iamil) (7.0 $\pm$ 4.2 pA,  $p < 0.05$ ) con respecto al control (-15.0 $\pm$ 4.2 pA) mientras que vuelve a incrementarse al incorporar AdoMet (-11.0 $\pm$ 0.8 pA a -140 mV,  $p < 0.05$ ) ( $n = 6$ ) (patch clamp, célula entera). La expresión de las subunidades del canal no se modifica con el tratamiento con

3-DZA ( $n = 3$ ). Nuestros resultados suman evidencias sobre el posible mecanismo de regulación del ENaC por aldosterona en placenta y células BeWo, y su participación en la migración celular, lo cual podría ser relevante en la preeclampsia, donde se observa una menor invasión de las células trofoblásticas, afectándose el transporte y/o migración placentaria.

**161. (277) REGULACION DE LA EXPRESION DEL CANAL DE CLORURO CFTR MEDIANTE 1,10 FENANTROLINA**

Sanchez F.<sup>1</sup>; Valdivieso A.<sup>2</sup>; Taminelli G.<sup>3</sup>; Schulman G.<sup>4</sup>; Clazure M.<sup>5</sup>; Massip Copiz M.<sup>6</sup>; Teiber M.<sup>7</sup>; Santa Coloma T.<sup>8</sup>  
 Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina (www.uca.edu.ar/pib; pib@uca.edu.ar; Francisco\_sanchez@uca.edu.ar)<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
 franciscosanchezmv@hotmail.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. Recientemente hemos desarrollado un anticuerpo monoclonal contra la primera región extracelular del CFTR. Logramos reconocer con alta sensibilidad a dicha proteína, tanto en su estado nativo como desnaturalizado. La 1,10-fenantrolina es un conocido inhibidor de metaloproteinasas, principalmente aquellas asociadas al Zinc. Nuestra hipótesis es que limitando el rol de las proteasas, en el cultivo celular, debería disminuir la degradación del CFTR y obtenerse una mayor expresión neta. El objetivo de este trabajo fue entonces estudiar el rol de la fenantrolina como potenciador de la expresión del CFTR en distintos modelos de líneas celulares FQ. El primer modelo está constituido por células IB3-1 que contienen la mutación  $\Delta F508$ , la cual afecta el transporte de Cl<sup>-</sup>, y células S9, que son IB3-1 corregidas mediante un vector viral que expresa CFTR wt. El otro modelo, células Caco-2 de carcinoma de colon humano, son células que expresan CFTR wt. Utilizando Western blots y microscopía confocal, determinamos el punto óptimo en la estimulación a partir de una curva de concentraciones de fenantrolina y de una curva de tiempos de exposición en los cultivos. Se pudo observar un aumento en la cantidad de CFTR maduro en Caco-2 luego de 24 horas a 100  $\mu$ M. A tiempos más largos esa concentración fue tóxica. Este estudio nos permitirá determinar la utilidad de los inhibidores de metaloproteinasas como potenciadores del CFTR. Las sustancias que aumentan la expresión del CFTR tienen valor potencial terapéutico en FQ. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (AGV, MMC y GS), ANPCYT (MC), y UCA (GLT, FS, MLT).

**162. (304) ¿QUÉ PASÓ CON EL ARNI? IMPORTANCIA DEL CLONADO DE CÉLULAS SELECCIONADAS CON PLÁSMIDOS QUE EXPRESAN ARN DE INTERFERENCIA.**

Valdivieso A.<sup>1</sup>; Sánchez F.<sup>2</sup>; Taminelli G.<sup>3</sup>; Clazure M.<sup>4</sup>; Massip Copiz M.<sup>5</sup>; Schulman G.<sup>6</sup>; Teiber M.<sup>7</sup>; Santa Coloma T.<sup>8</sup>  
 Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina LABORATORIO DE <sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
 angelvaldi@hotmail.com

El uso de ARN de interferencia (ARNi) en el "knock-down" de proteínas es una herramienta muy valiosa, aunque algunas metodologías resultan costosas y poco prácticas cuando se experimenta con grandes cantidades de células (por ej.: el uso de oligonucleótidos de ARNi sintético). Una alternativa es el uso de plásmidos que expresan ARNi ("shot hairpin-RNAi", sh-RNAi) con resistencia a antibióticos. Anteriormente, comenzamos a desarrollar un modelo celular de fibrosis quística (FQ) en células de cáncer de colon humano (Caco-2) usando sh-RNAi contra el CFTR para confirmar resultados obtenidos en otros modelos celulares, entre ellos, la reducción de la actividad del complejo

I mitocondrial (CIm) en FQ. Se usaron cuatro sh-RNAi dirigidos contra diferentes regiones del CFTR y un plásmido control. Las transfecciones transientes mostraron efecto sobre la actividad del CIm aunque los resultados fueron difíciles de reproducir. Por esta razón, usamos la resistencia a puromicina de los plásmidos durante varios pasajes, para generar líneas celulares estables de cada sh-RNAi. Aunque tres de estas líneas con shRNAi mostraron una reducción significativa de la expresión del CFTR con respecto al control, las células fueron perdiendo paulatinamente la inhibición. Finalmente, clonamos las células seleccionadas mediante dilución al límite y seleccionamos los clones con menor expresión del CFTR respecto al control (células transfectadas con el plásmido control) por "dot-blot" con un anticuerpo monoclonal contra el CFTR. El próximo paso será medir la expresión del ARNm del CFTR por qRT-PCR y la actividad del CIm. El clonado de las células transfectadas con sh-RNAi podría prevenir la heterogeneidad de células con diferentes grados de interferencia y la disminución de la inhibición con los sucesivos pasajes. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (AGV, MMMC y GS), ANPCYT (MC), y UCA (GLT, FS, MLT).

**163. (306) 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>; Taminelli G.<sup>3</sup>; Clauzure M.<sup>4</sup>; Sanchez F.<sup>5</sup>; Schulman G.<sup>6</sup>; Teiber M.<sup>7</sup>; Santa Coloma T.<sup>8</sup>

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica Argentina<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</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). Además, en las heridas está aumentada la activación de c-Src y las células FQ tienen una cicatrización más lenta (Trinh, 2008, Schiller, 2010). Los objetivos de este trabajo fueron determinar si se puede corroborar un aumento de la actividad de c-Src mediante microscopía confocal en células FQ y si c-Src se encuentra aumentado en forma diferencial en las heridas de una monocapa celular. Utilizando células CaCo-2, que expresan CFTR wt, transfectadas con RNA de interferencia para CFTR, observamos que había un aumento de la actividad de c-Src. Sin embargo, las células no estaban clonadas y se perdió la inhibición con los pasajes. Ahora estamos clonando las células para solucionar este problema. También se utilizaron células IB3-1 (mutación deltaF508 que afecta el transporte de Cl<sup>-</sup>), S9 (IB3-1 corregidas mediante un vector viral que expresa CFTR wt) y C38 (iguales que las S9 pero el CFTR wt tiene parte del extremo 5' truncado). Mediante microscopía confocal, se observó mayor actividad de c-Src (medida con un anticuerpo que reconoce c-Src fosforilado en la Tyr418) en las células IB3-1 comparadas con las S9. Luego, se crecieron las células en monocapa llegando a confluencia y se realizaron varias heridas. En este momento se están probando distintas condiciones para determinar si hay un aumento diferencial de la expresión de c-Src en heridas hechas a monocapas de estas células. Asimismo, se están estudiando los posibles mecanismos involucrados en la señalización CFTR-Src. En conclusión, la inhibición de la actividad o expresión del CFTR produce un incremento en la actividad de c-Src. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007, 00628) y UCA. Becas CONICET (AGV y MMMC), ANPCYT (MC) y UCA (FS, GLT, MLT).

**164. (318) LA INDUCCIÓN DE LA MAP QUINASA FOSFATA-SA-2 (MKP-2) MODULA NEGATIVAMENTE LA ACTIVACIÓN POR AMPc DEL GEN CYP11A1 EN CÉLULAS DE LEYDIG.**

Gomez N.<sup>1</sup>; Mori Sequeiros García M.<sup>2</sup>; Gorostizaga A.<sup>3</sup>; Acquier A.<sup>4</sup>; González-calvar S.<sup>5</sup>; Méndez C.<sup>6</sup>; Paz C.<sup>7</sup>  
INBIOMED, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; IBYME, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>  
nataliavgr@hotmail.com

En células esteroidogénicas la activación de MAP quinasas (MAPKs) por las hormonas tróficas lleva a la inducción y/o activación de proteínas necesarias para la esteroidogénesis. Estos eventos son modulados indirectamente por las MAPK fosfatasa (MKPs), como MKP-2, dada la capacidad de estas enzimas de inactivar a las MAPKs. Previamente demostramos que en células de Leydig MA-10, LH/hCG y AMPc promueven la acumulación de la proteína MKP-2 por mecanismos transcripcionales y post-traduccionales, y que la sobre-expresión de esta enzima reduce la activación por AMPc del promotor del gen CYP11A1 (gen que codifica para la enzima P450scc). En este trabajo nos propusimos confirmar -mediante el bloqueo de la expresión de la proteína endógena- el papel regulatorio de MKP-2 en la inducción del gen CYP11A1 y determinar los efectos de las modificaciones post-traduccionales inducidas por AMPc sobre la vida media de esa proteína, utilizando células de Leydig MA-10. Se empleó un gen reportero (CYP11A1-luciferasa) para evaluar la actividad del promotor del gen en estudio y un shRNAi específico para bloquear la expresión de MKP-2. Se determinó que el 8Br-AMPc aumenta la actividad del promotor (P<0,001) y que el bloqueo de la expresión de MKP-2 por el shRNAi aumenta este efecto: AMPc=0,74±0,07 vs. AMPc+RNAi=0,96±0,07 (actividad relativa de luciferasa, P<0,05). Para analizar si las modificaciones post-traduccionales modifican la vida media de MKP-2 se emplearon células transfectadas para la expresión de flag-MKP-2 y se evaluaron los niveles de la proteína por Western blot (anticuerpo anti-flag). Experimentos de pulse-chase mostraron que la estimulación con 8Br-AMPc incrementa la vida media de la proteína recombinante. En síntesis se concluye que MKP-2 se estabiliza por modificaciones post-traduccionales promovidas por AMPc y que la inducción de esta fosfatasa modula negativamente la acción hormonal sobre la expresión del gen CYP11A1.

**165. (380) APLICACIÓN DE QUANTUM DOTS COMO BIOSENSORES DEL DAÑO INDUCIDO POR PRESERVACIÓN HIPOTÉRMICA EN EL TRANSPORTE ENDOCÍTICO. EVALUACIÓN EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA.**

Hovanyecz P.<sup>1</sup>; Rodriguez J.<sup>2</sup>; Guibert E.<sup>3</sup>; Sigot V.<sup>4</sup>  
Centro Binacional Argentina Italia de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada, UNR<sup>1 2 3 4</sup>  
ho\_pau@hotmail.com

El transporte endocítico mediado por receptores requiere la integridad de las membranas celulares para la activación e internalización de complejos ligando-receptor. Esta integridad se ve alterada durante la preservación hipotérmica (PH), etapa previa a la aplicación en trasplante celular. Si bien existen técnicas como el análisis de liberación de lactato dehidrogenasa (LDH) para evaluar la viabilidad celular e integridad de la membrana, permitiendo sólo una cuantificación global del daño. En este trabajo se propone la evaluación de la injuria celular inducida por frío monitoreando el transporte endocítico a nivel de células individuales luego de la PH seguida de reoxigenación normotérmica (RN). Utilizando nanopartículas fluorescentes, Quantum Dots (QDs) conjugadas al ligando factor de crecimiento epidérmico (EGF), se siguió la internalización mediada por receptor de los complejos preformados biotina-EGF:estreptavidina-QDs (EGF-QDs). El sistema se evaluó en cultivo primario de hepatocitos de rata (HC) y preservados (HP) a 4°C en solución de la Universidad de Wisconsin.

Grupos experimentales	Incubación con complejos QD-EGF a 37°C
HC24	•5 min. y 120 min. •5 min.QD sin ligando (control).
HP24 y HP72 unión (t0)	•5 min.
HP24 y HP72 t120	•120 min.RN (37°C, 5% CO2).



El % de liberación de LDH en los HC24 y HP24 (t0 y t120) y HP72 (t0) (19±7 (n=7), 5±3 (n=7), 11 (n=2) y 9 (n=2) %, respectivamente) no reveló daño celular, lo cual se correlaciona con el análisis microscópico que mostró tanto la unión como la internalización de los complejos. No se observó unión inespecífica de los QDs no conjugados a EGF. El daño en la membrana se observó en HP72 t120 con un 91±5 % de liberación de LDH (n=2). Los QDs inicialmente unidos en HP72 t0 no fueron internalizados luego de la RN. Mediante esta técnica los QDs podrían ser utilizados como sensores del daño inducido por la PH en la capacidad para el transporte endocítico de hepatocitos previo a su aplicación en trasplante celular.

**166. (510) NRF2 ES MEDIADOR DE LA ACTIVACIÓN DEL PROMOTOR DE HO-1 POR VGPCR.**

Sapochnik D.<sup>1</sup>; Tanos T.<sup>2</sup>; Vinuesa A.<sup>3</sup>; Rabinovich P.<sup>4</sup>; Sordelli A.<sup>5</sup>; Martin M.<sup>6</sup>; Marinissen M.<sup>7</sup>; Mesri E.<sup>8</sup>; Coso O.<sup>9</sup> *Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, FCEN, IFIBYNE UBA-CONICET<sup>1,3,4,5,9</sup>; Ecole polytechnique fédérale de Lausanne ISREC - Swiss Institute for Experimental Cancer Research Lausanne, Suiza<sup>2</sup>; Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28029, España<sup>6,7</sup>; University of Miami School of Medicine Miami, USA<sup>8</sup>*  
dsapochnik@fbmc.fcen.uba.ar

La Hemo-oxigenasa 1 (HO-1), una enzima inducible que metaboliza el grupo hemo, se encuentra altamente expresada en lesiones causadas por el Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi (KSHV). Uno de los genes clave del KSHV involucrado en el desarrollo de las lesiones del Sarcoma de Kaposi es un receptor acoplado a proteína G oncogénico denominado vGPCR. vGPCR induce la expresión de HO-1 y la transformación de las células infectadas a través de la subunidad G12/13 de las proteínas G heterotriméricas y de la pequeña GTPasa RhoA, la cual contribuye a la tumorigénesis y a la expresión del Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF). En el promotor de HO-1 se encuentran sitios ARE, que responden al factor de transcripción Nrf2. Nos hemos enfocado en el rol que cumple Nrf2 en la vía activada por vGPCR y de la cual participan G12/13 y RhoA. Nos propusimos identificar los caminos de señalización disparados por vGPCR y su influencia en el rol de Nrf2 en la regulación del promotor de HO-1. Hemos encontrado que la expresión de vGPCR aumenta la expresión del gen reportero Luciferasa fusionado a un promotor que responde a Gal4 cuando éste es co-transfectado con la quimera Gal4- Nrf2 TAD. Observamos también que vGPCR activa la expresión de Luciferasa cuando éste está bajo el control de un promotor mínimo que contiene 3 sitios ARE respondedores a Nrf2 y que este efecto es bloqueado por un dominante negativo de Nrf2. Respecto a la localización subcelular de Nrf2 hemos demostrado que vGPCR, G12/13 y RhoA producen traslocación nuclear y que este efecto es mediado por ERK1/2. Además observamos que ERK1/2 tiene efecto sobre la actividad transcripcional de Nrf2. Nuestros estudios demuestran que vGPCR induce la expresión de HO-1 a través de diversos factores que convergen en la activación del promotor de HO-1 vía el factor de transcripción Nrf2. Además, el mecanismo a través del cual actúa esta cascada de señalización involucra la regulación de la traslocación de Nrf2 al núcleo.

**167. (545) ESTUDIO DE LOS MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LOS EFECTOS ANTI-INFLAMATORIOS DE IL-10 EN CÉLULAS CARDÍACAS INFECTADAS CON TRYPANOSOMA CRUZI.**

Hovsepian E.<sup>1</sup>; Penas F.<sup>2</sup>; Mirkin G.<sup>3</sup>; Goren N.<sup>4</sup> *CEFYO-CONICET<sup>1,2,4</sup>; Dto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina UBA<sup>3</sup>*  
eugehovsepian@yahoo.com.ar

Trypanosoma cruzi (Tc) es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas caracterizada por infecciones persistentes en el hombre que afectan la funcionalidad cardíaca. La respuesta

inflamatoria desencadenada por la infección puede conducir a importantes daños tisulares. En este sentido, resulta importante estudiar la participación de la citoquina antiinflamatoria IL-10 y determinar los mecanismos involucrados en la resolución del proceso inflamatorio cardíaco. Para ello, cultivos primarios de miocardiocitos fueron infectados con la cepa aguda RA de T. cruzi y tratados con IL-10. Observamos mediante Western blot (Wb) que IL-10 (20 ng/ml) inhibe la expresión de óxido nítrico sintasa2 (NOS2) inducida por la infección de manera significativa. Además, disminuye la liberación de NO (µM) (26.2±3.0%;p<0.05) analizada mediante ensayo de Griess a las 48 h post-infección. Más aún, detectamos mediante RT-PCR cuantitativa (Q-RT-PCR) que el pre-tratamiento con IL-10 inhibe la síntesis de IL-6 y TNF-α 4 h post infección. También comprobamos que IL-10 inhibe la activación de la vía de NF-κB analizada mediante Wb en términos de detección de la proteína inhibitoria IκB-α en el citosol. Con el objeto de conocer las vías implicadas en los efectos de IL-10 analizamos la activación de STAT3. Observamos mediante Wb, que tanto Tc como IL-10 promovieron fosforilación de STAT3 confirmando activación de la vía. Asimismo, detectamos por Q-RT-PCR que Tc e IL-10 aumentaron los niveles del ARNm de SOCS3, supresor de la vía IL-10/STAT3. Los resultados demuestran que IL-10 modula la inflamación en células cardíacas infectadas inhibiendo la activación de NF-κB, la expresión de NOS-2 y de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF-α. Se podría inferir que STAT3 estaría involucrada en los efectos antiinflamatorios mediados por IL-10.

**168. (583) EL RELOJ MITOCONDRIAL DEL ENVEJECIMIENTO: MODULACIÓN DE SIRT3 POR EL INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE NNOS**

Perez H.<sup>1</sup>; Alippe Y.<sup>2</sup>; Elguero M.<sup>3</sup>; Converso D.<sup>4</sup>; Carreras M.<sup>5</sup>; Poderoso J.<sup>6</sup> *Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno, Hospital de Clínicas<sup>1,2,3,4,5,6</sup>*  
hernanperez82@gmail.com

En 1956, D. Harman propuso la teoría del estrés oxidativo en la vejez. Considerando que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es generado por inhibición de la transferencia de electrones en las mitocondrias y por acción del NO, exploramos el comportamiento redox de las organelas de hígado y cerebro de ratas en el envejecimiento. Se confirmó que en cada etapa existe un contenido de mtNOS específico, consecuencia del aumento progresivo en la transcripción del gen nNOS y de la translocación y activación de la proteína (en pmoles/min.mg, hígado 3 me=23±2; 18 me=41±1; 24 me=45±2; cerebro 3 me=18±2; 18 me=28±0.5; 24 me=36±2, ratas hembras/machos en ambos órganos; p<0.05). El aumento de NO se asoció a un aumento de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La disminución de la actividad de MnSOD (3 me=1394±95 vs. 24 me=921±11 nmoles/min.mg; p<0.05) contribuyó a un aumento final en la reacción de NO con O<sub>2</sub> que determino mayor formación de peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Esto condujo a la nitración de proteínas mitocondriales en las ratas adultas analizado por WB. La nitración del complejo I, disminuyó su actividad un 60% (3 me=341±48; 24 me=203±19 nmoles/min.mg; p<0.05). Durante el estrés nitrativo, analizamos un marcador mitocondrial de envejecimiento como es sirtuina 3 (Sirt3) que participa en el control de los niveles de especies reactivas de oxígeno. En animales jóvenes, la actividad de Sirt3 fue de 304±14 y 372±28 UA en hígado y cerebro respectivamente, mientras que a los 18 meses aumentó a 380±27 y 440±15 UA (p<0.05). El tratamiento de mitocondrias jóvenes con ONOO<sup>-</sup> aumentó la actividad de Sirt3 (314±15 vs.370±11). Sin embargo, la nitración in vitro de Sirt3 por ONOO<sup>-</sup> disminuyó su actividad en forma dosis dependiente. Concluimos que en el envejecimiento, la expresión/localización de nNOS es controlada cronotrópicamente, y que un aumento de NO mitocondrial conduce a la nitración de proteínas y a la oxidación de NADH con una ganancia inicial y un deterioro final de las funciones de Sirt3.

**169. (589) IDENTIFICATION OF ECHINOCOCCUS SP CALCINEURIN:TARGETS OF EG-FKBP-FK506 COMPLEX**

Nicolao M.<sup>1</sup>; Cumino A.<sup>2</sup>

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Área de Biología Molecular de Cestodes, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMDP<sup>1,2</sup>  
acumino@gmail.com

Calcineurin (CaN) is a eukaryotic Ca-and calmodulin-dependent serine/threonine protein phosphatase (PP2B), potentially inhibited by immunosuppressant drugs, CsA and FK506, in the presence of their respective receptor proteins, cyclophilin and FKBP, both described in *Echinococcus* sp. (Cumino et. al., 2010). Previous experiments in our laboratory have showed that FK506 and CsA possess dose-dependent protoscolicidal activity in *E. granulosus*. CaN is a heterodimeric protein consisting of a catalytic subunit A, which contains an active site dinuclear metal center and a tightly associated, regulatory Ca-binding subunit B. We identified and analyzed in silico orthologous in *Echinococcus* genome: Eg-CaN-A and Eg-CaN-B, both archetypal proteins with all residues implicated in the binding of pharmacological ligands, and in interactions with possible targets. The primary sequence of both subunits and heterodimeric quaternary structure is highly conserved in *Echinococcus* sp. Eg-CaN-A contains a CaM-binding domain (PD343921), a CaN-B-binding domain (PD862669) and an autoinhibitory domain (PD322644). The CaN-B subunit itself is a CaM-like Ca+2-binding protein that contains four high-affinity Ca+2-binding EF hands. Binding of Ca+2 to CaN-B stimulates phosphatase activity, although to a lesser extent than when CaM is also present. Although the estrogen receptor-independent mechanisms of tamoxifen (TAM) remain unclear, it is demonstrated that TAM is implicated in regulates the transcriptional response to calcium. In *E. granulosus*, protoscolicidal treatment with TAM, showed induction of intracellular calcium release, the alteration of cellular membrane properties and the inhibition of P-glycoprotein (Nicolao et al., 2010). Transcriptional profiling studies showed that TAM reduces the Eg-canB expression, consistently with these observations, in other cellular systems, TAM could involve in the estrogen-dependent regulation of CaN. These findings highlight the potential to define novel drug targets and elucidate conserved elements of signal transduction cascades.

**170. (623) ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN C-JUN Y C-FOS MEDIANTE TÉCNICAS DE MICROSCOPIA CONFOCAL**

Vinuesa A.<sup>1</sup>; Naipauer J.<sup>2</sup>; Guaimas F.<sup>3</sup>; Degese M.<sup>4</sup>; Sapochnik D.<sup>5</sup>; Sordelli A.<sup>6</sup>; Rabinovich P.<sup>7</sup>; Coluccio Leskow F.<sup>8</sup>; Jares-erijman E.<sup>9</sup>; Coso O.<sup>10</sup>

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, IFIBYNE UBA-CONICET<sup>1,2</sup> <sup>4,5,6,7,10</sup>; Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA, CIHIDECAR, CONICET, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>3</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA<sup>8</sup>; Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA, CIHIDECAR, CONICET<sup>9</sup>  
angeles.vinuesa@gmail.com

El comportamiento de las células es muy dinámico ya que existe una comunicación constante entre ellas y el entorno. La transducción de señales externas y su transformación en una respuesta celular involucra numerosos eventos de interacción entre proteínas. Las técnicas más utilizadas para estudiar este fenómeno involucran el desarmado de las células y el estudio por técnicas bioquímicas. Este trabajo pretende estudiar la dinámica de factores de transcripción (colocalización, interacción física directa, etc.) en células intactas. Se fusionaron los factores de transcripción c-Fos y c-Jun, que forman parte del heterodímero AP-1, a las proteínas fluorescentes ECFP y EYFP respectivamente. Se estudió su localización subcelular y su dinámica de translocación al núcleo en células NIH 3T3 en condiciones de proliferación, de privación de suero y estimulando con PDGF en presencia o ausencia de inhibidores farmacológicos de vías de MAPKs. Además, se utilizaron estos constructos para realizar ensayos de colocalización en un microscopio confocal practicando cuantificación mediante el uso de los coeficientes de Manders'

(CMs), los cuales brindan información acerca de la distribución de las proteínas y la variación espacial de la colocalización. Dado que los eventos desencadenados en la transducción de señales involucran numerosas interacciones entre pares de proteínas, creímos necesario contar con una técnica más precisa que la mera colocalización en un compartimento subcelular. Ensayamos la técnica de FLIM - FRET utilizando el par ECFP-c-Fos y EYFP-c-Jun, de conocida y probada interacción como prototipo. Utilizando la cuantificación por CMs y FLIM - FRET estudiamos la dinámica de AP-1 y la influencia de las vías de MAPKs sobre la misma. Nuestros resultados muestran un efecto diferencial en la influencia de Erk1/2 y p38 como mediadores de la traslocación al núcleo de c-Fos; lo cual sugiere que, pese a ser ambas Fos-quinasas, tendrían un efecto diferencial sobre su función.

**171. (656) EL ESTRÉS POR SOBRECARGA DE ALBÚMINA INDUCE LA EXPRESIÓN DE LAS MAP QUINASA FOSFATASAS 1 Y 2 (MKP-1 Y MKP-2) EN CÉLULAS DE TÚBULO PROXIMAL RENAL.**

Gorostizaga A.<sup>1</sup>; Acquier A.<sup>2</sup>; Gómez N.<sup>3</sup>; Mori Sequeiros M.<sup>4</sup>; Mendez C.<sup>5</sup>; Paz C.<sup>6</sup>

INBIOMED-Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,3,4,5,6</sup>  
agorostizaga@hotmail.com

La sobrecarga de albúmina produce en células de túbulo proximal renal un tipo de estrés denominado estrés por retículo (ER). El ER desencadena la activación de las MAP quinasa (MAPKs) ERK1/2 y JNK1/2, las cuales tienen efectos sobre la supervivencia o la apoptosis de estas células frente a este tipo de injuria. Los estímulos que promueven la activación de las MAPKs inducen la expresión de diferentes miembros de la familia de MAPK fosfatasa (MKPs), enzimas que promueven la inactivación de estas quinasa. Dado que se desconoce el efecto de la sobrecarga de albúmina sobre la expresión de las MKPs 1 y 2 (MKP-1, MKP-2), el objetivo fue establecer si en células OK (*Opposum kidney*), una línea celular de túbulo proximal renal, el estrés por sobrecarga de albúmina induce MKP-1/2 y en que grado el nivel de MKP-1 promueve la inactivación de las MAPKs. Mediante Western blot, utilizando anticuerpos contra las formas fosforiladas de las MAPKs, comprobamos que la albúmina produce la activación de ERK1/2 y JNK1/2 en forma dependiente del tiempo y de la concentración. El análisis por Western blot reveló que la albúmina (20 mg/ml) promueve la acumulación de MKP-1 (2 veces respecto al control luego de 1 hora de estimulación). Efecto similar se observó sobre los niveles de MKP-2 luego de 2 horas de estimulación. En células transfectadas para la expresión transitoria de la proteína recombinante flag-MKP-1, el estímulo con albúmina aumentó los niveles de la proteína recombinante a partir de los 15 min de estimulación, determinados por Western blot. Además, la sobre-expresión de MKP-1 disminuyó la fosforilación de ERK1/2 promovida por albúmina. Concluimos que en células OK el ER produce un incremento en los niveles de MKP-1 y MKP-2. Respecto de MKP-1 el incremento involucraría eventos post-traduccionales, aunque no se descarta una acción a nivel transcripcional. La inducción de MKP-1 por albúmina contribuiría al "apagado" de la señal, por su acción -al menos- sobre ERK1/2.

**172. (695) PARTICIPACIÓN DE C/EBPBETA EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PEQUEÑOS ARNS TRANSCRITOS A PARTIR DEL ADN SATELITAL DURANTE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR**

Susperreguy S.<sup>1</sup>; Piwien-pilipuk G.<sup>2</sup>

Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET<sup>1,2</sup>  
susperreguy@fcq.unc.edu.ar

La diferenciación celular, proceso por el cual una célula adquiere un determinado fenotipo, implica la expresión coordinada de ciertos genes mientras el resto es silenciado. En mamíferos, la región centromérica de los cromosomas está constituido por arreglos de secuencias repetitivas en tándem de ADN (satélite mayor y menor) y son regiones de heterocomatina constitutiva, ambiente transcripcionalmente desfavorable. En estudios pre-

vios analizamos el perfil de expresión de los pequeños ARNs transcritos a partir de ADN satelital en diferentes sistemas de diferenciación celular (adipogénesis con preadipocitos 3T3-L1, miogénesis con mioblastos C2C12 y neurogénesis con células N2a derivadas de neuroblastoma) observando un incremento en la expresión de los mismos al inducirse la diferenciación. También demostramos que C/EBP $\beta$ , uno de los factores de transcripción requerido para la normal diferenciación adipocítica, se concentra en los cromocentros uniéndose a sitios consenso presentes en el ADN del satélite mayor colocalizando con la ARN-polimerasa II al inducir la diferenciación adipocítica. Por lo tanto, decidimos evaluar si C/EBP $\beta$  participa en la regulación de la expresión de los ARNs satelitales y si su localización pericentromérica es necesaria para que la diferenciación adipocítica progrese. En preadipocitos donde se interfirió establemente la expresión de C/EBP $\beta$  empleando shARN, datos preliminares muestran un cambio en el perfil de expresión del ARN satelital lo que se acompaña de incapacidad de la célula para diferenciarse en adipocitos. Estamos investigando si la ausencia de C/EBP $\beta$  afecta la localización pericentromérica de ARN-polimerasa II y de otras proteínas que median la formación de heterocromatina, y si la alta expresión de los pequeños transcritos satelitales se asocia al proceso de expansión clonal que tiene lugar durante las primeras 24hs de inducida la adipogénesis.

## PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR 1

### 173. (92) PARTICIPACIÓN DE PKC EN LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR POR PTH EN LAS CÉLULAS INTESTINALES CACO-2

Calvo N.<sup>1</sup>; Russo De Boland A.<sup>2</sup>; Gentili C.<sup>3</sup>  
Laboratorio de Química Biológica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur<sup>1,2,3</sup>  
ncalvo@criba.edu.ar

La hormona paratiroidea (PTH) es un importante mediador de la remodelación ósea y actúa como regulador esencial de la homeostasis del calcio. PTH también puede estimular o inhibir la proliferación celular y provocar alteraciones en la regulación del ciclo celular. En estudios previos demostramos que la hormona es pro-apoptótica y que además afecta la progresión del ciclo celular en las células intestinales Caco-2 incrementando el porcentaje de células en la fase G0/G1, aumentando la expresión de la proteína inhibitoria p27Kip1 y disminuyendo la expresión de las ciclinas D1 y D3 y de la quinasa Cdk6. El objetivo de este trabajo es profundizar el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el efecto anti-proliferativo de PTH en estas células intestinales. Para tal fin, las células Caco-2 fueron pre-incubadas con los inhibidores de la quinasa amino terminal de c-Jun (JNK) (SP600125, 20 mM), de la proteína fosfatasa 2A (PP2A) (ácido okadaico, 1 nM y caliculina A, 3 nM) o de la proteína quinasa C (PKC) (Ro-31-8220, 200 nM; BIM, 5  $\mu$ M y queleritrina, 2  $\mu$ M) y luego fueron tratadas con PTH (10-8 M, 6 horas), seguido de análisis por Western blot de los componentes del ciclo celular. La inhibición de la actividad de JNK y de PP2A no revirtió la respuesta hormonal, lo que sugiere que el efecto de PTH en la expresión de reguladores del ciclo es independiente de la vía de señalización de JNK y de PP2A. Sin embargo, los inhibidores de PKC revirtieron el aumento en la expresión de p27Kip1 y la disminución de los niveles proteicos de las ciclinas D1 y D3 y de la quinasa Cdk6 inducida por PTH. Estos resultados sugieren que en las células Caco-2, el efecto anti-proliferativo de PTH es mediado por cambios en la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular a través de la vía de señalización de PKC.

### 174. (98) EFECTOS DEL ANÁLOGO TUMORAL DE LA HORMONA PARATIROIDEA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON HUMANO

Martín M.<sup>1</sup>; Calvo N.<sup>2</sup>; Russo De Boland A.<sup>3</sup>; Gentili C.<sup>4</sup>  
Laboratorio de Química Biológica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur<sup>1,2,3,4</sup>  
ma.julia.martin@gmail.com

El análogo tumoral de la hormona paratiroidea (PTHrP) fue originalmente identificado como el agente causal de hipercalcemia humoral, uno de los síndromes más frecuentes paraneoplásicos, aunque actualmente se sabe que está ampliamente distribuido en el feto y en la mayoría de los tejidos adultos. Se ha observado que su expresión se correlaciona con la gravedad del carcinoma de colon y que en ciertas líneas celulares intestinales su sobreexpresión aumenta la proliferación celular. Sin embargo, hasta el presente se desconoce el rol de PTHrP en la línea celular Caco-2 derivada de adenocarcinoma de colon humano. En este trabajo se estudió si PTHrP induce la proliferación de las células Caco-2 y si regula la señalización de las MAP quinasas (ERK1/2, JNK1/2) relacionadas con eventos de proliferación celular. Se estimó el número de células viables en células Caco-2 expuestas al análogo (10-8 M, 3-5 días) mediante el ensayo de proliferación celular CellTiter-blue<sup>®</sup>. Se observó que PTHrP aumenta la bioreducción del reactivo resazurina respecto al control en forma dependiente del tiempo, siendo máxima la respuesta a los 5 días de tratamiento. Además, el análisis por Western blot revela que el tratamiento con PTHrP (1-48 horas) induce la fosforilación y activación de las quinasas ERK 1/2 y el aumento de los niveles proteicos de c-Myc, un factor de transcripción activado por señales mitogénicas que regula genes involucrados en la proliferación celular. Sin embargo no se detectaron cambios significativos en la fosforilación de las isoformas de JNK. Estos resultados sugieren que PTHrP incrementa la proliferación, promueve la activación de la vía ERK 1/2 y aumenta la expresión de c-Myc en las células intestinales Caco-2. La comprensión de los fenómenos biológicos generados por PTHrP permitirá conocer su participación en cascadas de transducción de señales que deriven en la proliferación de células intestinales.

### 175. (112) LA COMBINACIÓN DE PACLITAXEL CON CARBACOL PRODUCE UN EFECTO MUERTE-SOBREVIDA EN CÉLULAS MCF-7. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS.

Jacob G.<sup>1</sup>; Español A.<sup>2</sup>; Díez 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>  
guillermina\_j@hotmail.com

La resistencia a la quimioterapia es crítica en la terapéutica antitumoral, siendo la combinación de drogas antitumorales una posibilidad para mejorar su efecto individual. Demostramos que el agonista muscarínico carbacol (CARB) promueve la muerte de células tumorales de mama humana MCF-7. Este efecto se potencia al combinarlo con paclitaxel (PTX). En este trabajo investigamos las vías de señalización activadas en células MCF-7 tratadas con PTX (10-11M) + CARB (10-8M). PTX+CARB incrementaron la muerte de células MCF-7 en un 39 $\pm$ 2% (p<0,001 vs. basal) sin modificar la viabilidad de células normales de mama MCF-10A, medida por MTT. El efecto se redujo por el pretratamiento con: atropina (AT) (10-5M), antagonista muscarínico; NCDC (10-5M), inhibidor de fosfolipasa C (PLC) o L-NMMA (10-4M), inhibidor de las óxido nítrico sintasas (NOS) (p<0,001 vs. PTX+CARB) y se potenció con NOHA (10-4M) inhibidor de arginasas (Arg) o con MG-132 (2x10-5M) inhibidor de la vía del factor nuclear kB (NF-kB). En las células MCF-7 que sobreviven al tratamiento con CARB+PTX observamos un aumento del 42 $\pm$ 5% (p<0,01 vs. basal) en la actividad de NOS, medida como nivel de nitrito por el método de Griess. Este efecto se revirtió al preincubar las células con AT, NCDC o L-NMMA y se potenció con NOHA o MG-132. Comprobamos mediante ensayos colorimétricos que el tratamiento con PTX+CARB también incrementó la actividad de Arg, medida como nivel de urea, en un 26 $\pm$ 3% (p<0,01 vs. basal). Por Western blot, demostramos que PTX+CARB incrementaron la expresión de ambas isoformas de Arg (p<0,001 vs. basal), efecto que se revirtió en presencia de MG-132. Concluimos que la asociación PTX+CARB ejerce un efecto dual con participación de NF-kB: potencia la citotoxicidad sobre células tumorales de mama humana, pero en la fracción de células que sobreviven al tratamiento se observa un incremento en la actividad de NOS así como en la expresión y actividad de Arg, que las haría resistentes.

**176. (200) LA ENZIMA GLICEROL-3-FOSFATO ACILTRANSFERASA-2 (GPAT2) SE COMPORTA COMO UN ANTÍGENO "CÁNCER-TESTÍCULO" CORROBORÁNDOSE SU EXPRESIÓN EN CARCINOMAS INFILTRANTES DE MAMA CON UN ALTO GRADO HISTOLÓGICO.**

Pellon Maison M.<sup>1</sup>; Cattáneo E.<sup>2</sup>; García Fabiani M.<sup>3</sup>; Montanaro M.<sup>4</sup>; Rabassa M.<sup>5</sup>; Abba M.<sup>6</sup>; Gonzalez Baró M.<sup>7</sup>  
*INIBIOLP*<sup>1 2 3 4 7</sup>; *CINIBA*<sup>5 6</sup>  
 magalipellon@yahoo.com.ar

La síntesis de glicerolípidos comienza con la acilación del glicerol-3-fosfato, reacción catalizada por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT). GPAT2 es una isoforma que se expresa principalmente en células de la línea espermática y esterifica araquidonil-CoA en forma preferencial. Mediante análisis de transcriptomas se estableció que la expresión de GPAT2 disminuye en distintos modelos de diferenciación celular y que la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 expresa este gen. El análisis in silico de perfiles de expresión génica sugirió que GPAT2 podría llegar a expresarse en carcinomas infiltrantes de mama, y particularmente en aquellos tumores menos diferenciados. Estos hallazgos fueron validados mediante RT-PCR cuantitativa en diferentes líneas celulares de cáncer de mama (T47, MCF7, ZR75 y MDA-MB 231) y en muestras de tejido mamario normal y neoplásico. Sólo la línea celular MDA-MB 231 expresó GPAT2. En segundo lugar, se analizó la expresión de GPAT2 en el modelo de diferenciación celular de células 3T3-L1 a adipocito; GPAT2 disminuyó su expresión al avanzar el grado de diferenciación, sugiriendo un rol de esta enzima en la proliferación y/o supervivencia celular. Esta hipótesis se corroboró al sobreexpresar el gen en células HeLa, CHO-K1, Vero y HEK293, evidenciándose en todas ellas un aumento estadísticamente significativo en la viabilidad celular. Finalmente, se analizó la expresión proteica de GPAT2 mediante IHQ en un grupo independiente carcinomas infiltrantes de mama (n=35) y en muestras normales (n=6). GPAT2 no se detecta en tejidos normales, mientras que el 37% de los tumores expresa la proteína, existiendo una correlación estadísticamente significativa entre la expresión y el alto grado histológico (p=0,02), ya que el 90% de los tumores que expresan GPAT2 son de grado III. Los resultados indican que GPAT2 se comporta como un antígeno cáncer-testículo, y que su expresión en carcinomas de mama correlaciona con el grado de diferenciación celular.

**177. (250) EFECTOS ANTINEOPLÁSICOS DEL CALCITRIOL Y DL-BUTIONINA-S,R-SULFOXIMINA EN CÉLULAS CACO-2**

Liaudat A.<sup>1</sup>; Bohl L.<sup>2</sup>; Tolosa De Talamoni N.<sup>3</sup>; Maletto B.<sup>4</sup>; Pistoressi M.<sup>5</sup>; Picotto G.<sup>6</sup>  
 Lab Dr F Cañas de Bioq y Biol Mol, FCM, UNC<sup>1 2 3 6</sup>,  
 Departamento de Bioquímica Clínica, CIBICI (CONICET),  
 FCQ, UNC<sup>4 5</sup>  
 cliaudat@gmail.com

El calcitriol ha sido reconocido como un potente agente antiproliferativo y promotor de diferenciación celular. Por otro lado, se ha demostrado que D,L-butionina-S,R-sulfoximina (BSO), aumenta la sensibilidad de las células neoplásicas a los tratamientos. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del calcitriol y BSO sobre la proliferación de las células de cáncer de colon y evaluar los posibles mecanismos involucrados. Las células Caco-2, derivadas de adenocarcinoma de colon humano, se trataron con calcitriol (1-200 nM), BSO (2-500 µM) o con ambas drogas o su vehículo a diferentes tiempos. La proliferación celular se determinó por la técnica de violeta de cristal. La actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), fosfatasa alcalina (FAL) y los niveles de glutatión (GSH) se midieron por espectrofotometría. La externalización de fosfatidil serina, el potencial de membrana mitocondrial y el ciclo celular se evaluaron por citometría de flujo. La actividad de caspasa 3 se midió por ELISA. El análisis estadístico se realizó por ANOVA/Bonferroni. Los resultados demuestran que tanto calcitriol como BSO inhibieron la proliferación de las células Caco-2. El contenido total de GSH disminuyó a las 6 y 48 hs con BSO y con el tratamiento combinado. A las 96 hs la actividad de CAT y el potencial de membrana mitocondrial aumentaron sólo

con el tratamiento combinado mientras que la actividad de SOD no se modificó. La actividad de FAL aumentó en las células tratadas con calcitriol y con ambas drogas a las 96 hs. El ciclo celular no se alteró y no se registraron cambios en los parámetros evaluados para la apoptosis. En conclusión, BSO incrementa el efecto antiproliferativo del calcitriol sobre las células Caco-2 mediante aumento del estrés oxidativo. La muerte celular por apoptosis no estaría involucrada. El incremento de FAL sugiere una inducción de la diferenciación celular.

**178. (251) HOMOLOGÍA FUNCIONAL ENTRE PROTEÍNAS MAGE HUMANAS Y MURINAS**

Ladelfa M.<sup>1</sup>; Peche L.<sup>2</sup>; Cangelosi R.<sup>3</sup>; Schnieder C.<sup>4</sup>; Monte M.<sup>5</sup>  
 Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Dpto de Química Biológica, FCEN-UBA<sup>1 3 5</sup>; Laboratorio Nazionale CIB, Ara Science Park, Trieste, Italia<sup>2 4</sup>  
 fladelfa@qb.fcen.uba.ar

La subfamilia de genes MAGE-I está compuesta por los grupos A, B y C, que presentan expresión específica tumoral y alta homología de secuencia. Debido a esto, se infiere que las funciones de las proteínas MAGE son redundantes. Solo en los últimos años nosotros y otros grupos hemos comenzado demostrar funciones específicas de diferentes proteínas MAGE, generalmente asociadas a vías de señalización de sobrevida o antiapoptóticas. La utilización de modelos murinos para el estudio de la biología tumoral in vivo es una herramienta ampliamente utilizada. Para ello, resulta importante estudiar si las proteínas MAGE murinas son funcionalmente homólogas a sus contrapartes humanas ya que la homología de secuencia entre ellas es menor a la esperada. En este contexto, nos propusimos comparar las proteínas Mage-b2 murina y Mage-B2 humana, focalizándonos en su localización celular y en sus efectos en la modulación de las vías de señalización de p53 y pRB, por ser éstas vías importantes asociadas al cáncer. Nuestros resultados indican que, al igual que la proteína Mage-B2 humana, Mage-b2 murina presenta localización nucleolar y relocaliza del nucléolo al núcleo y citoplasma frente a estrés ribotóxico y a estímulos proapoptóticos. Además, observamos que Mage-b2 murino inhibe la actividad transcripcional de p53, tal como ocurre con algunas proteínas MAGE-A humanas y en contraposición con lo observado para la proteína Mage-B2 humana. Por otra parte, y a diferencia de lo observado para la proteína Mage-B2 humana, Mage-b2 murina no mostró efectos sobre la vía de pRB. En conjunto, estos resultados indican que, si bien las proteínas Mage-B2 humana y Mage-b2 murina presentan la misma localización subcelular, podrían tener efectos diferentes sobre las vías de señalización de p53 y pRB. Esta información, sumada al estudio de otras proteínas MAGE murinas, será de gran utilidad al momento de construir modelos animales para evaluar in vivo las proteínas MAGE humanas.

**179. (268) LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK ESTÁN INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA APOPTÓTICA INDUCIDA POR LA 2'-NITROFLAVONA EN CÉLULAS DE LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA**

Cárdenas M.<sup>1</sup>; Blank V.<sup>2</sup>; Marder M.<sup>3</sup>; Roguin L.<sup>4</sup>  
 IQUIFIB, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
 cardenasmariano@gmail.com

En trabajos previos demostramos el efecto antitumoral de la 2'-nitroflavona (2'-NF) en líneas de leucemias humanas. También comprobamos que este compuesto induce arresto del ciclo celular y apoptosis en una línea de células de leucemia promielocítica aguda (HL-60). Con el propósito de evaluar la participación de las cascadas de señalización de MAPK en el mecanismo de acción de la 2'-NF, analizamos el efecto de este compuesto sobre las vías de p38, JNK y ERK 1/2 en células HL-60. Luego de incubar las células con el flavonoide observamos un incremento en la fosforilación de JNK y p38 MAPK de 7,0±0,9 y 1,4±0,1 veces, respectivamente, y una disminución de ≈ 50% en la fosforilación de ERK 1/2. El rol de cada una de estas quinasas en la respuesta apoptótica inducida por la 2'-NF se determinó mediante el empleo de inhibidores

farmacológicos de JNK (SP600125, SP), p38 (SB203580, SB) y ERK 1/2 (PD98059, PD). La incubación de las células en presencia del flavonoide y SP produjo un incremento del crecimiento celular de  $57 \pm 4\%$  (2'-NF) a  $76 \pm 4\%$ , y una disminución de la población de células con ADN hipodiploide de  $27 \pm 4\%$  (2'-NF) a  $13 \pm 1\%$ . No se observaron cambios significativos en la proliferación y en el porcentaje de células hipodiploides con la combinación de 2'-NF y SB. Cuando las células se incubaron con 2'-NF y PD incrementó un 20% la actividad antimitogénica de la 2'-NF y alrededor de un 50% la cantidad de células en sub G1 ( $27 \pm 4\%$  2'-NF vs.  $42 \pm 2\%$  2'-NF+PD). Por otro lado, ensayos preliminares de citometría de flujo indicaron que el arresto de ciclo celular en G2/M inducido por la 2'-NF se modifica en presencia de SB a expensas de un incremento del porcentaje de células en la fase S y una disminución en G2/M. En conclusión, los resultados obtenidos indican que tanto la fosforilación de JNK como la inhibición de la vía ERK 1/2 estarían involucradas en la respuesta apoptótica inducida por el flavonoide en las células HL-60, mientras que la activación de la vía p38 podría participar en el arresto del ciclo celular.

#### 180. (286) PARTICIPACIÓN DE DIFERENTES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN EL EFECTO APOPTÓTICO INDUCIDO POR UN PÉPTIDO CÍCLICO DEL INTERFERÓN ALFA

Blank V.<sup>1</sup>; Bertucci L.<sup>2</sup>; Peña C.<sup>3</sup>; Roguin L.<sup>4</sup>

IQUIFIB, FFyB, UBA<sup>1,2,3,4</sup>

vivianablank@yahoo.com.ar

En nuestro laboratorio sintetizamos un péptido cíclico que contiene secuencias del interferón alfa2b involucradas en la interacción de la citoquina con el receptor. Dicho péptido posee actividad antiproliferativa e induce una respuesta apoptótica. Puesto que previamente demostramos que el péptido activa la vía Jak/STAT, el propósito del presente trabajo fue determinar si esta vía u otras cascadas de transducción son responsables de mediar la actividad antitumoral inducida por el péptido en una línea de carcinoma de cuello de útero. Cuando se estudió el efecto del péptido sobre la activación de las MAPKs observamos fosforilación de p38MAPK ( $1.7 \pm 0.1$ ) a partir de los 15 min de incubación, sin modificación de JNK o ERK1/2. Asimismo, cuando investigamos la posible participación de la vía PI3K/Akt comprobamos que los niveles de fosfoserina-Akt aumentaron  $1.9 \pm 0.2$  veces luego de 30 min de incubación. El rol de las distintas cascadas de transducción en las acciones biológicas activadas por el péptido se determinó bloqueando estas vías con siRNA (para STATs) o con inhibidores farmacológicos (para p38MAPK y PI3K). Cuando las células se transfectaron con siRNA para STAT1 o STAT3, el efecto antiproliferativo del péptido disminuyó significativamente y el porcentaje de células hipodiploides se redujo de  $28 \pm 4\%$  a  $20 \pm 1\%$  o a  $20 \pm 2\%$  para STAT1 y STAT3, respectivamente. Asimismo, cuando se utilizó SB203580 como inhibidor de p38MAPK, o Ly294002 como inhibidor de PI3K, se observó un descenso de la actividad antiproliferativa del péptido, y una reducción de la población de células hipodiploides (de  $32 \pm 4\%$  en presencia de péptido a  $20 \pm 5\%$  con péptido y SB203580, o a  $17 \pm 2\%$  con péptido y Ly294002). En conclusión, los resultados obtenidos indican que no sólo la vía clásica Jak/STAT sino también p38MAPK y PI3K serían responsables de la acción antitumoral del péptido cíclico. Notoriamente, PI3K, una vía generalmente relacionada con procesos de supervivencia y proliferación, es activada por el péptido cíclico para favorecer la inducción de una respuesta apoptótica.

#### 181. (287) ROL DE AKAP350 EN EL MANTENIMIENTO DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS HEPÁTICAS.

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

IFISE, CONICET-UNR<sup>1,2,3,4</sup>

mattaloni@ifise-conicet.gov.ar

AKAP350 (A350) es una proteína de anclaje de quinasas A que nuclea complejos proteicos en centrosomas y aparato de Golgi. En estudios previos reportamos que A350 participa en la diferenciación de las células hepáticas HepG2 en células polarizadas. Nuestro objetivo fue analizar si A350 interviene en la regulación

del ciclo celular en estas células. Metodología: Generamos células HepG2 con 60-80% de disminución en la expresión de A350 (A350KD) por RNA de interferencia y con delocalización centrosomal de A350 por transfección con un plásmido que codifica su dominio de localización centrosomal (PACT). Analizamos la distribución de las células en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular por citometría de flujo, la morfología centrosomal y nuclear por microscopía confocal y los niveles de ciclinas D1, E y A350 por western blot. Resultados: El "knock down" de A350 indujo aumento de eventos en G1 (Tabla 1) y en los niveles de ciclina D1 ( $+37\%$ ) y E ( $+76\%$ ), sugiriendo entrada en ciclo celular con arresto en G1, mientras que la expresión del PACT indujo disminución de eventos en G1 con aumento en S (Tabla 1), disminución de ciclina D1 ( $-59\%$ ) y E ( $-58\%$ ), y aumento de células binucleadas y alteraciones en la morfología centrosomal coherente con estos cambios (Tabla 2). Conclusión: el desplazamiento de A350 centrosomal induce alteraciones centrosomales, generando efectos sobre el ciclo celular diferenciales respecto al "knock down" de A350. Estos datos apoyan la hipótesis de que, a través de la nucleación selectiva de complejos proteicos en centrosomas y Golgi, A350 participaría en la coordinación de los procesos de diferenciación y progresión del ciclo celular en células hepáticas.

	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
control	$44 \pm 7$	$45 \pm 8$	$11 \pm 4$
A350KD	$58 \pm 7^*$	$36 \pm 8$	$6 \pm 4$
control	$72 \pm 1$	$18 \pm 1$	$10 \pm 1$
PACT	$64 \pm 2^*$	$26 \pm 2^*$	$11 \pm 1$

	Celulas binucleadas (%)	1 centrosoma	2 juntos	2 separados	mas de 2
control	$2 \pm 1$	$29 \pm 4$	$58 \pm 6$	$13 \pm 3$	$1 \pm 1$
PACT	$7 \pm 2^*$	$9 \pm 2^*$	$64 \pm 3$	$19 \pm 3$	$11 \pm 4^*$

\* $p < 0,05$

#### 182. (336) CONTROL DE LA APOPTOSIS POR GLUCOCORTICOIDES EN CÉLULAS DE EPITELIO MAMARIO HC11 DIFERENCIADAS. RELEVANCIA DE LA EXPRESIÓN DE P21CIP1

Stortz M.<sup>1</sup>; Rocha-viegas L.<sup>2</sup>; Presman D.<sup>3</sup>; Pecci A.<sup>4</sup>

Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1</sup>; Departamento FBMC, FCEN, UBA, IFIBYNE-Conicet<sup>2,3</sup>; Departamento Química Biológica, FCEN, UBA, IFIBYNE-Conicet<sup>4</sup> martinstortz@gmail.com

Los glucocorticoides (GC) retardan la apoptosis en glándula mamaria post-lactancia mediante el control de la expresión de genes como p21CIP1 (p21) y bcl-X. Los GC inducen la expresión de la isoforma antiapoptótica Bcl-XL independientemente del grado de diferenciación del epitelio mamario. Sin embargo, inducen a p21 en células proliferando (preñez) y lo reprimen en células diferenciadas (lactancia). La represión de p21 correlaciona con la prevención de la apoptosis que ejercen los GC en la involución mamaria post-lactancia. Diversos estudios asociaron un cambio en la localización subcelular de p21 con su papel en la apoptosis en otros tipos celulares. El objetivo de este trabajo fue determinar el perfil de expresión de p21, compararlo con el de Bcl-XL y analizar la relevancia de p21 en el control de la apoptosis por GC. Se utilizó la línea celular de epitelio mamario murino HC11 y se analizó la expresión de p21 y bcl-XL por RT-qPCR. Mediante el uso de la línea estable HC11-p21, que expresa la proteína de fusión p21-GFP de manera inducible se estudió la localización subcelular de p21 a lo largo de la diferenciación y su funcionalidad en la prevención de la apoptosis por GCs. En células diferenciadas inducidas a apoptosis por remoción de hormonas lactogénicas, la dexametasona (DEX) produce un aumento significativo en los niveles de ARNm de bcl-XL, correlacionando éste con la represión de p21 y con un descenso de la actividad de Caspasa-3. La sobreexpresión de p21 inhibe la prevención de la apoptosis que ejerce DEX en células diferenciadas; sin embargo por se, no afecta la actividad de Caspasa-3 (control: 1; DEX:  $0.6 \pm 0.2$ ; p21:  $0.8 \pm 0.1$ ; p21+DEX:

0.9±0.2). Por microscopía confocal se observó que la distribución subcelular de p21-GFP (preferentemente nuclear) no cambia con la diferenciación ni con el tratamiento hormonal. Se concluye que la represión de p21 sería necesaria para el efecto antiapoptótico de los GC en células epiteliales mamarias diferenciadas.

**183. (458) MARCADOR ARSENICAL FLUORESCENTE PARA DETECCIÓN DE POBLACIONES APOPTÓTICAS EN CÉLULAS DE LEUCEMIA**

Femia L.<sup>1</sup>; Temprana C.<sup>2</sup>; Grasselli M.<sup>3</sup>; Alonso S.<sup>4</sup>  
*Universidad Nacional de Quilmes*<sup>1 2 3 4</sup>  
*lismemia1@hotmail.com*

Los compuestos de arsénico han demostrado utilidad médica, ya que probaron ser eficaces en la remisión completa de la leucemia promielocítica aguda. Si bien se ha informado que el efecto terapéutico se debe a la inducción de la apoptosis a través de la generación de radicales libres de oxígeno, el mecanismo involucrado en esta respuesta, no se conoce ni tampoco los posibles objetivos de estos compuestos in vivo. Por lo tanto, entender más sobre el modo de acción de arsénico en los sistemas biológicos es esencial y nuevas metodologías son necesarias para lograrlo. En este trabajo se describe la aplicación de un compuesto de arsénico marcado fluorescentemente, para ser utilizado con técnicas de fluorescencia en investigación básica y aplicada, centrado en estudios de apoptosis inducida por arsénico. El compuesto está formado por una molécula de ácido arsanílico unido covalentemente a una molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC). Fue previamente sintetizado químicamente y caracterizado por fluorescencia, espectrometría UV-Vis, de masas y FTIR. En este trabajo se evalúa su actividad apoptótica en comparación a trióxido de arsénico, una droga actualmente aceptada para el tratamiento de leucemia, así como sus propiedades fluorescentes en la línea celular HL60, un modelo de células de leucemia, mediante citometría de flujo. El compuesto resultó ser útil en la inducción de apoptosis en el modelo de leucemia elegido. El marcado fluorescente de las poblaciones celulares fue de tal manera que los mayores porcentajes de apoptosis correspondieron a la más alta fluorescencia FITC, que se correlaciona a la cantidad más alta de arsénico.

**184. (480) EFECTO DEL 2-iodoHEXADECANAL SOBRE LA REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO Y LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA EN UNA LÍNEA DE TIROIDES NORMAL.**

Thomasz L.<sup>1</sup>; Rossich L.<sup>2</sup>; Oglio R.<sup>3</sup>; Salvarredi L.<sup>4</sup>; Pisarev M.<sup>5</sup>; Juvenal G.<sup>6</sup>  
*Comisión Nacional de Energía Atómica*<sup>1 2 3 4</sup>; *Comisión Nacional de Energía Atómica, Facultad de Medicina, UBA, CONICET*<sup>5</sup>; *Comisión Nacional de Energía Atómica, CONICET*<sup>6</sup>  
*thomasz@cnea.gov.ar*

Introducción: El yodo es utilizado por la glándula tiroidea para sintetizar hormonas tiroideas pero además cumple un rol regulador a través de la síntesis de lípidos iodados. De ellos se han identificado y caracterizado dos: la 6-iodo-11,14-eicosatrienoico- $\delta$ -lactona (IL- $\delta$ ) y el 2-iodo-hexadecanal (2-IHDA) que inhiben varios parámetros tiroideos. Objetivo: Investigar el efecto del 2-IHDA sobre el crecimiento y la muerte celular programada en la línea de tiroides normal FRTL-5. Metodología y Resultados: Las células FRTL-5 fueron tratadas con concentraciones crecientes de 2-IHDA o KI en presencia de TSH. El 2-IHDA inhibió la proliferación celular en forma dosis y tiempo dependiente. El 2-IHDA produjo una inhibición del 30 % ( $p < 0,05$ ), 45 % ( $p < 0,01$ ) y 65 % ( $p < 0,001$ ) a 33  $\mu$ M luego de 24, 48 y 72 h de tratamiento. A 10  $\mu$ M la inhibición fue del 31 % ( $p < 0,05$ ) y 35 % ( $p < 0,01$ ) luego de 48 y 72 h respectivamente. Mientras que el ioduro de potasio inhibió la proliferación celular únicamente a 33  $\mu$ M luego de 72 h de tratamiento. El análisis del ciclo celular mostró que el 2-IHDA produjo un aumento del número de células en G1 (TSH G1: 54,5%, 2-IHDA 33  $\mu$ M G1: 65,3%, 2-IHDA 10  $\mu$ M G1: 63%,  $p < 0,01$ ) y al analizar la expresión de p21 y p27 por inmunocito-

química observamos la translocación de estas proteínas al núcleo ( $p < 0,01$ ). El tratamiento con 2-IHDA produjo una disminución de la actividad de catalasa (UE/mg proteína): TSH: 0,21, 2-IHDA 33  $\mu$ M: 0,14, ( $p < 0,01$ ), 2-IHDA 10  $\mu$ M: 0,17, ( $p < 0,01$ ) y de los ROS (20 %  $p < 0,01$ ) cuantificado con la sonda fluorescente DCFH-DA. Al analizar la expresión del complejo AP-1 se observó que la expresión de c-jun cayó a partir de la primer hora de tratamiento ( $p < 0,01$ ). El 2-IHDA produjo un incremento en la actividad de caspasa-3 y de la expresión de Bax luego de 6 h de tratamiento ( $p < 0,01$ ). Conclusiones: El 2-IHDA inhibe la proliferación celular e induce la muerte por apoptosis.

**185. (512) EVALUACIÓN DE LA PROTECCIÓN EJERCIDA POR FERREDOXINA REDUCTASA DE PISUM SATIVUM ANTE LA INJURIA PROVOCADA POR HIPOTERMIA Y AUMENTO DE HIERRO INTRACELULAR QUELABLE EN CÉLULAS RENALES COS-7.**

Pucci Molineris M.<sup>1</sup>; Mamprin M.<sup>2</sup>; Mediavilla M.<sup>3</sup>  
*Centro Binacional de Criobiología Clínica y Aplicada CAIC*<sup>1</sup>  
*Centro Binacional de Criobiología Clínica y Aplicada CAIC, Farmacología, Fac. Cs. Bioq. y Farm. UNR*<sup>2</sup>  
*melipucci@hotmail.com*

La injuria por hipotermia es mediada por un aumento de hierro (Fe) intracelular quelable, al menos en parte. Previamente hemos mostrado que la enzima Ferredoxina Reductasa (FNR) de arveja es capaz de prevenir el daño ocasionado por insultos oxidativos en hepatocitos y células Cos-7 (isquemia/reperfusión y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente). Se ha visto, en bacterias y plantas, que FNR protege del daño oxidativo mediado por OH<sup>-</sup> producido por aumento del Fe intracelular. Nos propusimos estudiar si FNR es capaz de proteger a Cos-7 del daño producido por Fe y frío. Para ello, Cos-7 que expresan FNR y sus controles (transfectadas con el plásmido vacío) fueron sometidas a incubaciones (4 y 24h) en hipotermia (4°C, solución de preservación tipo Viaspan®, 5% CO<sub>2</sub>) o con Fe (37°C, Fe:hidroxiquinolina 5  $\mu$ M: 10  $\mu$ M, DMEM/SFB, 5% CO<sub>2</sub>). Se estudiaron viabilidad (reducción de MTT; liberación de LDH) y producción de radicales O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Los resultados fueron:

Tratamiento	Ensayo	Viab. controles (%)	Viab. Cos-7/FNR (%)
Sol. pres 24h	MTT	71,28 ± 12,14	72,49 ± 4,24
Fe 4h	MTT	69,33 ± 9,2	71,74 ± 2,2
Fe 24h	LDH	57,47 ± 5,5	54,88 ± 7,0

A 4h de incubación en frío no se observó reducción significativa de viabilidad (MTT: cont 108,2 ± 20,3 % y Cos-/FNR 108,21 ± 15,8 %; n=3). No se observó aumento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en ninguna condición. En conclusión, FNR no protege del daño por hipotermia o aumento del Fe intracelular. Es probable que el mecanismo de protección de FNR en Cos-7 observado anteriormente para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no involucre cambios en la homeostasis del Fe como sucede en bacterias y plantas.

**186. (530) EL HEXACLOROBENCENO INDUCE APOPTOSIS A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN SOSTENIDA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE ERK1/2 Y LA GENERACIÓN DE ROS**

Chiappini F.<sup>1</sup>; Pontillo C.<sup>2</sup>; De Tomaso Portaz A.<sup>3</sup>; Alvarez L.<sup>4</sup>; Randi A.<sup>5</sup>; Kleiman De Pisarev D.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
*florenciachappini@hotmail.com*

El hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante ambiental deletéreo para la salud humana, e inductor de disfunciones endocrinas, inmunológicas y cáncer en animales. Demostramos previamente que el HCB, induce la expresión de TGF- $\beta$ 1 y apoptosis en células tiroideas de rata FRTL-5. Objetivos: Estudiar el efecto del HCB sobre el estado oxidativo celular, y el rol de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de las MAPKs en la inducción de apoptosis en células FRTL-5. Se realizaron ensayos en función del tiempo (2, 6, 8, 24 y 48h) con HCB 5

$\mu\text{M}$  y dosis (HCB: 0,005; 0,05; 0,5 y 5  $\mu\text{M}$ ) a las 8h. Resultados: a) los niveles de ERK1/2-P [Western blot (WB)] aumentaron en función de la dosis y tiempo de tratamiento con un pico a las 8h (208%,  $p<0.05$ ); b) los niveles de JNK-P (WB) aumentaron 60 y 80% a las 6 y 8h, respectivamente ( $p<0.05$ ), retornando a valores control (C) a las 24h; c) los niveles de p38-P (WB) no se modificaron entre las 2 y 48h; se observó un aumento a los 15 min (104%  $p<0.01$ ); d) el pre-tratamiento con PD98059, un inhibidor específico de MEK1 llevó la viabilidad celular (ensayo de MTT) a niveles C a las 24h; e) el pre-tratamiento con SP-600125, inhibidor específico de JNK, no revirtió la pérdida de viabilidad celular; f) la expresión de la enzima catalasa (RT-PCR) aumentó a partir de las 8h (150%  $p<0.001$ ) hasta las 24h. La expresión de enzima Cu-ZnSOD (RT-PCR) disminuyó a las 2 y 6h (64% y 30%  $p<0.01$ , respectivamente) y aumentó a las 24h (115%  $p<0.001$ ) de tratamiento; g) los niveles intracelulares de ROS, determinados por fluorescencia (DCF-DA), aumentaron a las 4h, con HCB 0,5 y 5  $\mu\text{M}$  (750 y 685% respectivamente); h) el pre-tratamiento con el antioxidante TROLOX, revirtió la pérdida de la viabilidad celular. Conclusión: El HCB induce la pérdida del balance entre el crecimiento y la muerte celular en células FRTL-5. La inducción de apoptosis ocurre por mecanismos que involucran la generación de ROS, y la activación sostenida de ERK1/2.

#### 187. (675) REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES MAGE-A

Toledo M.<sup>1</sup>; Peche L.<sup>2</sup>; Monte M.<sup>3</sup>

Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1,3</sup>; Laboratorio Nazionale CIB, Ara Science Park, Trieste, Italia<sup>2</sup>  
mftoledo@qb.fcen.uba.ar

La mayoría de las células tumorales poseen aumentada actividad del factor de transcripción E2F1. Según el contexto de las células, E2F1 puede inducir proliferación o apoptosis vía la inducción de p53. Algunos miembros Mage-A son capaces de inhibir la actividad de p53 y podrían ser inducidos durante la proliferación celular. Por ello hemos buscado sitios de unión para factores de transcripción potencialmente oncogénicos, y encontramos en el promotor de Mage-A6 potenciales sitios para: c-myc y E2F1. Mientras c-myc es un potente inductor de la proliferación en células tumorales, E2F1 es capaz de regular transcripcionalmente genes pro-proliferativos como c-myc, y pro-apoptóticos como p14ARF. Para estudiar la especificidad en la regulación transcripcional de Mage-A6 hemos clonado, en el vector pGL3-LUC/basic, la región del promotor donde se identificaron los sitios consenso para estos factores. Nuestros resultados indican que E2F1 no activa al promotor de Mage-A6 directamente, pero podría hacerlo vía c-myc que sí mostró inducción en la actividad de este promotor. Por otra parte, observamos que la expresión de p14ARF, fue capaz de relocalizar distintas proteínas Mage-A a los nucléolos, bloqueando así la actividad de estas proteínas tumorales de inhibir a p53. De esta manera, la hiperactividad de E2F1 en las células tumorales, podría inducir la expresión de las proteínas Mage-A a través de c-myc y éstas inhibir la actividad de p53. En el caso que las células fueran p14ARF positivas, E2F1 podría inducir su expresión y éste anular la actividad de las proteínas Mage-A y gatillar la apoptosis mediante p53.

#### 188. (711) ACCIÓN DEL CLORPIRIFOS SOBRE EL DESARROLLO DEL TEJIDO MAMARIO.

Miret N.<sup>1</sup>; Ventura C.<sup>2</sup>; Randi A.<sup>3</sup>; Mohamad N.<sup>4</sup>; Croci M.<sup>5</sup>; Venturino A.<sup>6</sup>; Rivera E.<sup>7</sup>; Cocca C.<sup>8</sup>; Núñez M.<sup>9</sup>  
Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA<sup>1,2,4,7,8,9</sup>; Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>; Instituto de Inmunooncología "Dr. EJV Crescenti"<sup>5</sup>; LIBIQUIMA, CONICET<sup>6</sup>  
lafaca\_nm@hotmail.com

El Clorpirifos (CPF) es un insecticida organofosforado utilizado para el control de insectos que se caracteriza por presentar

citotoxicidad debida a la inhibición irreversible de la enzima acetilcolinesterasa. Sin embargo, no todos los efectos sobre la salud pueden explicarse a través de esa acción. Muchos pesticidas han manifestado efectos estrogénicos en diferentes modelos experimentales, pudiendo incidir en el riesgo de padecer cáncer de mama. Objetivo: evaluar si el CPF es capaz de modificar el desarrollo del tejido mamario de ratas en dosis que afecten o no la actividad de la enzima colinesterasa. Metodología: los animales se dividieron en tres grupos a los cuales se les administró por v.o.: CPF 0,01 mg/Kg/día, CPF 1 mg/Kg/día o vehículo. La actividad de la enzima butirilcolinesterasa (BChE) se cuantificó en el plasma de los animales. Se estudiaron las características histológicas del tejido mamario evaluando el número y el tamaño de ductos. La proliferación celular se cuantificó a través del número de mitosis y de células PCNA positivas. Se realizó el estudio histológico del tejido hepático y se valoraron los pesos de los animales y sus hígados. Resultados: la dosis de 1mg/kg/día disminuyó la actividad de la enzima BChE ( $p<0,001$ ) mientras no se observó variación utilizando la dosis 0,01 mg/Kg/día. Para ambas dosis de CPF en el estudio histológico se observan mamas con lobulillos hiperplásicos, junto con signos de diferenciación como secreción intralobulillar. Se registró un incremento del número de mitosis así como también del número de células PCNA positivas ( $p<0,05$ ). El estudio de los hígados mostró focos hemorrágicos, congestivos, necróticos; sin embargo, no se hallaron variaciones significativas en sus pesos, ni en el peso de los animales tratados con CPF. Conclusión: Hemos observado que la exposición al tóxico induce un incremento de la proliferación del tejido mamario aún cuando la actividad colinesterasa no se ve afectada.

#### 189. (712) EFECTO DEL CLORPIRIFOS SOBRE EL CICLO CELULAR Y EL BALANCE REDOX EN LAS LÍNEAS MCF-7 Y MDA-MB-231.

Ventura C.<sup>1</sup>; Núñez M.<sup>2</sup>; Miret N.<sup>3</sup>; Martinel Lamas D.<sup>4</sup>; Randi A.<sup>5</sup>; Venturino A.<sup>6</sup>; Rivera E.<sup>7</sup>; Cocca C.<sup>8</sup>  
Laboratorio de Radioisótopos, Cátedra de Física, Departamento de Físicomatemática, FFyB, UBA<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>  
cventura@ffyb.uba.ar

El Clorpirifos (CPF) es un insecticida organofosforado utilizado para el control de plagas e insectos. Dada la importancia del estudio de los contaminantes ambientales como factores que inciden en el riesgo de padecer cáncer de mama, nuestro objetivo fue evaluar el efecto del CPF sobre el crecimiento y el estado redox en dos líneas celulares derivadas de carcinomas mamarios humanos, una dependiente (MCF-7) y la otra independiente (MDA-MB-231) de estrógenos para su crecimiento. Se utilizaron concentraciones de CPF entre 5.10<sup>-2</sup> y 50  $\mu\text{M}$ . La proliferación celular se evaluó mediante recuento clonogénico e incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU). El tiempo de duplicación fue evaluado por recuento celular a diferentes tiempos. El contenido de especies reactivas del oxígeno (ROS), las fases del ciclo celular y la apoptosis se analizaron por citometría de flujo utilizando las sondas DCF-2DA, yoduro de propidio y anexina V respectivamente. Altas concentraciones de CPF (50  $\mu\text{M}$ ) disminuyeron la capacidad clonogénica en ambas líneas celulares (40% en MCF-7, 15% en MDA-MB-231,  $p<0,01$ ), incrementaron un 20% el tiempo de duplicación ( $p<0,001$ ) y aumentaron el porcentaje de células en la fase S del ciclo (42% en MCF-7, 27% en MDA-MB-231,  $p<0,001$ ). Estas modificaciones fueron acompañadas por un aumento en el contenido de ROS (32% en MCF-7, 108% en MDA-MB-231,  $p<0,001$ ) y en el porcentaje de células apoptóticas ( $p<0,05$ ). Por otra parte, el CPF 5.10<sup>-2</sup>  $\mu\text{M}$  incrementa la incorporación de BrdU en la línea celular MCF-7 ( $p<0,05$ ) y se acompañó de un incremento del 36% en la fosforilación del receptor estrogénico alfa ( $p<0,01$ ). No se observaron modificaciones en la incorporación de BrdU en la línea MDA-MB-231. En conclusión, altas dosis de CPF disminuyen el crecimiento celular en las dos líneas utilizadas, mientras que bajas concentraciones inducen la proliferación de la línea MCF-7, la cual puede relacionarse con una acción estrogénica del tóxico sobre este tipo celular.

## NEUROCIENCIAS 2

**190. (477) ACTIVIDAD DE LA OXIDO NITRICO SINTASA EN EL MUSCULO CILIAR DEL CERDO**

Benozzi G.<sup>1</sup>; Benozzi J.<sup>2</sup>; Reina S.<sup>3</sup>; Borda E.<sup>4</sup>; Orman B.<sup>5</sup>  
*Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*betinaorman@yahoo.com.ar*

El músculo ciliar (MC) es un músculo liso en forma de anillo cuya contracción al provocar un cambio de forma y ubicación del cristalino, permite la acomodación, dando lugar al correcto enfoque de la imagen en la retina. En este trabajo nosotros evaluamos la actividad de la óxido nítrico sintasa (ONS) del MC del cerdo en presencia y en ausencia de un agonista colinérgico y sus antagonistas. Mediante la cuantificación de 14C-citrulina valoramos el efecto de la pilocarpina y los antagonistas colinérgicos de diferentes subtipos (M1, M2, M3 y M4) sobre la producción de óxido nítrico (ON). Se observó que el agonista muscarínico a concentraciones crecientes (desde 1 x 10<sup>-10</sup> a 1 x 10<sup>-6</sup> M) incrementa la producción de ON dependiente de la dosis, alcanzando un efecto máximo a 1 x 10<sup>-7</sup> M de 89.9% ± 8 (n=8). Por otro lado, este efecto fue inhibido en presencia de 1 x 10<sup>-6</sup> M atropina y por 8 x 10<sup>-4</sup> M L-NMMA, un inhibidor de sustrato de la ONS (basal: 163 cpm/mg de tejido húmedo ± 15, n=5; L-NMMA: 146 cpm/mg de tejido húmedo ± 14, n=5). Asimismo, los ensayos con los antagonistas colinérgicos muscarínicos específicos de los diferentes subtipos a saber: M1 (1 x 10<sup>-6</sup> M pirenzepina), M2 (1 x 10<sup>-6</sup> M AF-DX 116), M3 (4.5 x 10<sup>-9</sup> M J104129) y M4 (1 x 10<sup>-6</sup> M tropicamida) mostraron que la producción de ON por pilocarpina está mediada por los subtipos M1 y M3 y no participan los subtipos M2 y M4. Conclusión: Estos resultados sugieren una participación del sistema nervioso autónomo parasimpático en la contracción del MC. Por otro lado, señalan también la participación de la pilocarpina como estimulador de la actividad de la ONS a través de la unión y activación de los receptores muscarínicos colinérgicos del subtipo M1 y M3 en el MC del cerdo.

**191. (503) LA RETRACCIÓN REVERSIBLE DE PROCESOS EN OLIGODENDROCITOS INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO NO-LETAL ESTÁ MEDIADA POR LA FOSFORILACIÓN DE CRMP-2 EN UN SITIO SUSTRATO DE RHO-QUINASA**

Fernandez Gamba A.<sup>1</sup>; Leal M.<sup>2</sup>; De Tullio M.<sup>3</sup>; Roher A.<sup>4</sup>; Morelli L.<sup>5</sup>; Castaño E.<sup>6</sup>  
*Fundación Instituto Leloir<sup>1 2 3 5 6</sup>; Sun Health Research Institute (USA)<sup>4</sup>*  
*afernandezg@leloir.org.ar*

Los oligodendrocitos (OLG) forman la vaina de mielina en axones, proceso esencial para la integridad neuronal. El estrés oxidativo agudo podría causar una mielinización inadecuada y por ende, una disfunción neuronal. Objetivos: 1) Caracterizar el efecto de la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la extensión de procesos de OLG primarios y de la línea OLN-93. 2) Analizar el proteoma de OLG en condiciones de estrés oxidativo agudo. Metodología: Exposición a ácido 3-nitropropiónico (3-NP), detección de ROS por diacetato de 2'7-diclorofluoresceína, viabilidad celular, microscopía confocal y análisis de imágenes. Proteómica por 2D-DIGE, digestión triptica y espectrometría de masa. Caracterización de fosforilación por Western blot. Inhibición farmacológica de quinasas. Transfección de OLN-93 con mutante de CRMP-2. Resultados: El tratamiento con 3NP (1 mM/1h) 1) no afectó la viabilidad de OLG, indujo peroxinitritos, disminuyó el diámetro de OLG y la longitud de procesos de OLN-93 en forma reversible. Este efecto fue prevenido por un análogo hidrosoluble de vitamina E y por N-acetil-cisteína, un precursor de glutatión. 2) El análisis proteómico mostró aumento de CRMP-2 (1.76 veces) y disminución de proteína ribosomal SA (-2.0 veces) en OLG tratados con 3-NP respecto al control. 3) La forma fosforilada de CRMP-2 en T555 aumentó 40% con 3-NP (p<0.01) y fue prevenido por Y27632, un inhibidor de Rho-quinasa (ROCK). La retracción de procesos inducida por 3-NP fue prevenida por Y27632 y por la expresión de CRMP-2-T555A, dominante negativa de fosforilación

en el sitio de ROCK. Conclusiones: La acumulación de ROS podría regular la dinámica de crecimiento de procesos en OLGs mediante la activación de ROCK y la fosforilación de CRMP-2. Este mecanismo podría actuar en condiciones fisiológicas regulando la longitud de procesos y en condiciones patológicas de estrés oxidativo, afectando la normal mielinización en el SNC.

**192. (513) EFECTO DE LA EXPOSICION A UN AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE EL DAÑO VISUAL ISQUEMICO**

Dorfman D.<sup>1</sup>; Fernandez D.<sup>2</sup>; Rosenstein R.<sup>3</sup>  
*Laboratorio de Neuroquímica Retinal y Oftalmología Experimental, CEFYBO-CONICET, UBA<sup>1 2 3</sup>*  
*damiandorfman@gmail.com*

El daño isquémico es un componente patogénico central de diversas enfermedades retinianas que constituyen causas frecuentes de ceguera. No existen actualmente recursos eficaces para la prevención o terapéutica del daño isquémico retiniano. Evidencias recientes demuestran que la exposición de ratas adultas ambliopes a un ambiente enriquecido (AE) promueve una recuperación completa de la agudeza visual y la dominancia ocular. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la exposición a un AE en un modelo de isquemia retiniana aguda. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas expuestas a un ambiente estándar (AS) o AE. El AE consistió en jaulas grandes (100 x 50 x 82 cm) conteniendo varias tolvas de alimento, ruedas y objetos de diferentes formas, texturas y colores que se reposicionaron 1 vez/día y se sustituyeron completamente 1 vez/semana. Luego de 3 semanas de exposición a AE o AS se indujo una isquemia retiniana unilateral (aumento de la presión intraocular a 120 mmHg durante 40 min) y se regresaron los animales a sus respectivos ambientes durante 2 semanas. Se analizó la función (por electroretinografía, ERG) y la histología retiniana, el transporte anterógrado al colículo superior (CS) (subunidad b de la toxina colérica) y la reactividad glial en el CS (inmunomarcación de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP)). En animales expuestos a un AS, la isquemia indujo una caída significativa en la amplitud de las ondas a y b del ERG (p<0,01), una disminución significativa en el número de células ganglionares retinianas (CGR) (p<0,01), un aumento en la inmunomarcación para GFAP y una disminución en el transporte anterógrado. La exposición a AE previno parcialmente la disfunción retiniana (p<0,01), la disminución del número de CGR (p<0,01), los niveles de GFAP en el CS y preservó el transporte anterógrado. Estos resultados sugieren que la exposición a un AE podría constituir una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de la isquemia retiniana.

**193. (548) LA EXPRESIÓN DE ACUAPORINA-4 (AQP4) CEREBRAL SE ASOCIA CON DIMORFISMO SEXUAL EN LA ENCEFALOPATÍA HIPONATRÉMICA**

Maskin B.<sup>1</sup>; Cestari J.<sup>2</sup>; Struck C.<sup>3</sup>; Leston A.<sup>4</sup>; Alemanno G.<sup>5</sup>; Zotta E.<sup>6</sup>; Damiano A.<sup>7</sup>  
*Hospital Prof. A. Posadas<sup>1 2 3 4 5</sup>; Laboratorio de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>6</sup>; Laboratorio de Biología de la Reproducción, Catedra de Biología Celular y Molecular, Depto. de Ciencias Biológicas, FFyB, UBA<sup>7</sup>*  
*bermask@fibertel.com.ar*

Introducción: Existen diferentes factores de riesgo para la severidad de la encefalopatía hiponatémica, entre los que se destacan las mujeres en edad reproductiva. Las acuaporinas (AQPs) son canales proteicos de transporte de agua. AQP4 es la isoforma más abundante en el cerebro, fundamentalmente en la barrera hematoencefálica (BHE). La AQP4 se considera un modulador crítico de la homeostasis del agua y los iones en el cerebro. Objetivo: Determinar la expresión de AQP4 cerebral en un modelo experimental de encefalopatía hiponatémica en ratas de ambos sexos. Métodos: Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar, de 200-250 g de peso, divididas en cuatro grupos: hembras normonatémicas, n=8; machos normonatémicos, n=8; hembras hiponatémicas, n=8; machos hiponatémicos, n=8. La hiponatremia aguda fue inducida por la administración de vasopre-



sina subcutánea y solución de dextrosa/agua 5% intraperitoneal. El experimento duró cuatro horas. Los animales fueron sacrificados y el cerebro fue inmediatamente preparado en solución fisiológica fría para la determinación de la proteína AQP4 por Western blot y en formol 10 % para análisis inmunohistoquímico. Resultados: Se encontró una significativa reducción de la natremia (mEq/L):  $109.4 \pm 12.7$  vs. controles  $141.1 \pm 2.1$ . No se observó diferencias entre ambos grupos hiponatremicos:  $111.5 \pm 13$  vs.  $112.5 \pm 13$ . El Western blot semicuantitativo mostró un incremento significativo de la forma glicosilada de AQP4 cerebral solo en las ratas hembra hiponatremicas. El estudio inmunohistoquímico detectó expresión de AQP4 en la BHE (endotelio y proceso del pie de los astrocitos). Las ratas hembra hiponatremicas muestran expresión en ambos sitios comparada con ratas hembra controles. Las ratas macho hiponatremicas expresan AQP4 solo a nivel endotelial. Conclusiones: Estos resultados sugieren que la expresión de AQP4 en el cerebro, en hiponatremia aguda experimental, muestra dimorfismo sexual.

**194. (592) DESBALANCE DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN NCAM / PSA-NCAM EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE AUTISMO: POSIBLES CONSECUENCIAS SOBRE EL REMODELADO ESTRUCTURAL HIPOCAMPAL**

Codagnone M.<sup>1</sup>; Podestà M.<sup>2</sup>; Uccelli N.<sup>3</sup>; Reinés A.<sup>4</sup>  
*Instituto de Investigaciones Farmacológicas ININFA (CONICET-UBA), Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA<sup>1 2 4</sup>; Instituto de Investigaciones Farmacológicas ININFA (CONICET-UBA)<sup>3</sup>*  
 mcodagnone@ffyb.uba.ar

Se ha postulado la participación de las moléculas de adhesión en las alteraciones sinápticas descriptas en el autismo. El modelo experimental de autismo por administración de ácido valproico (VPA) en ratas durante la gestación reproduce varias de las características conductuales y neuroanatómicas descriptas en la patología. En éste trabajo nos propusimos estudiar en animales VPA las alteraciones en la citoarquitectura hipocampal y en la adhesividad sináptica, mediada por la molécula de adhesión neuronal (NCAM) y su variante polisialilada PSA-NCAM. Los animales VPA evidenciaron un déficit en las pruebas de evaluación madurativa realizadas en estadios postnatales tempranos. Mostraron un retraso en el crecimiento y en la apertura de ojos, un incremento en la latencia al reconocimiento del nido durante la prueba de discriminación olfatoria y alteraciones en el reflejo de geotaxis negativa y la conducta de nado. Al evaluar la conducta de los animales VPA en la adolescencia temprana se evidenció una reducción en la actividad exploratoria y una tendencia a la menor interacción entre pares al evaluar la conducta social de juego. A día postnatal 35, la tinción de Nissl reveló alteraciones en la citoarquitectura hipocampal de los animales VPA mientras que la inmunohistoquímica para NeuN, marcador neuronal, confirmó la participación neuronal en dichos cambios. En los animales VPA se observó un incremento de NCAM en el área CA3 del hipocampo y una disminución de PSA-NCAM tanto en el CA3 como en el giro dentado. Los resultados obtenidos indican que la alteración conductual de los animales VPA, observada en pruebas dependientes del hipocampo, se acompaña de cambios morfológicos en éste área y de una disminución del marcador de remodelado positivo PSA-NCAM, sugiriendo una alteración en el remodelado estructural. El aumento de NCAM podría pensarse como un mecanismo molecular tendiente a normalizar los niveles de PSA-NCAM anormalmente disminuidos.

**195. (625) PARTICIPACIÓN DE LAS MAPK EN LA REGULACIÓN DE LA TIROSINA HIDROXILASA POR LAS ENDOTELINAS EN LOS BULBOS OLFATORIOS**

Giannoni F.<sup>1</sup>; Nabhen S.<sup>2</sup>; Saffiotti N.<sup>3</sup>; Hope S.<sup>4</sup>; Bianciotti L.<sup>5</sup>; Vatta M.<sup>6</sup>  
*Cátedra de Fisiología, IQUIMEFA-CONICET, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 6</sup>; Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA<sup>5</sup>*  
 mvatta@ffyb.uba.ar

Las endotelinas (ETs) son péptidos que actúan como neuro-moduladores en diferentes regiones y áreas del sistema nervioso

central, incluidos los bulbos olfatorios (BO). Estos están relacionados con diversas funciones biológicas entre ellas la fisiología cardiovascular involucrando diferentes neurotransmisores entre los que resaltan las catecolaminas. Diversas áreas de los BO expresan tirosina hidroxilasa (TH) que es la enzima que regula el paso limitante en la biosíntesis de las catecolaminas y que se encuentra complejamente regulada. En trabajos previos demostramos que las ETs incrementan la actividad de TH mediante el aumento en la expresión total y de la fosforilación de la enzima, y del ARNm-TH. Estos mecanismos se encuentran regulados por diferentes quinasas incluidas las MAPK (ERK1/2). Trabajos previos demostraron que la ERK1/2 modulan la fosforilación de TH en la Serina 30 y 40, sitios que son activados por las ETs. Sobre esta base, el objetivo del presente estudio es determinar si las ETs modulan la TH en los BO a través de la vía de las MAPK. En el presente trabajo se evaluó el efecto de las ET-1 y 3 sobre la expresión de ERK1/2 y de sus formas fosforiladas (Western blot), y su participación en el incremento del ARNm-TH (RT-PCR en tiempo real) producido por estos péptidos. Los resultados se expresan como % vs Control (ANOVA y test de Student-Newman-Keuls,  $p < 0.05$ ;  $n = 3-4$ ). Los datos muestran la ET-1 y ET-3 incrementan los niveles totales de ERK 1 (39% y 38%, respectivamente.  $p < 0.05$ ) y ERK 2 (42% y 41%, respectivamente.  $p < 0.05$ ). Sin embargo no modificaron los niveles relativos de las ERK 1 y 2 fosforiladas. Por otra parte observamos que la inhibición de ERK 1/2 con PD98059 disminuyó el incremento de los niveles de ARNm-TH producido por las ETs ( $p < 0.05$ ). Estos resultados nos permiten concluir que las ETs modulan, en este caso la expresión de TH involucrando la vía de las MAPK en los BO.

**196. (633) S100B ESTIMULA LA MIGRACIÓN Y PROLIFERACIÓN ASTROGLIAL. IMPLICANCIAS PARA SU ROL COMO DAMP (DAMAGE ASSOCIATED MOLECULAR PATTERN)**

Seoane R.<sup>1</sup>; Villarreal A.<sup>2</sup>; Ramos A.<sup>3</sup>  
*Instituto de Biología Celular y Neurociencias Prof. E. De Robertis, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3</sup>*  
 seoaneroocio@gmail.com

S100B es una proteína glial cuya liberación constitutiva al espacio extracelular se incrementa significativamente luego de una injuria cerebral. Una vez en el espacio extracelular S100B se comportaría como DAMP activando el receptor RAGE y promoviendo la respuesta inmune innata. Luego de la isquemia cerebral, S100B se libera desde el core isquémico y los astrocitos circundantes se vuelven reactivos, aumentando su tamaño, su tasa de mitosis y direccionando sus procesos hacia la lesión isquémica. El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de S100B sobre los astrocitos in vitro, específicamente los cambios en la tasa mitótica y en la capacidad migratoria inducidos por S100B así como determinar la ruta de señalización utilizada. Utilizando cultivos primarios de astrocitos de rata determinamos que la exposición a S100B (50 nM y 1  $\mu$ M) induce un aumento de la tasa de división celular evaluada por la incorporación de BrdU. Este efecto fue bloqueado por anticuerpos neutralizantes de RAGE. La migración astrogliar fue estudiada en ensayos de herida artificial (scratch wound healing). Así, S100B demostró incrementar la extensión de procesos giales hacia la lesión artificial, promovió la migración astrogliar y la invasión de la herida artificial en forma RAGE-dependiente aún en presencia del inhibidor de la mitosis 5-fluorouracilo. Cuando los astrocitos fueron transfectados con un dominante negativo de Cdc42 se evidenció una pérdida de la migración inducida por S100B-RAGE. Nuestros resultados muestran que S100B es capaz de promover un aumento en la tasa de división celular de los astrocitos, estimula la extensión de procesos y migración hacia una herida artificial en forma RAGE dependiente. La migración astrogliar inducida por S100B requeriría de la actividad de la pequeña GTPasa Cdc42, tal como fue descrito en células de glioma o en microglía.

**197. (640) SEVERE ENERGY DEFICIENCY INDUCED BY CHRONIC HYPERGLYCEMIA ELICITS INCREASED CREATINE KINASE ACTIVITY IN SENSITIVE AND NON-SENSITIVE INSULIN TISSUES**

Remor A.<sup>1</sup>; Mattos F.<sup>2</sup>; Glaser V.<sup>3</sup>; Ghisoni K.<sup>4</sup>; Rech V.<sup>5</sup>; Vannmacher C.<sup>6</sup>; Bem A.<sup>7</sup>; Latini A.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil<sup>1 2 3 4 7 8</sup>; Centro Universitário Franciscano Da Saúde, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil<sup>6</sup>*  
 alineremor@gmail.com

Diabetes mellitus is the most common metabolic disorder worldwide, and hyperglycemia appears to be the triggering factor in inducing debilitating vascular pathologies, including neuropathies in these patients. This study aimed to investigate markers of tissue energy deficits and the effect of long-term insulin administration on tissue energetics in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic rats. The activities of key energy metabolism enzymes, oxygen consumption, oxidative stress, and apoptotic parameters were measured in CSF, blood, brain and/or peripheral tissues from STZ-treated rats (single intraperitoneal injection of 55 mg / kg). In addition, in order to evaluate the effect of the tight glucose control, these parameters were also assessed in rats receiving insulin (1.5 UI Novolin® N insulin, twice a day). The animals remained in this conditions during ten or 60 days. A marked energy deficiency was observed in brain of STZ-animals as shown by the significant reduction in the activities of the electron transfer chain complexes I-IV and increased succinate-stimulated respiring state IV in STZ-rats. This impaired energetics was associated with increased creatine kinase activity, which was also confirmed in peripheral STZ-tissues, where it was also found altered hexokinase activity (increment in skeletal muscle and reduction in the liver). Additionally, systemic oxidative stress was evidenced by increased blood lipid peroxidation and reduced levels of free thiols, and low concentration of CSF BH4. Insulin therapy was effectiveness in preventing deficits on energetic metabolism and failed to prevent the altered oxidative stress parameters. This study demonstrated increased creatine kinase activity as a possible compensatory mechanism induced by severe energy deficit in STZ-rats. This could be related to the debilitating neuropathy observed in diabetic individuals, including hypersensitivity to stress, increased risk of stroke, dementia and cognitive impairment.

**198. (659) EFECTO DEL SULFURO DE HIDROGENO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA NITRERGICO EN LA RETINA DEL HAMSTER DORADO.**

Sáenz D.<sup>1</sup>; Chianelli M.<sup>2</sup>; Keller Sarmiento M.<sup>3</sup>  
*Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Departamento de Bioquímica Humana, CEFYBO, Facultad de Medicina, UBA, CONICET<sup>1 2 3</sup>*  
 dasaenz@fmed.uba.ar

Inicialmente el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) fue conocido como un gas altamente tóxico. Estudios más recientes, han permitido identificar al H<sub>2</sub>S como una molécula gaseosa con nuevas características fisiológicas relevantes. Junto con el óxido nítrico (NO) y el monóxido de carbono (CO), no actúan a través de segundos mensajeros clásicos, sino que pueden difundir a las células adyacentes e interactuar con moléculas blanco y modificar químicamente ciertas proteínas extra e intracelulares. Evidencias experimentales sugieren que el H<sub>2</sub>S posee múltiples acciones, a nivel neurológico, cardiovascular, gastrointestinal, génitourinario y endócrino. Algunos de estos efectos son compartidos con el NO. En este contexto, dado que no ha sido previamente examinado el rol que desempeña el H<sub>2</sub>S en la regulación de la fisiopatología retiniana, el objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del H<sub>2</sub>S sobre el sistema nitrérgico retiniano. Para ello, se analizó el efecto de un dador de H<sub>2</sub>S (sulfuro ácido de sodio, NaHS) sobre los siguientes parámetros: influjo de L-arginina en sinaptosomas (utilizando 3H-arginina), actividad de NOS (a través de la conversión de 3H-arginina en 3H-citrulina) y niveles de GMPc y AMPc (por RIA). El H<sub>2</sub>S (50 µM) aumentó significativamente el influjo de L-arginina (control: 5,6 ± 0,4; H<sub>2</sub>S: 8,6 ± 0,8 pmol/mg prot. min; p<0,01) y la actividad de NOS (control: 5,5 ± 0,3; H<sub>2</sub>S: 6,6 ± 0,3 pmol/mg prot. 30 min; p<0,05). La acumulación de ambos

nucleótidos cíclicos, se determinó en presencia de 3-Isobutil, 1-metilxantina, un inhibidor de la fosfodiesterasa. El H<sub>2</sub>S no modificó significativamente la acumulación de GMPc (control: 55 ± 3; H<sub>2</sub>S: 60 ± 3 pmol /mg prot.) ni de AMPc (control: 16 ± 1; H<sub>2</sub>S: 15 ± 1 pmol /mg prot.). Estos resultados sugieren que el H<sub>2</sub>S podría regular positivamente el sistema nitrérgico en la retina del hámster.

**199. (660) NEOPTERIN INCREASES LONG-TERM MEMORY BY FACILITATING GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION**

Matos F.<sup>1</sup>; Ghisoni K.<sup>2</sup>; Scheffer D.<sup>3</sup>; Laura G.<sup>4</sup>; Perez M.<sup>5</sup>; Latini A.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil<sup>1 2 3 6</sup>; Departamento de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas, IFEC-CONICET<sup>4 5</sup>*  
 filipematos301@gmail.com

Neopterin (Neo), an endogenous pteridine, is found at increased levels in cerebrospinal fluid of patients with neurodegenerative processes. Currently, this metabolite is considered an inflammatory marker; however, it is virtually unknown the main role of Neo in the central nervous system. Therefore, in this study we exposed adult male rats to a single and intraventricular Neo administration (0.4 pmol; 2µL), and 30 min later the rodents were submitted to the step down test. Twenty-four hours after Neo treatment animals were killed and the hippocampus was dissected and handled for measuring long-term potentiation (LTP) generation. In addition, naive rat hippocampal slices were treated with crescent concentration of Neo (0-500nM) for assessing uptake of glutamate, and with azide (0-50mM) for measuring whether mitochondrial dysfunction provokes the release of Neo. The results demonstrated a facilitated step-down inhibitory avoidance long-term memory induced by Neo administration, which directly correlated with increased electrophysiological activity (increased of LTP generation; up to 125%). On the other hand, exposure of hippocampal slices (3 h incubation) to Neo provoked a significant increase in the rate of glutamate uptake, with the highest effect at 50 nM concentration of Neo (increase of 203%). Additionally, when slices were treated with azide (3 h incubation) the release of Neo was induced, showing a dose-dependent response (R<sup>2</sup>=0.99). Therefore, it could be concluded that besides being an inflammatory marker, Neo might facilitate memory by increasing glutamatergic signalling and removal of glutamate from the synaptic cleft (uptake of glutamate), possibly representing a protection to neuronal injury.

## INMUNOLOGÍA 2

**200. (26) ACCIÓN TERAPÉUTICA DEL COMPUESTO A EN UN MODELO DE DIABETES AUTOINMUNE**

Barcala Tabarozzi A.<sup>1</sup>; Castro C.<sup>2</sup>; Antunica Noguero M.<sup>3</sup>; Liberman A.<sup>4</sup>; De Bosscher K.<sup>5</sup>; Haegeman G.<sup>6</sup>; Arzt E.<sup>7</sup>; Perone M.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 3 4 7 8</sup>; Laboratory for Eukaryotic Gene Expression and Signal Transduction (LEGEST), Gent, Belgica<sup>5 6</sup>*  
 ezetab@fbmc.fcen.uba.ar

El Compuesto A (CpdA) es un ligando no esteroideo del receptor de glucocorticoides (GC) derivado de la planta *Salsola tuberculiformis* botsch. que interfiere con la actividad del factor de transcripción (FT) inflamatorio NFκB sin inducir la activación de genes dirigidos por elementos de respuesta a GC. Éste ha mostrado ser un agente terapéutico eficaz en modelos de artritis reumatoidea y esclerosis múltiple, sin efectos secundarios adversos, pero se desconoce si posee acción terapéutica para la diabetes tipo 1 (T1D). Empleamos el modelo de transferencia adoptiva de la enfermedad en ratones NODscid para evaluar el potencial terapéutico del CpdA en la T1D. Se transfirieron (ip) 5x10<sup>6</sup> células diabetogénicas/ratón al día 0 (d0) y se trató (ip) con 100µg

CpdA/ratón 3 veces/sem hasta el d50. A partir del d20 se dosó la glucemia (dos días sucesivos >300mg/dl = diabetes). El CpdA inhibió la aparición de T1D en el 30% de los ratones y retrasó su incidencia ( $p < 0,0001$  vs veh) sin mostrar signos de toxicidad. Además, redujo el grado de insulinitis y la pérdida de expresión de insulina en las células  $\beta$ . Para conocer los posibles mecanismos involucrados en la acción del CpdA en este modelo, se analizó la expresión de moléculas de superficie (FACS) en esplenocitos de ratones NODscid transferidos y tratados con CpdA o veh al d20. El CpdA redujo el porcentaje de células MHCII+ en la población CD11c+/CD11b- ( $p < 0,05$  vs veh) y no modificó los porcentajes de las poblaciones CD11c+/CD11b+, CD11c+/CD11b-, CD11c-/CD11b+, ni la relación CD4+/CD8+. Se pre-trataron esplenocitos de ratones NOD pre-diabéticos y diabéticos con CpdA o veh y se estimularon con PMA+Ionomycin (24h in vitro). El CpdA redujo la expresión del FT T-bet (WB;  $p < 0,01$  vs veh) y la secreción de IFN $\gamma$ , IL-6, TNF $\alpha$  e IL-4 (ELISA;  $p < 0,01$  vs veh) inducidas por PMA/I. Estos resultados indican que el CpdA, a través de su acción sobre células del sistema inmune, es un potencial candidato terapéutico para el tratamiento de la T1D.

## 201. (350) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GALECTINAS 1 Y 3 EN LA ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO

Cabello J.<sup>1</sup>; Acosta Pedemonte N.<sup>2</sup>; Goy D.<sup>3</sup>; Cointy G.<sup>4</sup>; Croci D.<sup>5</sup>; Cerliani J.<sup>6</sup>; Rabinovich G.<sup>7</sup>; Feldman S.<sup>8</sup>  
LABOATEM, Fac Cs Médicas, UNR<sup>1 2 3 4 6</sup>; Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)<sup>5 6 7</sup>  
julietacabello@gmail.com

Dada la relevancia de las galectinas 1 (Gal1) y 3 (Gal3) en fenómenos de autoinmunidad, nos propusimos caracterizar, en nuestro modelo experimental de artritis inducida por antígeno, el nivel de expresión de estas lectinas. A tal fin, conejos hembras New Zealand, (n=10) se dividieron en 2 grupos: AIA (2 inmunizaciones sucesivas con OVA (5 mg/ml, 1:1 AFC) y posterior inmunización intra-articular OVA y C (control, dosis placebo). Noventa días post-detección en AIA de fenómeno inflamatorio (presencia de inflamación visible con incremento diámetro femoro-tibio-toruliano, dolor y retracción a la palpación) se confirmó perpetuación del fenómeno por Resonancia Magnética, presencia de hidrartrosis, hiper-intensidad y alteración de los tejidos blandos medidos, (scores de I a III). Se realizaron estudios de los niveles séricos de 1) ON (óxido nítrico), 2) TNF (factor de necrosis tumoral), 3) IFN- $\gamma$  (interferón gamma), así como estudios 4) anatomopatológicos de membranas sinoviales, 5) contenido mineral óseo volumétrico CMOv (tomografía axial computada periférica de huesos largos) 6) expresión de Gal1 y Gal3 (Western blot de extractos membranas sinoviales). Se observó: AIA > C para 1), 2) y 3) ( $p < 0,01$ ), 4) AIA: íntima hiperplasiada, alteraciones fibrovasculares del intersticio e infiltrados plasmolinfocitarios, 5) AIA < C., ( $p < 0,01$ ). 6) incremento significativo de Gal1 y Gal3 para AIA vs C. El incremento en AIA de ON, TNF e IFN-g, así como Gal3 da cuenta del proceso autoinmune inducido, y colocan a estos factores como posibles biomarcadores en este modelo. La disminución de CMOv indicaría una posible osteopenia metabólica. Por el otro lado, el incremento de Gal1, probablemente se deba a una respuesta del organismo intentando regular el desequilibrio provocado por el fenómeno autoinmune inducido. Estos resultados permiten convalidar a nuestro modelo experimental para ser utilizado en el ensayo de estrategias terapéuticas contra la artritis.

## 202. (360) POTENCIAL ACCIÓN TOLEROGÉNICA DEL TRATAMIENTO CON PRO-VITAMINA D SOBRE ARTRITIS INDUCIDA POR ANTÍGENO: MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINA PRO-INFLAMATORIAS Y DE GALECTINA 3

Abranson D.<sup>1</sup>; Cabello J.<sup>2</sup>; Mortarino P.<sup>3</sup>; Gorosito E.<sup>4</sup>; Toledo J.<sup>5</sup>; Zingoni N.<sup>6</sup>; Radice B.<sup>7</sup>; Dorming M.<sup>8</sup>; Bumaguin G.<sup>9</sup>; García Tentella B.<sup>10</sup>; Cointy G.<sup>11</sup>; Feldman S.<sup>12</sup>  
LABOATEM LAB<sup>1 4</sup>; LABOATEM lab biología osteoart. Ing Tisular y Terapias Emergentes Fac Cs Médicas UNR<sup>2 3 5 6 7 8 9 10 11 12</sup>  
saryfeldman@yahoo.com.ar

Observamos en modelo experimental conejos con artritis (A) que Interferón gamma (IFN-gamma) y galectina 3 (Gal3) aumentan y que hidrolizados enzimáticos de colágeno suministrados oralmente (L), podrían generar tolerancia. Dado que existen evidencias de que vitamina D (1,25D) podría ser inmunoreguladora, decidimos investigar efectos de pro-vitamina D en nuestro modelo. Conejos A recibieron L (AL), colecalciferol (AD), ambos (ADL), o dosis placebo (Ap), C grupo control (n=5c/grupo). Estudios y resultados: 1) Incrementos diámetro femorotibiorotuliano, Ap < C ( $p < 0,01$ ); ADL < AL ( $p < 0,05$ ) y ADL < AD = Ap, ( $p < 0,05$ ); Al vs AD n.s. 2) presencia de dolor (retracción a la palpación de c/rodilla, promedio 3 observadores independientes): C.sin dolor ; Ap > AL ( $p < 0,5$ ); Alvs AD ó vs ADL n.s. 3) resonancia magnética (scores 0-III), Ap > AL = AD = ADL ( $p < 0,5$ ). 4) Histopatología de membranas sinoviales (infiltrado mononuclear e hiperplasia sinoviotelio): Ap severa; AD y AL, moderada-alta, ADL, leve. 5) Estudios tomográficos de los fémures (pQCT), determinando I) parámetros de masa (contenido mineral óseo (CMO) total(t) y cortical (c) y área ósea cortical (AC): observándose significativa disminución de Ap respecto al resto de los grupos, ( C vs Al o C Vs ADL n.s.) . II) Parámetros de mineralización: densidad mineral ósea volumétrica (vDMO) total (t) y cortical (c): disminución muy significativa de Ap vs resto de los grupos. C, Al, AD, ADL n.s. 6) Niveles séricos de IFNgamma; Ap > ADL ( $p < 0,05$ ), AL y AD > ADL ( $p < 0,05$  ambos casos), 7) Niveles de expresión de Gal3 (Western blot) C=0 , ADL < AD, ( $p < 0,05$ ). y ADL < AL ( $p < 0,05$ ), AD y Al n.s. Se propone una estrategia terapéutica que pretende disminuir la progresión de la patología osteoarticular probablemente al gatillar mecanismos tolerogénicos e inhibir mediadores pro-inflamatorios. Estudios posteriores serán críticos para analizar los genes diferencialmente expresados en esta patología y su relación con los parámetros estudiados.

## 203. (445) EL MICROAMBIENTE INFLAMATORIO AUMENTA LA FORMACIÓN DE NETS (TRAMPAS DE DNA EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS) MEDIADAS POR PMA.

Lapponi M.<sup>1</sup>; Carestia A.<sup>2</sup>; Etulain J.<sup>3</sup>; Schattner M.<sup>4</sup>  
Academia Nacional de Medicina, Laboratorio de Trombosis I<sup>1 2 3 4</sup>  
mariajoselapponi@yahoo.com.ar

Durante la respuesta inflamatoria, los neutrófilos migran al sitio de infección en donde matan a los patógenos invasores por fagocitosis, secreción de mediadores antimicrobianos y a través de la liberación de NETs. Las NETs son estructuras antimicrobianas recientemente descritas formadas por cromatina y agentes microbianos. Debido a que la acidosis y la hipertermia son características del foco inflamatorio, en este trabajo evaluamos la formación de NETs bajo estas condiciones así como la inhibición de la formación de las mismas por drogas antiinflamatorias. Se estudió por microscopía confocal y por ELISA la formación de NETs a partir de neutrófilos de origen humano a 37, 40 y 42 °C y a pH 7.4, 7.0 y 6.5 en ausencia o presencia de ácido acético salicílico (AAS), dexametasona (Dex) y un inhibidor de NFkappaB (BAY117082). Los datos obtenidos muestran que la formación de NETs mediada por PMA (potente activador de PKC y modelo para la formación de NETs) aumenta significativamente con la disminución del pH y el aumento de la temperatura (n=3-6, vs. 37°C o pH 7.4, \* $p < 0,05$ , test de ANOVA). Mientras el tratamiento con AAS o Dex no modificó la formación de NETs, la preincubación de los neutrófilos con BAY117082 redujo en un 75% su generación tanto en condiciones normales como a pH ácido o condiciones de hipertermia ( $P < 0,05$ , n=3-6).

Tabla 1 (ng/ul de ADN liberado) \* $P < 0,05$  vs pH 7,4(n=5) Tabla 2 (ng/ul de ADN liberado). \* $P < 0,05$  vs 37°C(n=4); # $P < 0,05$  vs pH 40°C

ADN		ADN	
pH 7.4	2.2±0.2	37°C	2.1±0.3
pH 7.0	2.5±0.3	40°C	2.8±0.3*
pH 6.5	2.9±0.4*	42°C	3.0±0.4*#

En conclusión, nuestros resultados muestran que condiciones de estrés del microambiente inflamatorio como la acidosis y el aumento de temperatura contribuirían a promover la formación de NETs e identifican a la activación del factor de transcripción NFKB como un mediador crítico en este proceso.

#### 204. (668) IDENTIFICACIÓN DE GALECTINA-1 COMO UN NUEVO BLANCO TERAPÉUTICO EN CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO

Dalotto Moreno T.<sup>1</sup>; Croci D.<sup>2</sup>; Cerliani J.<sup>3</sup>; Dergan Dylon S.<sup>4</sup>; Mascanfroni I.<sup>5</sup>; Rabinovich G.<sup>6</sup>; Salatino M.<sup>7</sup>

IBYME<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

tomasdalotto@hotmail.com

Galectina-1 (Gal1) es una proteína inmunosupresora que ha sido asociada a escape tumoral. El objetivo de este trabajo es investigar el impacto de Gal1 tumoral sobre la inmunosupresión, el crecimiento tumoral y la formación de metástasis en cáncer de mama. El bloqueo de la expresión de Gal1 en el tumor 4T1 (que expresa altos niveles de Gal1) utilizando un shRNA específico indujo una reducción en el crecimiento tumoral (Media 4T1 WT= 564 mm<sup>3</sup> vs. KD= 217 mm<sup>3</sup>, p<0.05) y en el número de metástasis pulmonares. Este efecto fue suprimido si en el flanco contralateral del ratón se inculcaba un tumor WT sugiriendo que el efecto antitumoral dependía del sistema inmune. El análisis por IHQ determinó que las metástasis pulmonares identificadas en ratones con tumor WT resultaron fuertemente positivas para Gal1, no así el tejido circundante. El estudio del compartimiento inmunológico en estos ratones reveló una mayor frecuencia de células T regulatorias CD4+CD25+Foxp3+ en bazo (WT=12±0.4% vs. KD=10,5±0,3%, p<0.05), en ganglios drenantes (WT=35±2.1% vs. KD=24±1.8%, p<0.01), intratumorales e intrapulmonares. El bloqueo de Gal1 tumoral logró revertir la inmunosupresión asociada al tumor, fenómeno que se evidenció por un aumento en la proliferación in vitro de esplenocitos y linfocitos de ganglio de ratones con tumor KD y un desvío de la respuesta hacia un perfil Th1. Finalmente demostramos que la administración ip de un anticuerpo monoclonal neutralizante de Gal1 (F8.G7; pero no su control de isotipo) a ratones portadores del tumor WT no sólo inhibió el crecimiento tumoral y la formación de metástasis pulmonares, sino que revirtió la inmunosupresión asociada al tumor (p<0.01). Nuestros resultados demuestran que el bloqueo de Gal1 inhibe el crecimiento del tumor y la formación de metástasis en cáncer de mama postulando a Gal1 y sus glicanos como nuevos blancos atractivos en el tratamiento del cáncer de mama metastásico.

#### 205. (543) NIVELES SÉRICOS DE INTERLEUQUINAS EN LAS ETAPAS AGUDA Y CRÓNICA DE LA INFECCIÓN CON TRICHINELLA SPIRALIS (TS) EN RATONES CBI-IGE SUSCEPTIBLES O RESISTENTES

Codina A.<sup>1</sup>; Di Martino A.<sup>2</sup>; Vasconi M.<sup>3</sup>; Bertorini G.<sup>4</sup>; Di Masso R.<sup>5</sup>; Hinrichsen L.<sup>6</sup>

Instituto de Genética Experimental (IGE), Fac. Cs. Médicas, UNR<sup>1 2</sup>; Instituto de Genética Experimental (IGE), Fac. Cs. Médicas, UNR, Área Parasitología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>3</sup>; Área Parasitología, Fac. Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>4</sup>; Instituto de Genética Experimental (IGE), Fac. Cs. Médicas, UNR; CIC-UNR<sup>5 6</sup>

vikicodina@hotmail.com

Los modelos animales genéticamente definidos son valiosos para investigar tanto la resistencia/susceptibilidad a la infección como el curso de la enfermedad. La base inmunológica de los cambios de la fisiología intestinal asociados a la expulsión de los nematodos gastrointestinales no está totalmente dilucidada, pero se acepta que la respuesta Th2 generada en la infección por estos parásitos juega un rol importante en ello. Para evaluar el papel del tipo de citoquina en la primoinfección con Ts, se analizó la evolución del perfil sérico Th1/Th2 de ratones de las líneas CBI (susceptible) y CBI/L (resistente) del modelo murino desarrollado en el IGE, en las etapas aguda y crónica

de la infección. Se utilizaron machos y hembras adultos (n=8 por sexo), infectados por vía oral con 2 larvas infectantes L1 de Ts por g de peso corporal. Los ratones se sacrificaron en la fase entérica (día 6 post-infección) y en la parenteral (30 días post-infección) para analizar la concentración sérica de IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (ELISA). En el período crónico se determinó la carga parasitaria en lengua (CP) y se estimó el índice de capacidad reproductiva de Ts (ICR=CP/dosis infectiva). CBI tuvo valores de IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 significativamente mayores en la etapa crónica que en la aguda (P=0.006, P<0.0001, P=0.002 y P<0.0001, respectivamente). En ese lapso los niveles séricos de IL-10 disminuyeron en CBI/L (P=0.017) mientras que las otras citoquinas no mostraron variaciones. ICR fue significativamente mayor en CBI que en CBI/L (1.04±0.199 vs 0.17±0.030; P<0.0001). Los resultados sugieren que en este modelo la susceptibilidad se asociaría a niveles iniciales bajos de IL-4 que determina un medio ambiente intestinal favorable para que el gusano complete su ciclo. En tanto, valores altos de IL-10 en la fase intestinal protegerían al huésped contra la inserción muscular del nematodo.

#### 206. (651) CIRCUITOS MEDIADOS POR GALECTINA-1 Y GLICANOS DESACTIVAN LA MICROGLIA Y CONTROLAN PROCESOS NEURODEGENERATIVOS INDUCIDOS POR INFLAMACIÓN

Mascanfroni I.<sup>1</sup>; Starossom S.<sup>2</sup>; Imitola J.<sup>3</sup>; Cao L.<sup>4</sup>; Raddasi K.<sup>5</sup>; Hernandez F.<sup>6</sup>; Elyaman W.<sup>7</sup>; Bassil R.<sup>8</sup>; Croci D.<sup>9</sup>; Wang Y.<sup>10</sup>; Khoury S.<sup>11</sup>; Rabinovich G.<sup>12</sup>

IBYME-CONICET<sup>1 6 9 12</sup>; Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston MA USA<sup>2 3 4 5 7 8 11</sup>  
idmascan@gmail.com

La neurodegeneración mediada por inflamación ocurre durante las fases aguda y crónica de la esclerosis múltiple (EM) y en su modelo animal, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La microglía activada de manera clásica (MG-M1) juega un rol clave en este proceso a través de la secreción de mediadores pro-inflamatorios. En función de las propiedades anti-inflamatorias de galectina-1 (Gal1), lectina endógena expresada en el sistema nervioso central (SNC), estudiamos el papel de la interacción entre Gal1 y sus glicanos como posible mecanismo regulatorio de la MG. Observamos, por PCR en tiempo real, WB e inmunofluorescencia, expresión mayor de Gal1 en el SNC durante el pico de la enfermedad a nivel de células T CD4, MG y astrocitos. Dicha expresión se mantuvo selectivamente en astrocitos durante la fase crónica de la EAE. Mientras que estímulos pro-inflamatorios (LPS, IFN- $\gamma$ ) fueron capaces de inhibir la expresión de Gal1, estímulos regulatorios (IL-4, TGF- $\beta$ ) promovieron su expresión. Co-cultivos de astrocitos WT expuestos a TGF- $\beta$  con MG-M1 demostraron menor activación celular de MG-M1 con respecto a co-cultivos con astrocitos Gal1 KO, evidenciado por la expresión de CD86 (rMFI 500 vs 100) y MHCII (rMFI 1500 vs 900) El análisis mecanístico reveló que Gal1 se une en forma selectiva a N- y O-glicanos en MG-M1 pero no en MG-M2 inhibiendo la activación de p38MAPK y pCREB y controlando la producción de mediadores pro-inflamatorios como iNOS, TNF y CCL2 (p<0.01 vs control). In vivo, tanto la inyección de rGal1, como la transferencia adoptiva de MG expuesta ex vivo a Gal1 o la transferencia icv de astrocitos WT (pero no Gal1 KO) logró atenuar la EAE (p<0.01 vs control). El efecto anti-inflamatorio de astrocitos WT sólo se observó en forma limitada en ratones a los cuales se les eliminó la MG utilizando clodronato encapsulado en liposomas. Nuestros hallazgos identifican un circuito regulatorio mediado por Gal1 y glicanos capaz de desactivar la MG e inhibir la inflamación en procesos neurodegenerativos crónicos.

## REPRODUCCIÓN 2

#### 207. (103) LA EXPOSICIÓN A BISPHENOL A INDUCE UN RETRASO DEL DESARROLLO MAMARIO EN RATAS MACHOS PREPUBERALES

Kass L.<sup>1</sup>; Manfroni-ghibaudo E.<sup>2</sup>; Altamirano G.<sup>3</sup>; Durando M.<sup>4</sup>; Luque E.<sup>5</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>6</sup>

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL<sup>1 2 3 4 5 6</sup>

lkass@fbc.unl.edu.ar

Previamente demostramos que la exposición perinatal a Bisphenol A (BPA) altera el desarrollo morfológico y funcional de la glándula mamaria en la hembra, afectando la lactancia e incrementando el riesgo de lesiones tumorales. En este estudio, evaluamos el efecto de bajas dosis de BPA sobre el desarrollo morfológico mamario en machos prepúberes, utilizando diferentes vías y períodos de exposición. Ratas Wistar preñadas se asignaron a dos experimentos. Experimento 1, desde el octavo día de gestación (DG8) y hasta el parto, las madres fueron expuestas a BPA a través de bombas osmóticas subcutáneas (gestación). Experimento 2, las madres recibieron BPA en el agua de bebida desde el DG9 hasta el destete (gestación + lactancia). En ambos experimentos se obtuvieron las glándulas mamarias abdomino-inguinales de las crías machos a los 5, 15 y 30 días postnatales (DPN), en DPN30 también se obtuvieron glándulas mamarias de crías hembras. Las mamas derechas se procesaron como whole mounts, y en todas las muestras se evaluó el área ocupada por la mama y la elongación ductal; además, se clasificaron y cuantificaron las estructuras terminales. La exposición a BPA causó un retraso del desarrollo mamario de los machos evidenciado, en DPN30, por una disminución significativa de la elongación ductal y una disminución en el número de botones terminales (TEBs). Similares efectos se observaron independientemente de la vía y período de exposición. En DPN30, el desarrollo mamario de las hembras expuestas a BPA no presentó cambios. Los resultados sugieren que, en el período prepuberal, la glándula mamaria de la rata macho es más sensible a la perturbación endocrina que la de las hembras; por lo tanto, podría ser utilizado como modelo en la identificación de sustancias con acción hormonal.

## 208. (111) POSIBLES VÍAS DE ACCIÓN DE LA ANANDAMIDA DURANTE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN BOVINOS

Osycka Salut C.<sup>1</sup>; Gervasi M.<sup>2</sup>; Davio, C.<sup>3</sup>; Pérez-Martínez S.<sup>4</sup> Laboratorio de Biología de la Reproducción en Mamíferos, CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1 2 3</sup>; Cátedra de Química Medicinal, Laboratorio de Farmacología de Receptores, FFyB, UBA<sup>4</sup>  
claudia.osycka@gmail.com

Previamente demostramos que la anandamida (AEA), principal endocannabinoide, induce la capacitación espermática en bovinos aumentando los niveles de óxido nítrico (NO). Es conocido que durante la capacitación se activan distintas vías moleculares en el espermatozoide (ESP) que incluyen al NO y a la proteína quinasa A (PKA) entre otros. El objetivo del siguiente trabajo fue estudiar las posibles vías de acción de AEA en la modulación de los niveles de NO durante la capacitación espermática en bovinos. En primer lugar, nos propusimos evaluar los receptores de cannabinoides (CB1 y TRPV1) involucrados en la producción de NO en ESP capacitados con AEA. Para ello se realizaron capacitaciones in vitro de ESP bovinos criopreservados con MetAEA (análogo no hidrolizable de AEA) en presencia de antagonistas de CB1 (SR1) o de TRPV1 (CZP) junto con la sonda DAF-FM diacetato (que fluoresce en presencia de NO). La fluorescencia se midió por citometría de flujo. El aumento de los niveles de NO observado al incubar los ESP con MetAEA, disminuyó en presencia de ambos antagonistas ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, con el fin de dilucidar la participación de PKA en la capacitación inducida por AEA, se realizaron capacitaciones in vitro en presencia de MetAEA y H89 (inhibidor de PKA). Se evaluó el estado de capacitación, mediante las técnicas de clortetraciclina e inducción de la reacción acrosomal por lisofosfatidilcolina (revelada con PSA-FITC), y la producción de NO por citometría de flujo. La incubación de los ESP con H89 inhibió el efecto capacitante del endocannabinoide ( $p < 0,05$ ). A su vez, los niveles de NO disminuyeron en los ESP incubados con MetAEA

y el inhibidor de PKA ( $p < 0,05$ ). En conjunto, los resultados sugieren que la AEA activaría la vía del NO durante la capacitación espermática a través de los receptores CB1 y/o TRPV1 y que en este proceso estaría involucrada una PKA.

## 209. (189) REGULACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS POR ACTIVACIÓN DE PPAR $\alpha$ EN LA CÉLULA DE SERTOLI.

Regueira M.<sup>1</sup>; Riera M.<sup>2</sup>; Galardo M.<sup>3</sup>; Pellizzari E.<sup>4</sup>; Cigorrraga S.<sup>5</sup>; Meroni S.<sup>6</sup>  
CEDIE CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
mregueira@cedie.org.ar

Se ha postulado que la célula de Sertoli (CS) utiliza ácidos grasos (AG) como fuente de energía. En tejidos que metabolizan AG, diversos genes se encuentran regulados, entre ellos: el transportador de ácidos grasos (FAT/CD36), la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1, esencial para la entrada de los AG a la mitocondria) y las deshidrogenasas de cadena media (MCAD) y larga (LCAD). La oxidación de AG también puede estar favorecida por la actividad de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), que regulando negativamente la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa, inhibe la entrada de piruvato proveniente de la glicólisis al ciclo de Krebs. En músculo esquelético y cardíaco, tejidos que utilizan la oxidación de AG como fuente energética principal, el factor de transcripción PPAR $\alpha$ , perteneciente a la familia de los PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), participa en la regulación de genes vinculados con el metabolismo de AG. El objetivo del presente trabajo fue analizar la posible regulación por activación de PPAR $\alpha$  de la expresión de genes relacionados con el metabolismo de AG en CS. Cultivos de CS de ratas de 20 días de edad fueron incubados en condiciones basales o estimulados con WY 14643 (WY, 10  $\mu$ M), activador farmacológico de PPAR $\alpha$ , por 24hs y 48hs. Se determinaron los niveles de ARNm de CPT1 por Northern Blot y de LCAD, MCAD, FAT/CD36 y PDK3 -isoforma de PDK de alta expresión en el testículo- por RQPCR. Se observó que WY estimula la expresión de CPT1 a las 48hs ( $1,4 \pm 0,1^*$ ) y de LCAD, MCAD, FAT/CD36 y PDK3 a las 24hs ( $1,8 \pm 0,3^*$ ;  $2,2 \pm 0,1^*$ ;  $1,9 \pm 0,3^*$  y  $1,7 \pm 0,2^*$ , respectivamente), los resultados indican veces de estímulo con respecto al basal ( $X \pm DS$ ,  $*p < 0,05$ ,  $n=3$ ). En su conjunto estos resultados sugieren que la activación de PPAR $\alpha$  participa en la regulación de la expresión de genes vinculados a la metabolización de AG en CS y apoyarían la hipótesis que los AG son una fuente energética importante para este tipo celular. (PIP2008N<sup>806</sup>; PICT2007N<sup>1004</sup>)

## 210. (303) ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS INVOLUCRADAS EN LAS UNIONES INTERCELULARES DE CÉLULAS DE SERTOLI, INDUCIDAS POR LA ACCIÓN IN VITRO DEL MONO-(2-ETILHEXIL) FTALATO (MEHP): PAPEL DEL GLUTATIÓN.

Sobarzo C.<sup>1</sup>; Nogueira De Moraes R.<sup>2</sup>; Lustig L.<sup>3</sup>; Denduchis B.<sup>4</sup>; Schteingart H.<sup>5</sup>  
Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 3 4</sup>; CEDIE, Hospital de Niños R. Gutierrez<sup>2 5</sup>  
ciruba02@hotmail.com

Se ha descrito que el metabolito activo del di-(2-etilhexil) ftalato, el MEHP, es un tóxico que induce estrés oxidativo y atrofia testicular. El objetivo de este trabajo es estudiar, en cultivos de células de Sertoli (CS), el efecto del MEHP sobre la integridad de las uniones intercelulares y la participación del glutatión (GSH) en el daño por estrés oxidativo. Se aislaron CS de ratas de 20 días de edad y se cultivaron por 5 días en medio químicamente definido. Los cultivos celulares se estimularon con MEHP (200  $\mu$ M) (E) y sin MEHP (C) durante las últimas 24 horas. Los niveles de GSH intracelular total se determinaron por un método espectrofotométrico. Los datos se expresan como % del basal, media  $\pm$  DS,  $n=6$ , (Basal:  $344.7 \pm 21.8$  pmolGSH/ $\mu$ gDNA). El MEHP disminuyó significativamente los niveles de GSH intracelular a un valor de  $24 \pm 5^*$  vs el basal ( $*p < 0,01$ ). Por inmunofluorescencia (IF) y "Western blot" (Wb) se determinó la localización y expresión de las proteínas de las uniones adherentes: N-cadherina (N-cad) y a y b-cateninas;

estrechas: ocludina, claudina-11 y "zonula occludens" (ZO-1) y de las nexos: Conexina-43 (Cx-43). Se observó un patrón lineal de IF localizado a nivel de las uniones inter-Sertoli, en las proteínas analizadas tanto en los C como en los E. Sin embargo, observamos para N-cad,  $\alpha$ -catenina y ZO-1 una deslocalización de la señal desde las zonas de contacto entre las células hacia el citoplasma en los E comparados a los C. Por Wb se observó un aumento en la expresión de N-cad,  $\alpha$ -catenina y ZO-1, y una disminución significativa de Cx-43 en los E respecto de los C. No se detectaron variaciones en la expresión de claudina-11 y ocludina. En base a nuestros resultados y a los obtenidos en otros modelos se sugiere que MEHP induce estrés oxidativo, evidenciado por los niveles disminuidos de GSH, generando alteraciones de las moléculas que constituyen las uniones adherentes y nexos, y no modificando la expresión de las moléculas de las uniones estrechas.

**211. (311) CÉLULAS DE LEYDIG DE RATONES MACHOS HÍBRIDOS CON FUSIONES ROBERTSONIANAS PRESENTAN CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE APOPTOSIS**

Díaz De Barboza G.<sup>1</sup>; Rodríguez V.<sup>2</sup>; Maldonado C.<sup>3</sup>; Ponce R.<sup>4</sup>; Theiler G.<sup>5</sup>; Tolosa De Talamoni N.<sup>6</sup>  
*Laboratorio Cañas, Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, UNCBA<sup>1,2,6</sup>; Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas<sup>3</sup>; Química Biológica A, Facultad de Odontología<sup>4</sup>; Introducción a la Química y Física Biológicas, Facultad de Odontología<sup>5</sup>*  
 gabyediaz@yahoo.com

Previamente demostramos que ratones Graomys híbridos con rearrreglos Robertsonianos presentan arresto de la espermatogénesis por apoptosis masiva de células germinales, lo cual explica su esterilidad. La testosterona sérica se encuentra disminuida en estos ratones con respecto a los controles. Por este motivo nos propusimos estudiar la presencia de apoptosis en las células de Leydig que sintetizan esta hormona esteroidea. El proceso apoptótico se determinó mediante la técnica de TUNEL, inmunolocalización de Bax, citocromo c, Fas, FasL y por microscopía electrónica, tanto en ratones híbridos como en sus parentales. Las células intersticiales de ratones híbridos fueron negativas tanto para TUNEL como para la inmunoexpresión de Bax y de citocromo c; sin embargo, mostraron la presencia de Fas y FasL. La frecuencia de las células Fas(+) incrementó con la edad, mientras que la inmunotinción de FasL se presentó elevada con respecto a los controles en todos los tiempos estudiados. El análisis ultraestructural de células de Leydig en los ratones controles adultos mostró la clásica presencia de mitocondrias de crestas tubulares y de inclusiones lipídicas, sustrato necesario para la esteroidogénesis. En cambio, las células de Leydig de los ratones híbridos de la misma edad presentaron vacuolas parcial o completamente vacías. Además, las mitocondrias revelaron pérdida de las crestas tubulares y aumento del espacio intramitocondrial. La cromatina y la envoltura nuclear mostraron ultraestructura normal sin signos compatibles con fragmentación nuclear. Los resultados revelan células de Leydig con características inmunohistoquímicas y ultraestructurales de una etapa temprana de la apoptosis como lo demuestra la elevada expresión de Fas y FasL, la alteración mitocondrial y la ausencia de la fragmentación del ADN. En estas condiciones las células no podrían producir testosterona en forma adecuada y favorecerían al arresto de la espermatogénesis.

**212. (346) PARTICIPACIÓN DE LAS HORMONAS OVÁRICAS EN LA REGULACIÓN DEL PROCESO DE LIBERACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DEL EPITELIO OVIDUCTAL INDUCIDO POR ANANDAMIDA (AEA) EN BOVINOS**

Gervasi M.<sup>1</sup>; Osycka-salut C.<sup>2</sup>; Lam P.<sup>3</sup>; Rana S.<sup>4</sup>; Marczylo T.<sup>5</sup>; Konje J.<sup>6</sup>; Perez-martinez S.<sup>7</sup>  
*Lab. de Biología de la Reproducción en Mamíferos, CE-FyBO-CONICET<sup>1,2,7</sup>; Endocannabinoid Research Group, Reproductive Sciences Section, Department of Cancer Studies and Molecular Medicine, University of Leicester<sup>3,4,5,6</sup>*  
 maria.gracia.gervasi@gmail.com

Previamente demostramos que la AEA induce la liberación de los espermatozoides (ESP) de las células epiteliales del oviducto (CEO). Se sabe que las enzimas que degradan y sintetizan AEA (FAAH y NAPE-PLD) son moduladas por estradiol (E) y progesterona (P) en útero de roedores, y que en humanos los niveles plasmáticos de AEA fluctúan a lo largo del ciclo menstrual. Nuestro objetivo fue: a) Estudiar la participación de las hormonas ováricas y su relación con la AEA en la interacción ESP-CEO; y b) Caracterizar la principal vía metabólica de AEA durante el ciclo estral en el oviducto bovino. Se realizaron experimentos de liberación de los ESP de las CEO incubando con E o P por 1, 2 ó 4h. Las hormonas disminuyeron el nº de ESP unidos a las CEO a las 2 y 4h ( $p < 0,05$ ). La incubación con un antagonista de CB1 revirtió el efecto del E y la P ( $p < 0,05$ ) mientras que el antagonista de TRPV1 revirtió sólo el efecto del E ( $p < 0,05$ ). Esto sugiere que la AEA estaría involucrada en el mecanismo de acción de E y P en la liberación de los ESP del oviducto. Además se analizó la expresión del ARNm de FAAH y NAPE-PLD, por RT-PCR, y se determinó la producción de AEA por UHPLC/MS-MS en CEO incubadas con E o P durante 2h. Los resultados indicaron un aumento en la expresión del ARNm de NAPE-PLD ( $p < 0,05$ ) mientras que no se observaron cambios en la de FAAH. Asimismo, la concentración de AEA determinada en cultivo fue similar en todos los tratamientos. Los estudios de inmunohistoquímica indicaron que ambas enzimas se localizan en el epitelio oviductal y que la expresión de NAPE-PLD está regulada a lo largo del ciclo estral. La concentración de AEA medida en fluido oviductal bovino fluctúa en el rango nanomolar y los mayores niveles se determinaron en los estadios post-ovulatorios. En conjunto, estos resultados sugieren que las hormonas ováricas participan en la regulación de la selección oviductal de ESP mediada por AEA y podrían estar modulando el camino metabólico de AEA oviductal in vivo.

**213. (683) NUEVAS EVIDENCIAS ACERCA DEL PROCESO DE DESCONDENSACION DEL ESPERMATOZOIDE HUMANO IN VIVO.**

Julianelli V.<sup>1</sup>; Farrando B.<sup>2</sup>; Calvo J.<sup>3</sup>; Calvo L.<sup>4</sup>; Romano M.<sup>5</sup>  
*IBYME<sup>1,2,4,5</sup>; IBYME, FCEN, UBA<sup>3</sup>*  
 vaninaj@gmail.com

La descondensación (desc) del núcleo espermático humano in vivo, ocurriría en presencia de glutatión (GSH) y heparán sulfato (HS). Demostramos presencia de HS en ovocitos maduros e inmaduros murinos. La desc cromatínica involucra tiorreducción de protaminas y su reemplazo por histonas ovocitarias. Se ha propuesto que estos procesos son sucesivos e independientes. Nuestros resultados previos por método indirecto sugieren que heparina (Hep), análogo del HS, coopera con GSH en la tiorreducción durante la desc espermática humana in vitro. 1) Evaluar presencia de HS en ovocitos inmaduros humanos y células del cúmulus (cc) por inmunocitoquímica en pacientes (clínica de fertilidad con CI firmado), utilizando anti-HS monoclonal y anti-IgM-FITC de ratón. 2) Analizar efecto de Hep sobre tiorreducción cromatínica durante desc espermática humana in vitro por método directo. Núcleos espermáticos (donantes OMS) con tiorreductor: 10mM GSH ó 0,1mM DTT 30', con o sin Hep (46uM) durante 5'. Se evaluó estado tiorreducido por tinción con reactivo tiólico cuantificando fluorescencia por Image J. Resultados 1) Localización citoplasmática y nuclear de HS en ambos tipos celulares. 2) La exposición a los tiorreductores aumentó intensidad de marca en núcleos sin cambiar tamaño. El agregado de Hep favoreció desc. promoviendo aparición de núcleos mas grandes y menos marcados debido a pérdida de protaminas. La intensidad de fluorescencia de núcleos no descondensados expuestos a GSH+Hep, aumentó respecto al GSH solo (113±7 vs 68±7 unidades arbitrarias; n=4; ANOVA-Dunn). Esto no se observó con DTT. Demostramos que en la desc cromatínica del espermatozoide humano in vitro, la Hep actúa como aceptor de protaminas y favorece la tiorreducción de las mismas por el GSH. También, demostramos presencia de HS en estadios tempranos del desarrollo folicular humano. Esto correlacionaría con el rol fundamental de esta molécula en el ovocito para asegurar una correcta desc y así una fecundación exitosa.

**214. (731) EVIDENCIAS DE SINERGISMO EN LA DESCONDENSACIÓN DE LA CROMATINA DE ESPERMATOZOIDES MURINOS: EFECTO DEL DERMATÁN SULFATO Y LA HEPARINA.**

Sanchez M.<sup>1</sup>; Fontana V.<sup>2</sup>; Romanato M.<sup>3</sup>; Julianelli V.<sup>4</sup>; Piñeiro De Calvo L.<sup>5</sup>; Calvo J.<sup>6</sup>  
 IBYME<sup>1 3 4 5</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>2</sup>; IBYME, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>6</sup>  
 mel.godine@hotmail.com.ar

**Introducción.** La descondensación cromatínica es fundamental para formar el pronúcleo masculino y permitir singamia. Requiere tiorreducción de disulfuros en protaminas e intercambio con histonas ovocitarias que, en espermatozoides humanos dependería de heparán sulfato. En espermatozoides murinos encontramos que dermatán sulfato (DS) también descondensa la cromatina. Las diferencias observadas entre ambas especies podrían indicar una condensación diferencial de la cromatina. **Objetivos.** Estudiar la descondensación en espermatozoides murinos, utilizando DS, comparando con heparina y evaluar diferencias en el grado de condensación. **Metodología** Los animales se sacrificarán y, en forma aséptica se obtendrán los espermatozoides epididimarios, que serán descondensados con Heparina/DS y GSH durante distintos tiempos a 37 °C. Se fijarán con glutaraldehído 2% en PBS y se determinará el porcentaje descondensación en contraste de fases, clasificando según refringencia, aspecto granuloso y tamaño del núcleo: sin cambios (S), moderadamente descondensados (M), o groseramente descondensados (G). El porcentaje de descondensación será la suma (M+G), por duplicado y evaluando al menos 200 células en cada muestra. **Resultados y conclusiones.** DS induce una descondensación similar al de heparina, con cinética para ambos glicosaminoglicanos semejante (t0.5 = 43.55 + 2.19 min para Heparina y 35.45 + 2.17 min para DS). Sin embargo, combinando ambos, se observa efecto sinérgico con disminución del t0.5 a 17.96 + 1.2 min, correspondiendo a un incremento en descondensación de 3 veces por sobre la suma de los efectos individuales, indicando una interacción diferente de cada GAG con la cromatina, posiblemente debido a las características químicas de las moléculas, como también un probable grado de compactación diferente de la cromatina. Esta compactación diferencial podría incidir en fertilización asistida, cuando observamos fallas en la descondensación.

### ONCOLOGÍA 3

**215. (135) HEMO OXIGENASA 1 (HO-1) MODULA EL ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO DE METÁSTASIS A HUESO DE CÁNCER PRÓSTATA**

Ferrando M.<sup>1</sup>; Meiss R.<sup>2</sup>; De Siervi A.<sup>3</sup>; Navone N.<sup>4</sup>; Vazquez E.<sup>5</sup>  
 Laboratorio de Apoptosis y Cancer, Depto de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 3 5</sup>; Academia Nacional de Medicina<sup>2</sup>; GU Medical Oncology, MD Anderson Cancer Center, Houston, USA<sup>4</sup>  
 <mercedesf@qb.fcen.uba.ar

El cáncer de próstata (PCa) es uno de los tumores más frecuentes entre los hombres en Argentina. Se caracteriza por su capacidad de desarrollar metástasis óseas. En trabajos previos demostramos que la inducción de hemo oxigenasa 1 (HO-1), enzima anti-oxidante y citoprotectora, disminuía la proliferación, migración e invasión en células de PCa in vitro y el crecimiento de tumores in vivo. El objetivo de este trabajo fue estudiar el rol de HO-1 en la interacción de las células de PCa y el hueso y la modulación del estrés oxidativo. Se utilizó un sistema de co-cultivo de células de la línea humana PC3 con osteoblastos primarios de ratón (PMO). Las células de PCa fueron pre-tratadas o no con hemina (inductor específico de HO-1; 80µM, 24h). Por análisis de western blot encontramos un aumento significativo en la expresión de HO-1 en las PMO co-cultivados con PC3 pre-tratadas con hemina. Mediante RT-qPCR se observó un incremento de

1,95 veces (P<0,05) en la expresión de la enzima anti-oxidante catalasa, que se correlacionaba con el aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno determinado por citometría de flujo (14%; P<0,01). Además, se co-cultivaron células PC3 pre-tratadas o no con hemina con explantes de calvarias de ratón. Aunque el análisis histológico de los explantes luego de 7 días de co-cultivo demostró que no había diferencias en la formación de hueso, se detectó un aumento en la inmuno-reactividad positiva de HO-1 en los osteoblastos activos por ensayos de inmunohistoquímica. Todos estos resultados sugieren que la modulación de la expresión y/o actividad de HO-1 en las células PC3 afecta el número de osteoblastos activos, lo que podría impactar en la respuesta ósea del PCa.

**216. (316) INMUNOTERAPIA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES DE CEREBRO: PAPEL DE LAS CÉLULAS B EN LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES**

Candolfi M.<sup>1</sup>; Yagiz K.<sup>2</sup>; Curtin J.<sup>3</sup>; Assi H.<sup>4</sup>; Wibowo M.<sup>5</sup>; Alzadeh G.<sup>6</sup>; Foulad D.<sup>7</sup>; Kroeger K.<sup>8</sup>; Alden A.<sup>9</sup>; Liu C.<sup>10</sup>; Dunn R.<sup>11</sup>; Gislaine M.<sup>12</sup>; Lowenstein P.<sup>13</sup>; Castro M.<sup>14</sup>  
 Instituto de Investigaciones en Reproducción, Fac de Medicina, UBA<sup>1</sup>; Gene Therapy Research Institute, Cedars Sinai Medical Center-UCLA, Los Angeles, CA<sup>1</sup>; Gene Therapy Research Institute, Cedars Sinai Medical Center-UCLA, Los Angeles, CA<sup>2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14</sup>  
 maru.candolfi@gmail.com

El glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más agresivo y frecuente. La administración intratumoral de vectores adenovirales que expresan la citoquina Flt3L y la molécula citotóxica timidina quinasa (TK) desencadena una respuesta inmune antitumoral dependiente de células T que induce regresión tumoral en modelos preclínicos de GBM. El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de las células B en la respuesta inmune antitumoral inducida por la terapia. Mientras que el tratamiento intratumoral con Ad-TK+Ad-Flt3L en ratones wild type (WT) portadores de gliomas intracraneales GL26 indujo un 60% de sobrevida, en ratones Igh6<sup>-/-</sup> (que no poseen células B) la terapia falló por completo, sugiriendo que las células B participan en la respuesta inmune antitumoral inducida por la terapia. Sin embargo, el tratamiento no parece desencadenar una respuesta inmune humoral, ya que no pudieron ser detectados anticuerpos antitumorales circulantes y que la terapia fue igualmente efectiva en ratones WT y en ratones Prdm1flox/flox CD19Cre<sup>+/+</sup> (cuyas células B son funcionales pero no se diferencian a plasmocitos). Por ello, evaluamos si las células B actúan como presentadoras de antígenos en este modelo. El tratamiento con Ad-TK+Ad-Flt3L en ratones WT indujo un incremento en el número de células B que expresan marcadores de coactivación y que se asocian a antígenos tumorales en los nódulos linfáticos cervicales (dLN). Las células B purificadas de los dLN de ratones tratados (pero no de ratones control) estimularon la proliferación de células T in vitro, lo que sugiere que solo las células B de ratones tratados proveen las señales coestimuladoras necesarias para la activación de linfocitos T. Nuestros resultados indican que las células B actúan como presentadoras de antígeno en la respuesta inmune antitumoral inducida por Ad-TK+Ad-Flt3L. Estas observaciones son importantes a la hora de diseñar modalidades inmunoterapéuticas para el tratamiento de cáncer de cerebro.

**217. (377) PARTICIPACION DEL FGF-2 EN EL MECANISMO DE ACCION ANTITUMORAL DE BACILO CALMETTE-GUERIN (BCG) EN UN MODELO DE CANCER DE VEJIGA MURINO**

Langle Y.<sup>1</sup>; Belgorosky D.<sup>2</sup>; Lamb C.<sup>3</sup>; Gongora A.<sup>4</sup>; Baldi A.<sup>5</sup>; Lanari C.<sup>6</sup>; Eijan A.<sup>7</sup>  
 Instituto de Oncología Angel H Roffo, Área de Investigación<sup>1 2 7</sup>; IBYME<sup>3 4 5 6</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 sc de células de CaV murinas MB49, generando tejido fibrótico. In vitro observa-

mos que BCG promueve la muerte de MB49 e induce proliferación y diferenciación de fibroblastos en forma directa o vía factores solubles liberados por los macrófagos, siendo el FGF-2 uno de esos factores. El objetivo fue estudiar la participación del FGF-2 y la expresión de sus receptores (FGFR) en células y tumores MB49 en respuesta a BCG. Las células MB49 son productoras de FGF-2 (western blot), el cual disminuye por el tratamiento con BCG (inmunofluorescencia). El tratamiento con FGF-2 no promueve la proliferación de MB49 ni revierte la muerte inducida por BCG in vitro ( $p < 0,001$ ) (recuento celular). In vivo, FGF-2 (5ng/ratón intra-tumoral) reduce el tamaño de tumores sc MB49 ( $p = 0,0061$ ) y no revierte la inhibición del crecimiento inducida por BCG. En un ensayo piloto in vivo observamos que el anticuerpo bloqueante de FGF-2 DB3 muestra una tendencia hacia la reversión de la inhibición del crecimiento tumoral inducida por BCG. Por inmunohistoquímica observamos una marca citoplasmática para el FGFR-2 y FGFR-3 en el urotelio vesical normal mientras que el tumor MB49 ortotópico o sc expresa intensamente FGFR-3 tanto en el núcleo como en el citoplasma y el tratamiento con BCG reduce dicha expresión. Concluimos que el FGF-2 está involucrado en el tratamiento con BCG activando al estroma y disminuyendo la expresión del FGFR-3 en los tumores MB49. El FGF-2 no revertiría la muerte de las células de CaV inducida por BCG y contribuiría in vivo a la reducción del crecimiento tumoral.

**218. (420) EFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA TRISTETRAPROLINA EN CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS HUMANAS Y MURINAS.**

Goddio M.<sup>1</sup>; Gingerich T.<sup>2</sup>; Lacunza E.<sup>3</sup>; Tocci J.<sup>4</sup>; Fachinetti M.<sup>5</sup>; Curino A.<sup>6</sup>; Lamarre J.<sup>7</sup>; Abba M.<sup>8</sup>; Kordon E.<sup>9</sup>  
 LEGMA, IFIBYNE-CONICET, Dpto Qca Biológica, FCEN, UBA<sup>1,4,9</sup>; Ontario Veterinarian College, University of Guelph, Ontario, Canada<sup>2,7</sup>; CINIBA, Fac de Cs Médicas, UNLP<sup>3,8</sup>; Laboratorio de Biología Básica del Cáncer, INIBIBB-CONICET, Centro Científico Tecnológico, Bahía Blanca<sup>5,6</sup>  
 victoriagoddio@gmail.com

Tristetraprolina (TTP) desestabiliza ARN mensajeros (ARNm) específicos, como algunos asociados a crecimiento e invasividad tumoral. Además, la expresión de TTP se encuentra reducida en diferentes tipos de cáncer. En mamas humanas, analizando datos públicos provenientes de microarreglos de cDNAs y de librerías de SAGE (Serial Analysis Gene Expression) encontramos que la expresión de TTP se encuentra disminuida en carcinomas comparados con glándulas de fenotipo normal. Basados en esto, en estudios que indicaban la capacidad de la prolactina (PRL) de inhibir la invasividad tumoral y en nuestros resultados que mostraban la inducción de TTP durante la lactancia del ratón, postulamos que la PRL podría inducir TTP en células mamarias. Efectivamente, encontramos que esta hormona indujo ARNm de TTP en la línea mamaria murina HC11, en presencia y ausencia de glucocorticoides por, al menos, 24 horas. Esta inducción se produciría por activación a nivel del promotor ya que la PRL aumentó la actividad de luciferasa en HC11 transfectadas con una vector al que se le insertó la secuencia promotora del TTP murino río arriba del gen que codifica para dicha enzima. Hallamos que el factor de transcripción Stat5a es relevante en esta actividad, ya que la co-transfección con un mutante dominante negativo del mismo bloqueó la inducción generada por PRL. En la línea tumoral mamaria humana T47D, PRL también indujo la expresión de TTP, sin embargo, esta inducción resultó ser transiente, al ser evaluada tanto por qRT-PCR como por western blot. Además, el tratamiento con PRL de células transfectadas con un vector reportero al que se le insertó el promotor de TTP humano, sugiere que el mismo sería menos sensible al tratamiento con PRL y a la actividad del Stat5a. Estos resultados sugieren que en células murinas el promotor de TTP es especialmente sensible al estímulo lactogénico, mientras que en células mamarias humanas existen más factores involucrados en la expresión de esta proteína.

**219. (413) ESTUDIO DEL EFECTO TERAPÉUTICO Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LA QUIMIOTERAPIA METRONÓMICA (QTM) CON CICLOFOSFAMIDA (CY) Y DOXORUBICINA**

**(DOX) EN EL MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO M-234P.**

Mainetti L.<sup>1</sup>; Rozados V.<sup>2</sup>; Rico M.<sup>3</sup>; Roggiero E.<sup>4</sup>; Scharovsky O.<sup>5</sup>  
 Instituto de Genética Experimental, Fac Cs Médicas UNR<sup>1,2,3,4,5</sup>  
 leandromainetti@gmail.com

La QTM consiste en la administración crónica de fármacos a intervalos regulares y sin periodos prolongados de descanso. Nuestro objetivo fue evaluar el efecto antitumoral y antimetastásico de la QTM con Cy + Dox en el modelo M-234p y su mecanismo de acción. Ratones hembras BALB/c fueron desafiados con M-234p por vía A) s.c. o B) i.v. En los días 10 (s.c.) y 3 (i.v.) fueron distribuidos en 4 grupos (n= 6-8/grupo): GI-Testigo: 0.2ml solución fisiológica i.p. 3 veces/semana; GII-Cy: 20mg/kg de peso en agua de bebida; GIII-Dox: 0.5 mg/kg, 3 veces/semana i.p.; GIV: igual que GII + GIII. Se determinó volumen tumoral y peso corporal, se extrajo sangre en el día 0 y al final del experimento, para evaluar recuento leucocitario, niveles séricos de VEGF (ELISA) y de células T reguladoras (Citometría de flujo). En tumores extirpados se evaluó apoptosis (TUNEL). En el día 31 el volumen tumoral fue menor en A-GIII y A-GIV que en A-GI ( $P < 0,001$ ) y A-GII ( $P < 0,05$  y  $P < 0,001$ ). La supervivencia en A-GIV fue mayor comparada con A-GI ( $P < 0,001$ ) y A-GIII ( $P < 0,05$ ). El N° de metástasis pulmonares en B-GII y B-GIV fue menor comparados con B-GI ( $P < 0,01$  y  $P < 0,05$ ). En los experimentos A y B, el tratamiento no mostró toxicidad, evaluada por evolución del peso corporal y recuento leucocitario. El nivel sérico de VEGF (día 31) fue menor en los tres grupos tratados respecto del testigo, siendo el de A-GIV el más bajo ( $P < 0,001$ ). El análisis de apoptosis en tumor 1ario mostró valores mayores en A-GIV comparado con A-GI ( $P < 0,05$ ). El nivel sérico de Tregs no difirió entre grupos. 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. La inhibición de la angiogénesis y el aumento de la apoptosis serían algunos de los mecanismos responsables de los efectos terapéuticos obtenidos.

**220. (305) EVIDENCIAS DE CONEXIÓN ENTRE LAS VÍAS WNT/βCATENINA Y TGF/SMADS EN HEPATOCARCINOMA CELULAR (HCC)**

Ceballos M.<sup>1</sup>; Parody J.<sup>2</sup>; Alvarez M.<sup>3</sup>; Ingaramo P.<sup>4</sup>; Carnovale C.<sup>5</sup>; Carrillo M.<sup>6</sup>  
 Instituto de Fisiología Experimental, CONICET<sup>1,2,3,4,5,6</sup>  
 ceballos@ifise-conicet.gov.ar

La vía Wnt/βcatenina está frecuentemente activada en HCC e involucra la acumulación de βcatenina y su migración al núcleo, donde promueve la proliferación uniéndose al factor TCF4. El Interferón α (IFN) posee potencial terapéutico para prevenir y tratar el HCC. El TGFβ (TGF) es un mediador de apoptosis y actúa a través de las proteínas Smads. Una forma de interacción entre las vías Wnt/βcatenina y TGF/Smads es por asociación de Smads con el complejo βcatenina/TCF4. Demostramos anteriormente que IFN y TGF reducen los niveles nucleares de βcatenina y su unión a TCF4, disminuyen proliferación y aumentan apoptosis, en HepG2 y Huh7. Decidimos evaluar los efectos de IFN y TGF (48hs) en HepG2 y Huh7, sobre los niveles proteicos del receptor de la vía Wnt/βcatenina (Frizzled7) y de Smads (inmunoblot), y sobre la asociación Smads/TCF4 (co-inmunoprecipitación). Analizamos también los niveles proteicos de βcatenina y Smads (inmunoblot), luego de tratar las células con Wnt3a (48hs). IFN y TGF disminuyeron Frizzled7 en lisado (HepG2: IFN -66%\* TGF -69%\* Huh7: IFN -64%\* TGF -83%\*), Smads en núcleo (HepG2: Smad2p: IFN -68%\* TGF -85%\* Smad3p: IFN -72%\* TGF -79%\* Smad4: IFN -66%\* TGF -81%\* Smad7: IFN -65%\* TGF -69%\*. Similar en Huh7) y la unión Smads/TCF4 en lisado. Wnt3a aumentó en núcleo los niveles de βcatenina (HepG2: +420%\* Huh7: +880%\*) y Smads (HepG2: Smad2p: +400%\* Smad3p: +350%\* Smad4: +110%\* Smad7: +290%\* Huh7: Smad2p: +1000%\* Smad3p: +800%\* Smad4: +170%\* Smad7: +650%\*). \* $p < 0,05$ . Estos resultados, junto con los anteriores, indican que IFN y TGF no solo atenuan



la vía Wnt/ $\beta$ catenina, sino que también reducen los niveles de Smads y su asociación a TCF4 en líneas de HCC. La activación de Wnt/ $\beta$ catenina con Wnt3a aumenta Smads, indicando que el nivel de estas proteínas está modulado por el estado de dicha vía. La inhibición de la formación de complejos  $\beta$ catenina/TCF4/Smads podría desacelerar la oncogénesis, ya que las citoquinas disminuyen proliferación y aumentan apoptosis.

**221. (165) UN MODELO NOVEL DE DESARROLLO TUMORAL IN VIVO BASADO EN LA SOBRE-EXPRESIÓN DE LA ENZIMA ACIL-COA SINTETASA-4 (ACSL4): SU IMPLICANCIA TERAPÉUTICA.**

Orlando U.<sup>1</sup>; Garona J.<sup>2</sup>; Ripoll G.<sup>3</sup>; Alonso D.<sup>4</sup>; Gómez D.<sup>5</sup>; Duarte A.<sup>6</sup>; Malobert P.<sup>7</sup>; Avagnina A.<sup>8</sup>; Solano A.<sup>9</sup>; Podestá E.<sup>10</sup>

INBIOMED, Depto de Bioquímica Humana, Fac de Medicina, UBA<sup>1 6 7 9 10</sup>; Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ<sup>2 3 4 5</sup>; CEMIC<sup>8</sup>  
ulises\_orlando@yahoo.com.ar

La acil-Co sintetasa ACSL4 se expresa en altos niveles en adenocarcinoma de colon y hepatocelular y en cáncer de mama. Demostramos que la sola sobre-expresión de ACSL4 en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama genera un fenotipo agresivo en estas células. Nuestro objetivo fue desarrollar un modelo novel de cáncer de mama humano en ratones nude que demuestre la acción de ACSL4 en el desarrollo tumoral. Mediante la transfección estable e inducible de la línea MCF-7 con el plásmido conteniendo el cDNA de ACSL4 bajo el control de tetraciclina desarrollamos una línea celular (MCF-7 Tet-off/ACSL4), que exhibe un fenotipo agresivo y aumento de productos de la lipooxigenasa (LOX) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). Se conoce que la inoculación de células MCF-7 en ratones nude no generara tumores in vivo, sin embargo las células MCF-7 Tet-off/ACSL4 desarrollaron tumores, inhibibles por tratamiento con tetraciclina, que alcanzaron un tamaño de 468 mm<sup>3</sup> a los 70 días post inoculación. Estos resultados confirman el papel de ACSL4 en el desarrollo tumoral. Los tumores tienen baja expresión de los receptores de Estradiol y Progesterona e histológicamente son semejantes a los desarrollados por células MDA-MB-231, las que sobre-expresan constitutivamente ACSL4. Los inhibidores de la COX-2 han sido considerados como una gran promesa terapéutica en el tratamiento del cáncer de mama, sin embargo su utilización esta cuestionada debido a sus efectos cardiotoxicos. En este trabajo logramos inhibir el crecimiento de tumores en la línea celular MDA-MB-231, utilizando inhibidores de las enzimas ACSL4, LOX y COX-2 y en concentraciones que per se no tienen efecto antitumoral. El sinergismo observado confirma el papel clave de la acción secuencial de ACSL4, LOX y COX2 en la regulación del desarrollo del tumor y abre nuevas perspectivas terapéuticas basadas en tratamientos combinados para la reducción de masa tumoral, con la potencialidad de disminuir efectos adversos.

**222. (284) EL TEJIDO ADIPOSO HUMANO REGULA EL COMPORTAMIENTO DE CÉLULAS EPITELIALES MAMARIAS HUMANAS TUMORALES Y NO TUMORALES**

Fletcher S.<sup>1</sup>; Sacca P.<sup>2</sup>; Giudice J.<sup>3</sup>; Bruzzone A.<sup>4</sup>; Gonzalez E.<sup>5</sup>; Calvo J.<sup>6</sup>; Pistone Creydt V.<sup>7</sup>

Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, IBYME, CONICET<sup>1 2 3 7</sup>; Laboratorio de Hormonas y Cáncer, IBYME, CONICET<sup>4</sup>; Instituto de Oncología Ángel H Roffo, UBA<sup>5</sup>; Laboratorio de Química de Proteoglicanos y Matriz Extracelular, IBYME, CONICET, Dpto de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>6</sup>  
sabrifletcher@yahoo.com

La interacción epitelio-estroma media el desarrollo mamario y la iniciación y progresión de tumores. El objetivo fue evaluar el efecto de medios condicionados (MCs) de explantos de tejido adiposo humano mamario normal (EANh) y tumoral (EATh) en la proliferación, migración y adhesión en líneas celulares epiteliales mamarias humanas tumorales (MCF-7 e IBH-7) y no tumorales (MCF-10A). Y se evaluó la expresión del proteoglicano vérsican en la línea MCF-7. Se obtuvo tejido adiposo proveniente de mamas

normales y tumorales de pacientes intervenidos quirúrgicamente (consentimiento informado). Se recolectaron MCs de EANh y EATh luego de 24 hs de incubación. Se crecieron las células MCF-10A, MCF-7 e IBH-7, se incubaron con los MCs y se midió proliferación por incorporación de timidina, migración por cicatrización de la herida y cambios en la adhesión sobre placas expuestas previamente a los diferentes MCs. Finalmente se evaluó la expresión de vérsican por inmunofluorescencia en células MCF-7 incubadas con los MCs. Observamos que las células tumorales y las no tumorales aumentaron significativamente la proliferación con respecto al control ( $p < 0,01$ ) luego de incubarlas 24 hs con los MCs de EATh, mientras que no se observaron cambios significativos luego de incubarlas con los MCs de EANh. Los MCs de EATh estimularon la migración de las células MCF-7 e IBH-7 luego de 6hs de incubación ( $p < 0,01$ ). La adhesión de MCF-7 e IBH-7 fue significativamente mayor con los MCs de EANh respecto a los MCs de EATh ( $p < 0,001$ ). Finalmente, se observó un aumento en la expresión de vérsican en células MCF-7 incubadas con los MCs de EATh respecto a células incubadas con los MCs de EANh ( $p < 0,001$ ). Se concluye que el microambiente tumoral co-evolucionaba con el epitelio mutado. La manipulación de la matriz extracelular sería una forma de control de la funcionalidad de una célula, convirtiendo a la matriz en un posible punto de acción para la regulación de la actividad tumoral.

## CARDIOVASCULAR 1

**223. (18) CAMBIOS EN LA RESPUESTA VASODILADORA INDUCIDA POR EL PÉPTIDO NATRIURÉTICO TIPO C EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL: PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO.**

Caniffi C.<sup>1</sup>; Cerniello M.<sup>2</sup>; Mendes Garrido F.<sup>3</sup>; Suárez Di Salvo D.<sup>4</sup>; Sueiro L.<sup>5</sup>; Wenk G.<sup>6</sup>; Arranz C.<sup>7</sup>; Costa M.<sup>8</sup>

Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA, IQUIMEFA, CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>

ccaniffi@ffyb.uba.ar

En estudios previos in vivo mostramos que la infusión de péptido natriurético tipo C (CNP) aumenta la actividad de la óxido nítrico (NO) sintasa (NOS) cardiovascular. Objetivo: estudiar los efectos del CNP, y su interacción con el sistema del NO, sobre el tono vascular en ratas normotensas y espontáneamente hipertensas (SHR). Métodos: Ratas Wistar (W) y SHR macho de 16 semanas de edad fueron sacrificadas por decapitación, se extrajo arteria aorta y se obtuvieron anillos de 3-5 mm de ancho, con y sin endotelio (SE). Se suspendieron en solución Krebs (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37±1°C, pH=7,4), se ajustaron a una tensión basal de 1 g. Se midió tensión isométrica (g) utilizando un transductor de fuerza en presencia de CNP (10-12-10-6M) en anillos precontractados con fenilefrina (10-7-10-5M), con o sin previa incubación con L-NAME (inhibidor de la NOS, 10-5M, 30 min). Se determinó actividad NOS en aorta con 14C L-arginina como sustrato (pmol 14C L-citrulina/g tejido.min). Los resultados se expresaron como media±ESM, n=8/grupo. Análisis estadístico: ANOVA, test a posteriori Bonferroni. Resultados: Tabla: Relajación máxima (Rmáx, %) y potencia (pCE50) del CNP.

	W			SHR		
	CNP	SE+CNP	L-NAME+CNP	CNP	SE+CNP	L-NAME+CNP
Rmáx	81.7±9.1	92.1±8.8	71.6±8.7	95.3±8.6	58.8±6.0*	70.3±4.4*
pCE50	8.99±0.18	6.28±0.06‡	6.15±0.06‡	7.46±0.10‡	6.14±0.04*	6.37±0.06*

\* $p < 0.01$  vs SHR-CNP; ‡ $p < 0.01$  vs W-CNP. La actividad basal de la NOS fue mayor en SHR y el CNP incrementó la actividad en ambos grupos. El aumento de la actividad de la NOS inducido por el CNP en SHR fue menor en comparación con W (W  $\Delta$ (CNP-Basal): 103±11 vs SHR  $\Delta$ (CNP-Basal): 65±7\*; \* $p < 0.01$ ). Conclusiones: La respuesta vasodilatadora inducida por el CNP, mediada en parte por el sistema del NO, está disminuida en los animales hipertensos con respecto a los normotensos. Esta alteración podría contribuir en el desarrollo y/o mantenimiento del estado hipertensivo en este modelo de hipertensión.

**224. (116) CAMBIOS REDOX DEL RECEPTOR DE RIANODINA CARDÍACO (RYR2) EN SITUACIONES FISIOPATOLÓGICAS**

Said M.<sup>1</sup>; Becerra R.<sup>2</sup>; Valverde C.<sup>3</sup>; Mundiña-weilenmann C.<sup>4</sup>; Mattiazzi A.<sup>5</sup>; Vittone L.<sup>6</sup>  
*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CCT-La Plata, Facultad de Cs Médicas, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
*msaid@aetos.med.unlp.edu.ar*

Alteraciones postraduccionales como cambios en la fosforilación y/o en el estado redox de proteínas involucradas en el manejo del  $[Ca^{2+}]_i$ , se reconocen como factores patogénicos en enfermedades del miocardio. Pero el rol potencial de estas alteraciones para las distintas proteínas, no se ha estudiado en profundidad. El objetivo fue investigar si existen cambios redox y de fosforilación durante la injuria reversible por isquemia-reperusión o atontamiento, en una de las proteínas responsables del manejo del  $[Ca^{2+}]_i$  y fundamental para el acoplamiento éxito-contráctil del miocardio: el canal liberador de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplasmático o receptor de rianodina (RyR2). Los experimentos se realizaron en corazones de ratas aislados y perfundidos por la técnica de Langendorff, que se sometieron a un protocolo de isquemia global y reperusión (I/R, 20/30min). Para las detecciones bioquímicas, los corazones fueron congelados al inicio de la reperusión (R1min), momento en el que se describe un aumento del  $[Ca^{2+}]_i$ . Miocitos aislados de rata fueron sometidos a un protocolo de I/R simulada para estudiar las liberaciones espontáneas de  $Ca^{2+}$  o "calcium sparks" a través del RyR2. Encontramos un aumento significativo de la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser2815 (dependiente de la proteína quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina, CaMKII) a R1min, que pudo ser prevenido por el inhibidor específico de la CaMKII, KN-93 (228.5±40.7% R1min vs 97.2±11.1% R1min+KN). La nitrosilación del RyR2 aumentó al mismo tiempo que la fosforilación, de 1±0.14 U.A. (Ctrol) a 3.34±0.72 U.A (R1min)  $p<0.05$ . Estos cambios también se asociaron con un incremento del número de "calcium sparks" (1±0.07 sparks/100µm/seg Ctrol vs 3.5±0.51 sparks/100µm/seg R1min). Proponemos, que los cambios redox y de fosforilación facilitarían la pérdida espontánea de  $Ca^{2+}$  por el RyR2, al inicio de la reperusión. Estas modificaciones contribuirían a la disfunción contráctil presente en el corazón atontado.

**225. (170) LA SOBREEXPRESIÓN CARDÍACA DEL RECEPTOR AT1 DISMINUYE LA RESERVA INOTRÓPICA Y LUSITRÓPICA A TRAVÉS DE LA EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE PKC $\alpha$  Y AKT.**

Matorra L.<sup>1</sup>; Donato M.<sup>2</sup>; Rey Deutsch A.<sup>3</sup>; Rando M.<sup>4</sup>; Casanova V.<sup>5</sup>; Cicale E.<sup>6</sup>; Giani J.<sup>7</sup>; Dominici F.<sup>8</sup>; Turyn D.<sup>9</sup>; Basso N.<sup>10</sup>; Gelpi R.<sup>11</sup>  
*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Cátedra de Patología, UBA<sup>1 2 3 4 10 11</sup>; Bioterio Central, FCV, UBA<sup>5 6</sup>; IQUIFIB, FFyB, UBA<sup>7 8 9</sup>*  
*f\_matorra@hotmail.com*

Evidencia experimental demuestra que en animales transgénicos (Tg), con sobreexpresión del receptor AT1 (RAT1) a nivel cardíaco, presentan un deterioro contráctil. Sin embargo, en este modelo, no ha sido evaluada la reserva inotrópica (RI) y lusitrópica (RL). Por lo tanto, un primer objetivo fue evaluar si la sobreexpresión del RAT1 modifica la RI y RL. Un segundo objetivo, fue relacionar los posibles cambios en RI y RL con la expresión y fosforilación de PKC $\alpha$  y Akt. Finalmente, se considerará si el tratamiento con losartán (LOS) revierte los resultados obtenidos. Se evaluaron ratones no Tg (NTg, n=5), con sobreexpresión del RAT1 (Tg, n=6) y Tg tratados con LOS (50 mg/Kg/día) durante 30 días (TgL, n=6). Se realizó cateterismo cardíaco para evaluar la función ventricular izquierda y se administró isoproterenol (ISO; 56 ng/Kg) para determinar la reserva inotrópica y lusitrópica, que fue evaluada a través de la  $\Delta LVdP/dt_{\max}$  y del t1/2, respectivamente. El grupo Tg tuvo una disminución en RI respecto del grupo NTg (NTg basal: 5.730 ± 244, ISO: 8585±1009; Tg basal: 3.897±209, ISO: 6265±206 mmHg/seg;  $p<0.05$  vs NTg), el tratamiento con LOS mejoró el deterioro en RI (TgL basal: 6425±659, ISO: 9341±494 mmHg/seg;  $p<0.05$  vs Tg). De la misma manera, observamos una

alteración en RL en los animales Tg, que mejoró con LOS (NTg basal: 6.2±0.6, ISO: 4.0±0.2; Tg basal: 8.3±0.4, ISO: 5.9±0.4; TgL basal: 6.3±0.5, ISO: 4.6±0.3 msec,  $p<0.05$  NTg y TgL vs Tg). En los animales Tg se observó un incremento significativo de la expresión y fosforilación de Akt y PKC $\alpha$  que revirtió con LOS. Estos datos sugieren que la sobreexpresión del RAT1 disminuye la reserva inotrópica y lusitrópica a través de la mayor expresión y fosforilación de Akt y PKC $\alpha$ . El tratamiento con LOS revierte tanto las alteraciones funcionales como la expresión y fosforilación de ambas proteínas, demostrando su participación, en los mecanismos deletéreos activados por la sobreexpresión del RAT1.

**226. (206) ACCIONES CELULARES Y MOLECULARES DE TESTOSTERONA EN SISTEMA VASCULAR.**

Campelo A.<sup>1</sup>; Massheimer V.<sup>2</sup>  
*Cátedra de Bioquímica Clínica II, BBYF, UNS, CONICET<sup>2</sup>*  
*acampelo@uns.edu.ar*

Previamente demostramos que en el sistema vascular, las células endoteliales (CE) y musculares lisas (CMLV) son blanco de la acción del andrógeno testosterona (T). En CE, T estimula la proliferación en forma dependiente de óxido nítrico (NO), y en CMLV favorece la movilidad y migración celular. En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares involucrados en estas acciones del andrógeno. Empleando RT-PCR se estudió el efecto del T sobre la expresión de VEGF, proteína reguladora del crecimiento endotelial. Se observó que, en CE, 4 hs de tratamiento con 1nM T aumentó los niveles de expresión de ARNm de VEGF. A 48 hs de tratamiento hormonal, no se detectaron diferencias respecto al control. Siendo el NO un modulador del efecto mitogénico de T, estudiamos la señalización intracelular que conduce al aumento del vasoactivo. La preincubación de las CE con 1µM LY-294002, inhibidor de PI3K, anuló el estímulo de T (4,30 ± 0,83 vs 7,02 ± 0,98; 4,82±0,77 vs 4,31±0,52 nmoles NO/mg prot, C vs T -/+ LY). En CE el aumento en NO involucra la participación del receptor de andrógenos (AR). La presencia de 100nM flutamide (FL, antagonista AR) suprimió el efecto de T (63% vs 5% s/c, T vs T+FL  $p<0,01$ ). Se demostró la especificidad para T. La inhibición con anastrozole (AN) de la aromatasa, no alteró la acción de T sobre la producción de NO. Tampoco fue modificada por presencia de un antagonista del receptor de estrógenos (ICI-182780 10µM) (67%, 60%; 71% s/c T; T+AN; T+ICI respectivamente  $p<0,05$ ). El estímulo de T sobre NO se observó también en CE de ratas adultas ( $p<0,05$ ). En CMLV, T estimuló la síntesis de ADN (incorporación de 3H-timidina), efecto que depende parcialmente de la conversión a estradiol e involucra la participación del AR (45%, 15%, 2% s/c, T; T+ AN; T+FL  $p<0,05$ ). Los resultados presentados aportan evidencias sobre las bases moleculares de la acción de T en la regulación de procesos celulares de alto impacto tanto en la fisiología como en la disfunción vascular.

**227. (562) LA ESTIMULACIÓN VAGAL EFERENTE PRE-ISQUÉMICA AUMENTA EL TAMAÑO DE INFARTO DE MIOCARDIO EN CONEJOS POR CO-ACTIVACIÓN SIMPÁTICA**

Buchholz B.<sup>1</sup>; Rodríguez M.<sup>2</sup>; Höcht C.<sup>3</sup>; Buitrago E.<sup>4</sup>; Perez V.<sup>5</sup>; Donato M.<sup>6</sup>; Gelpi R.<sup>7</sup>  
*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Dto de Patología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 5 6 7</sup>; Departamento de Farmacología, FFyB, UBA<sup>3 4</sup>*  
*bbuchholz@fmed.uba.ar*

La estimulación vagal (EV) prolongada reduce la mortalidad por insuficiencia cardíaca crónica. Sin embargo, no existen datos concluyentes acerca de sus efectos sobre el infarto de miocardio in vivo, cuando la estimulación es aplicada antes de la isquemia. El objetivo fue evaluar los efectos de la EV preisquémica sobre el infarto agudo de miocardio y el sistema nervioso simpático. Para ello se realizó la ligadura de una arteria coronaria por 45 min seguida de 4 hs de reperusión (Grupo 1, n=14). En el grupo 2 (n=9), se repitió el protocolo del grupo 1 aplicándose, antes de la isquemia, EV eferente derecha durante 10 min, seguida de 5 min de recuperación. En el grupo 3 (n=5) se repitió el protocolo

de G2 pero se administró atropina durante la EV. En el grupo 4 (n=6) se repitió el protocolo de G2, pero se administró atenolol (bloqueante adrenérgico  $\beta$ 1). En el grupo 5, se administró atenolol sin EV (n=4). En el grupo 6 (n=5) se repitió el protocolo de G2 pero se administró reserpina 24 horas antes de la EV. El grupo 7 (n=4) recibió reserpina sin EV. Se midieron los niveles plasmáticos de catecolaminas por HPLC y se calculó el consumo de oxígeno a través del triple producto. Los valores se expresaron como la  $X \pm \text{ESM}$ . La EV preisquémica aumentó el tamaño de infarto desde  $45.2 \pm 2.4$  a  $62.9 \pm 3.1$  % ( $p < 0.05$ ). La atropina, el atenolol y la reserpina bloquean el efecto deletéreo de la EV sobre el tamaño de infarto reduciéndolo a  $44.8 \pm 3.9$ ,  $48.5 \pm 2.8$  y  $44.0 \pm 2.6$  %, respectivamente. El atenolol sin EV y la reserpina sin EV no modificaron el tamaño del infarto respecto al grupo control ( $47.5 \pm 1.6$  y  $47.8 \pm 2.2$  %, respectivamente). La EV incrementa significativamente los niveles plasmáticos de catecolaminas y el triple producto. De esta manera, la estimulación vagal eferente preisquémica incrementa significativamente el tamaño de infarto por un mecanismo colinérgico muscarínico y por co-activación simpática.

## 228. (572) LA ENDOTOXEMIA INDUCE BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN CORAZÓN DE RATA

Vanasco V.<sup>1</sup>; Cimolai M.<sup>2</sup>; Evelson P.<sup>3</sup>; Boveris A.<sup>4</sup>; Alvarez S.<sup>5</sup>

*Programa de Radicales Libres en Biología, CONICET, Cátedra de Físicoquímica, FFyB, UBA<sup>1,2,4,5</sup>; Programa de Radicales Libres en Biología, CONICET, Cátedra de Química General e Inorgánica, FFyB, UBA<sup>3</sup>*  
vvanasco@ffybu.uba.ar

La biogénesis mitocondrial puede participar en procesos de recuperación tisular durante la sepsis, permitiendo mantener la función mitocondrial, evitando la iniciación de mecanismos apoptóticos y/o necróticos desencadenados por el desequilibrio energético y disfunción orgánica propios de la etapa final del síndrome. El óxido nítrico (NO) desempeñaría un papel importante en la biogénesis mitocondrial mediante la activación de factores de transcripción, como PGC-1 $\alpha$  y Tfam, involucrados en la iniciación de dichos procesos. El objetivo de este trabajo fue estudiar marcadores moleculares relacionados con la biogénesis mitocondrial desencadenados por aumentos en los niveles de NO y cambios en el estado redox celular durante el transcurso de la endotoxemia. Ratas hembras Sprague-Dawley (45 días), fueron inyectadas con LPS (10 mg/kg, ip), luego de 6 hs se realizaron las determinaciones correspondientes al estado redox; y los parámetros de biogénesis mitocondrial a 6, 9, 12, 18 y 24 hs post tratamiento. Los animales tratados con LPS mostraron un incremento mayor al 200% en los niveles de NO en sangre venosa a partir de las 6 hs. La velocidad de producción mitocondrial de NO aumentó en un 35% (control:  $0.66 \pm 0.07$  nmol/min mg prot.,  $p < 0.05$ ), y el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentaron un 66% (control:  $2.34 \pm 0.25$  nmol/min mg prot,  $p < 0.05$ ) y 68% (control:  $1.20 \pm 0.13$  nmol/min mg prot,  $p < 0.05$ ) respectivamente en mitocondrias de corazón de animales tratados con LPS. Se determinó la expresión de Tfam y PGC-1 $\alpha$ , encontrándose ambos significativamente aumentados respecto del control a partir de las 6 hs post tratamiento. La relación entre la actividad del complejo IV mitocondrial presente en la fracción homogénata y la mitocondrial se encontró significativamente incrementada un 20 % a las 24 hs post LPS, sugiriendo el incremento de la masa mitocondrial. A partir de estos resultados se puede inferir que el proceso de biogénesis mitocondrial, sería uno de los mecanismos involucrados durante este síndrome.

## FARMACOLOGÍA 1

### 229. (57) REGULACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE DROGAS POR BENZINADAZOL EN LA LÍNEA CELULAR MACROFÁGICA THP-1.

Perdomo V.<sup>1</sup>; Rigalli J.<sup>2</sup>; Luquita M.<sup>3</sup>; Pellegrino J.<sup>4</sup>; Echeñique C.<sup>5</sup>; Catania V.<sup>6</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental<sup>1,2,3,4,6</sup>; Área de Parasitología, Fac de Cs Bioq y Farm<sup>5</sup>*  
virginia.perdomo@yahoo.com.ar

Los macrófagos son unas de las primeras células en ser invadidas por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Se desconoce si el antichagásico benznidazol (BZL) modifica la expresión y actividad de proteínas transportadoras de drogas de membrana plasmática y si esto puede afectar su eflujo y su efectividad. OBJETIVO: Evaluar el efecto de BZL sobre la expresión y actividad de proteínas de eflujo de drogas en macrófagos como modelo de célula hospedera del parásito. Para ello, células THP-1, derivadas de una leucemia monocítica humana, se diferenciaron a macrófagos y se trataron con BZL (2, 20 y 200  $\mu$ M, 48 h, n=3) o vehículo (C). Los niveles proteicos de la proteína asociada a resistencia a multidrogas (MRP2) y de P-glicoproteína (P-gp) se detectaron por western blotting. Se observó un aumento dosis-respuesta para ambas proteínas: a la mayor concentración, MRP2: +110% y P-gp: +440% ( $p < 0.05$ ). La actividad de transporte de MRP2 y P-gp (BZL 200  $\mu$ M, 48 h) se evaluó a través del eflujo de sustratos modelos (dinitrofenil-glutatin y rodamina-123, respectivamente). La actividad de transporte de MRP2 (BZL:  $51 \pm 3$  vs. C:  $41 \pm 1$  nmoles/30 min/107 células,  $p < 0.05$ ) se correlacionó con el aumento de proteína. Contrariamente a lo esperado, la cantidad de rodamina-123 liberada al medio en BZL no difirió de C indicando que la P-gp generada por inducción sería inactiva o no se encontraría en membrana plasmática. Por microscopía confocal confirmamos localización intracelular de P-gp. CONCLUSIÓN: el tratamiento con BZL induce la expresión y actividad de dos importantes transportadores de drogas en macrófagos, pudiendo modificar la farmacocinética de otras drogas que son sus sustratos. Además, como P-gp está parcialmente involucrada en el transporte de BZL, su inducción en organelas/vesículas intracelulares, podría hacer que BZL se acumule en un compartimiento intracelular diferente del citosólico llevando a un menor contacto droga-parásito lo cual podría disminuir su efectividad.

### 230. (109) ROL DE LA PROTEÍNA QUINASA A EN EL EFECTO DE DENATONIO Y CICLOHEXIMIDA SOBRE LA SECRECIÓN DE AMILASA EN GLÁNDULA SUBMAXILAR MURINA.

Dasso M.<sup>1</sup>; Diez R.<sup>2</sup>; Sales M.<sup>3</sup>

*CEFYBO-CONICET<sup>1,3</sup>; Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina, UBA<sup>2</sup>*  
maximilianodasso@gmail.com

La transducción de la percepción amarga en tejido gustativo murino está mediada por la activación de receptores acoplados a proteína G, llamados T2R. Estos también se encuentran expresados en el tracto gastrointestinal. Las glándulas salivales murinas pertenecen al aparato digestivo y hemos demostrado previamente por Western blot e inmunohistoquímica que expresan el subtipo de receptor T2R6. Dos compuestos amargos, denatonio (DEN) y cicloheximida (CICLO) que en tejido gustativo murino activan los subtipos T2R8 y T2R5, respectivamente, inhiben la secreción de amilasa en glándula submaxilar (GSM) murina (DEN:  $48.0 \pm 2.9$ %; CICLO:  $50.1 \pm 8.8$ %) con respecto al control (100%). Los dos compuestos inhibieron significativamente la actividad de la PLC, medida como producción de inositol monofosfato (nmol/mg prot.) (DEN:  $2.9 \pm 0.3$ ; CICLO:  $3.0 \pm 0.1$ ; control:  $4.9 \pm 0.1$ ;  $p < 0.001$  vs. control) y aumentaron los niveles de AMPc (pmol/mg prot.) (DEN:  $94.8 \pm 7.5$ ;  $p < 0.05$  vs. control; CICLO:  $188.5 \pm 32.9$ ;  $p < 0.001$  vs. control; control:  $58.1 \pm 7.9$ ). El pretratamiento de la GSM con H-89 (10-5M), un inhibidor selectivo de la proteína quinasa A (PKA) revirtió parcialmente el efecto inhibitorio de DEN sobre la secreción de amilasa (DEN+H-89:  $23.9 \pm 6.4$ %;  $p < 0.001$  vs. DEN) mientras que no modificó el efecto de CICLO. Además, el pretratamiento conjunto de la GSM con H-89 y NCDC (10-5M) un inhibidor no selectivo de la PLC, revirtió totalmente el efecto de DEN, llevándolo al valor control y parcialmente el de CICLO sobre la secreción de amilasa (CICLO+H-89+NCDC:  $79.68 \pm 4.38$ %;  $p < 0.001$  vs. control). Concluimos que en GSM murina DEN y CICLO incrementan los niveles de AMPc, que aumentarían la actividad de la PKA. Esta enzima podría regular negativamente la actividad de la PLC, con la concomitante disminución de la secreción de amilasa.

**231. (150) PROGESTERONA Y MEDROXIPROGESTERONA REGULAN LA FUNCIÓN VASCULAR EN FORMA DIFERENCIAL**

Cutini P.<sup>1</sup>; Massheimer V.<sup>2</sup>

CONICET, Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS<sup>1,2</sup>  
pcutini@uns.edu.ar

La terapia de sustitución hormonal empleada para prevención de enfermedades cardiovasculares en mujeres postmenopáusicas incluye una combinación de estrógenos con progestágenos sintéticos. La génesis de la lesión ateromatosa se caracteriza por un patrón de cambios en los procesos celulares de adhesión plaquetaria, síntesis de compuestos vasoactivos, y migración celular. El objetivo de este trabajo fue comparar los efectos de la progesterona nativa (Pg) y su análogo sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) sobre eventos celulares involucrados en la lesión vascular. Se emplearon células endoteliales (CE) y de músculo liso vascular (CMLV) obtenidas por cultivo primario de explantes a partir de anillos de aorta de ratas Wistar. Para estudiar adhesión plaquetaria, CE crecidas en monocapa fueron tratadas con los esteroides en presencia o ausencia de inductores de adhesión (trombina/LPS), e inmediatamente después se adicionaron plaquetas aisladas de sangre venosa. Empleando un amplio rango de concentraciones (1-100 nM), se observó que Pg inhibió significativamente la adhesión respecto al control ( $p < 0.05$ ), en tanto que MPA la aumentó ( $p < 0.05$ ). El tratamiento con Pg revirtió el efecto de trombina/LPS, mientras que MPA lo potenció (26% vs trombina/LPS,  $p < 0.005$ ). En los estudios de migración celular, ambos esteroides estimularon la movilidad de CMLV luego de 48 hs de tratamiento, siendo mayor el estímulo para Pg ( $51 \pm 6$ ;  $138 \pm 16$ ;  $180 \pm 19$  células/campo, control; MPA 10 nM; Pg 10 nM,  $p < 0.001$ ). Con respecto a la síntesis de vasoactivos, demostramos que tratamientos cortos (15-25 min) con Pg (1-100 nM) estimularon ( $p < 0.02$ ) la síntesis de óxido nítrico (método de Griess) en CE, mientras que el tratamiento con la progestina sintética inhibió significativamente su producción (22-49% por debajo del control, MPA 1-100 nM,  $p < 0.05$ ). En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que a nivel vascular, las acciones bioquímico/celulares de Pg y MPA son diferentes.

**232. (199) LOS RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNA G MODULAN LA EXPRESIÓN DE VEGF-A Y LA ACTIVIDAD DE MMP-2 Y 9 EN LAS CÉLULAS SCA-9.**

Dmytrenko G.<sup>1</sup>; Español A.<sup>2</sup>; Castro M.<sup>3</sup>; Sales M.<sup>4</sup>

CEFIBO-CONICET<sup>2,3,4</sup>  
anchik\_do@hotmail.com

Los receptores acoplados a proteína G (RAPG) forman una familia cuya expresión y actividad están asociadas a procesos patológicos como la tumorigénesis. Previamente demostramos que las células de la línea SCA-9, derivada de un tumor de glándula submaxilar murina, expresan RAPG de gusto amargo (T2R) y muscarínicos. Observamos que la estimulación de estos receptores con sus agonistas sintéticos, denatonio (Dn) y carbacol (Cb) respectivamente, agregados durante 15 min. incrementa la proliferación. Dado que el crecimiento y la progresión de tumores sólidos están asociados al aumento de la neovascularización, estudiamos la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A) por Western blot (Wb), que fue expresado como densidad óptica relativa (D.O.r) y la actividad de las metaloproteasas (MMP) 2 y 9 por zimografía, en las células SCA-9, así como su capacidad para inducir angiogénesis in vivo ( $d = N^\circ$  de vasos/mm<sup>2</sup> piel); también evaluamos la modulación de estos parámetros por los RAPG mencionados. Mediante ensayos de Wb determinamos que las células SCA-9 expresan constitutivamente VEGF-A ( $0,11 \pm 0,01$ ). La estimulación de las células con Cb produjo un  $61,8 \pm 10,8\%$  de aumento en la expresión de VEGF-A ( $p < 0,01$  vs. basal). También aumentó la actividad de las MMP-2 y 9 determinada en los sobrenadantes de cultivo en un  $61,1 \pm 4,4\%$  para MMP-2 a las 12 h y un  $37,61 \pm 2,2\%$  para MMP-9 a las 48h ( $p < 0,001$  vs. control). Además, las células SCA-9 inducen una

respuesta angiogénica positiva ( $2,06 \pm 0,38$ ;  $p < 0,001$  vs. control  $1,23 \pm 0,28$ ). Este efecto se incrementa por el tratamiento de las células con Cb ( $2,80 \pm 0,16$ ) o Dn ( $2,77 \pm 0,39$ ); ( $p < 0,001$ ). Concluimos que la activación de los RAPG modula la expresión de VEGF-A y la actividad de MMP 2 y 9, así como la angiogénesis tumoral inducida por las células SCA-9, lo que los haría un blanco terapéutico en el cáncer.

**233. (446) METODOLOGÍA DE WATER SITES: HERRAMIENTA PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS GLICOMIMÉTICOS CON APLICACIÓN EN PATOLOGÍAS TUMORALES.**

Modenutti C.<sup>1</sup>; Diego G.<sup>2</sup>; Silvia H.<sup>3</sup>; Marti M.<sup>4</sup>

Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología, FFyB, UBA<sup>1,3</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>2,4</sup>  
cmodenutti@ffybu.uba.ar

El Ácido Hialurónico (AH) es un Glicosaminoglicano que se encuentra en la matriz que rodea a células en proliferación o migración y se expresa en altos niveles en una variedad de tumores. CD44, una glicoproteína con función lectina presente en la superficie celular, es el principal receptor para AH. Los oligosacáridos de AH (oAH) son capaces de desplazar la interacción CD44-AH bloqueando así los estímulos de sobrevida y la capacidad migratoria de células tumorales. La estructura de solvatación del sitio de reconocimiento de carbohidratos (CRD) de las lectinas puede ser descrita a partir del clusters de aguas (WS) que se forman sobre la superficie. La interacción entre los residuos del CRD y las moléculas de agua de los WS se asemeja a la interacción entre los grupos OH de los azúcares con estos aminoácidos. Previamente demostramos la capacidad de los WS para predecir la posición de átomos polares del ligando (EWS) para el complejo CD44-oAH. La hipótesis de trabajo fue que a mayor número de EWS para un oligosacárido, más estables serán los complejos con CD44. El objetivo del trabajo fue determinar la capacidad de los EWS para predecir la estabilidad energética de diferentes complejos. Para ello, realizamos simulaciones de Dinámica Molecular con solvente explícito durante 50ns para CD44 y diferentes oligosacáridos (oAH, Quitosano (oQO) y Quitina (oQI)). Calculamos las energías de unión mediante MM-GB (SA) y los EWS para cada caso. Los valores de energía para los complejos CD44-oAH, oQO y oQI fueron de -26,08; -34,97 y -12,04 Kcal/mol respectivamente. El número de EWS fue de 5, 7 y 2 para oAH, oQO y oQI respectivamente. Concluimos que el número de EWS es un buen parámetro para predecir la estabilidad relativa de diferentes complejos CD44-oligosacáridos. La información de los WS puede ser utilizada para proponer glicomiméticos más efectivos que los oAH.

**234. (653) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DEL GLUCOCORTICOIDE DISOCIADO 21-OH-6,19-EPOXIPROGESTERONA**

Orqueda A.<sup>1</sup>; Veleiro A.<sup>2</sup>; Burton G.<sup>3</sup>; Pecci A.<sup>4</sup>

LEGMA-IFIBYNE-CONICET, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1,4</sup>; Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA<sup>2,3</sup>  
aorqueda@qb.fcen.uba.ar

Los glucocorticoides (GCs) son frecuentemente utilizados como antiinflamatorios debido a su capacidad de reprimir la expresión de proteínas proinflamatorias como la ciclooxigenasa-2 (cox-2). Estos efectos son consecuencia, en parte, de la acción transrepresora que los GCs ejercen sobre la actividad de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1, y también de la inducción de la expresión de fosfatasa de proteína-quinasa activadas por mitógenos, como la fosfatasa de especificidad dual-1 (DUSP-1) que inhibe a la proteína-quinasa p38. La activación de p38 provoca un aumento en los niveles de cox-2 al promover la estabilidad de su ARNm y/o activar a NF- $\kappa$ B. En estudios previos, demostramos que el esteroide rígido 21OH-6,19-epoxiprogesterona (21OH-6,19OP) posee actividad glucocorticoide disociada, transreprimiendo la acción de NF- $\kappa$ B y AP-1 sin afectar la expresión de genes que responden a GCs mediante el mecanismo de unión directa de su

receptor al ADN. A fin de caracterizar la acción de este nuevo esteroide, el objetivo de este trabajo fue estudiar su posible acción antiinflamatoria y compararlo con la del GC sintético comercial dexametasona (DEX). Los resultados indican que 21OH-6,19OP inhibe la formación de nitritos en cultivos primarios macrófagos de ratón estimulados con lipopolisacáridos de manera similar a DEX (LPS =  $2,8 \pm 1,3$  veces de inducción; LPS + 21OH-6,19OP =  $1,1 \pm 0,4$ ; n = 5). A su vez, 21OH-6,19OP, al igual que DEX, inhibe tanto la expresión génica de cox-2 inducida por TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  =  $10,1 \pm 3,6$ ; TNF- $\alpha$  + 21OH-6,19OP =  $2,4 \pm 1,0$ ; n = 3) como la fosforilación de p38 (TNF- $\alpha$  + 21OH-6,19OP =  $0,6 \pm 0,3$  respecto a TNF- $\alpha$ ; n = 8) en la línea celular pulmonar humana A549, no siendo esta última acción afectada por la presencia del inhibidor de fosfatasa ortovanadato de sodio. A diferencia de DEX, 21OH-6,19OP no modula los niveles de expresión de la fosfatasa DUSP-1. En su conjunto, 21OH-6,19OP surge como un nuevo glucocorticoide con propiedades antiinflamatorias.

## CARDIOVASCULAR 2

### 235. (119) ROL DE LOS RECEPTORES ALFA1 ADRENÉRGICOS Y DE LA GSK-3BETA EN EL MECANISMO DEL POSCONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Siachoque N.<sup>1</sup>; Buchholz B.<sup>2</sup>; D'annunzio V.<sup>3</sup>; Quiroga A.<sup>4</sup>; Giani J.<sup>5</sup>; Dominici F.<sup>6</sup>; Turyn D.<sup>7</sup>; Donato M.<sup>8</sup>; Gelpi R.<sup>9</sup>  
*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 8 9</sup>; Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas, FFyB, UBA<sup>5 6 7</sup>*  
*nadezda\_ann@yahoo.com*

Diferentes receptores activan el poscondicionamiento isquémico (Poscon), sin embargo, no fue estudiado el rol de los receptores  $\alpha 1$  adrenérgicos ( $\alpha 1$ -ARs). Por otro lado, es conocido que Akt y Gsk-3b participan en el mecanismo del Poscon, pero no es conocido el efecto de la activación de los  $\alpha 1$ -ARs sobre la expresión y fosforilación de estas enzimas. Objetivo: determinar si los  $\alpha 1$ -ARs activan el Poscon a través de la fosforilación de Akt y GSK-3b. Corazones de ratas fueron perfundidos según la técnica de Langendorff y sometidos a 30 min de isquemia y 2 hs de reperfusión (Control; n=6). En un segundo grupo (n=9), se repitió el protocolo del control, pero luego de la isquemia se realizaron 6 ciclos de reperfusión/Isquemia (10 seg; Poscon), seguidos de 2 hs de reperfusión. En el tercer grupo (n=6), se repitió el protocolo de Poscon pero se administró Prazosín (bloqueante  $\alpha 1$ -ARs), durante los ciclos de reperfusión/isquemia. Se evaluó el tamaño de infarto y se determinó la expresión y fosforilación de Akt (citósólica y mitocondrial) y GSK-3b (mitocondrial). El Poscon redujo el TI respecto del control ( $58,1 \pm 5,1$  vs.  $40,1 \pm 2,9\%$ ; p<0,05), mientras que la administración de Prazosín abolió este efecto ( $61,6 \pm 4,5\%$ , p<0,05). No se observaron cambios en la expresión citosólica de Akt, sin embargo el Poscon indujo la fosforilación de la enzima ( $0,91 \pm 0,04$  UA, p<0,05) comparado con el grupo control y Prazosín ( $0,52 \pm 0,14$  y  $0,42 \pm 0,05$  AU). La expresión mitocondrial de Akt disminuyó en el control ( $0,37 \pm 0,05$  UA) y en el tratado con Prazosín ( $0,35 \pm 0,04$ ); mientras que aumentó en el grupo Poscon ( $0,91 \pm 0,20$  UA; p<0,05). La fosforilación de la enzima siguió el mismo patrón que su expresión. La expresión de Gsk-3b mitocondrial fue similar en todos los grupos, sin embargo, el Poscon incrementó su fosforilación ( $0,21 \pm 0,8$  vs  $0,76 \pm 0,14$ ; p<0,05). La administración de Prazosín abolió este efecto. El Poscon reduce el tamaño de infarto activando los  $\alpha 1$ -ARs e induciendo la fosforilación de Akt y Gsk-3b.

### 236. (154) ROL DE LA TIORREDOXINA-1 EN LA INJURIA POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN EN ANIMALES JÓVENES Y ADULTOS.

Perez M.<sup>1</sup>; D'annunzio V.<sup>2</sup>; Kersting S.<sup>3</sup>; Sanchez Villamil J.<sup>4</sup>; Carreras M.<sup>5</sup>; Poderoso J.<sup>6</sup>; Gelpi R.<sup>7</sup>  
*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Dpto de Patología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 7</sup>; Laboratorio de Metabolismo de Oxígeno, Hospital de Clínicas<sup>3 4 5 6</sup>*  
*mavirginiape@yahoo.com.ar*

Ha sido demostrado en animales jóvenes que la tiorredoxina-1 (TRX-1), un antioxidante fisiológico, ejerce un efecto protector frente a la injuria por isquemia y reperfusión (R). Dado que el estrés oxidativo se incrementa durante la adultez. Objetivos: Evaluar el tamaño de infarto y la función ventricular en ratones con isquemia/reperfusión y sobreexpresión de TRX-1 (TRX-1 in) a los 3 y 12 meses comparando con su control no transgénico (NT); y evaluar la actividad de TRX-1 en los diferentes grupos de ratones de 3 y 12 meses. Se utilizaron corazones aislados e isovolúmicos de ratones TRX-1 in y sus respectivos NT perfundidos según la técnica de Langendorff. Se realizaron 4 protocolos: NT 3 y 12 meses; TRX-1 in 3 y 12 meses. Los corazones fueron sometidos 30 min de isquemia y 60 min de R. Se evaluó la respuesta desarrollada del ventrículo izquierdo (PDVI), la presión diastólica final del VI (PDFVI). Se midió el tamaño de infarto y se evaluó la actividad de TRX-1 en animales TRX-1 in de 3 y 12 meses. En la tabla se expresan los resultados como  $X \pm ES$  \*p<0.05 vs NT 3 meses; #p<0.05 vs TRX-1 in 3 meses.

Grupos	PDVI (mmHg)		PDFVI (mmHg)		Infarto (%)	Actividad de TRX-1 (UA)	
	Basal	60 min R	Basal	60 min R			
NT 3 meses (n=6)	73,9 ± 7,6	21,1 ± 5,9	8,7 ± 0,8	22,8 ± 4,9	42,8 ± 6,0		
TRX-1 in 3 meses (n=6)	77,1 ± 11,5	18,5 ± 4,2	18,5 ± 2,1	21,3 ± 5,9	27,6 ± 3,5*	1,0 ± 0,0	
NT 12 meses (n=5)	81,7 ± 8,4	31,3 ± 12,8	9,8 ± 3,7	23,7 ± 4,7	52,6 ± 5,2		
TRX-1 in 12 meses (n=5)	72,5 ± 6,5	28,7 ± 6,8	11,4 ± 1,7	28,8 ± 5,3	49,1 ± 6,3	0,57 ± 0,02#	

La sobreexpresión de TRX-1 redujo significativamente el tamaño del infarto en ratones de 3 meses, sin cambios en la recuperación de la función ventricular (PDVI y PDFVI). Este efecto no se observó en ratones TRX-1 in de 12 meses y fue atribuido al 50% de disminución de actividad de TRX-1. Nuestros datos indican que en los animales de 12 meses, la mayor expresión de TRX-1, no se traduce en un efecto protector miocárdico debido a la inactivación temporal de esta enzima.

### 237. (168) EXPRESIÓN DE ADIPONECTINA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO

Scribano Parada M.<sup>1</sup>; Baez M.<sup>2</sup>; Becerra F.<sup>3</sup>; Binchi M.<sup>4</sup>; Balceda A.<sup>5</sup>; Moya M.<sup>6</sup>; Tarán M.<sup>7</sup>  
*Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Cs Médicas, UNC<sup>1 3 5 7</sup>; Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Cs Médicas, UNC, IICSHUM (UNLaR)<sup>2 6</sup>; Laboratorio Labac<sup>4</sup>; Becaria SECyT<sup>7</sup>*  
*pachiscribano@hotmail.com*

La adiponectina posee propiedades antiaterogénicas y antiinflamatorias, ya que estimula la formación de óxido nítrico e inhibe la proliferación celular, mediante la supresión de la formación de especies reactivas de oxígeno. La disminución de dicha proteína generaría aumento del proceso inflamatorio vascular e incrementaría las lesiones aterogénicas en un modelo experimental de síndrome metabólico (SM) y aterogénico por hiperfibrinogenemia (HF). Determinar la cuantificación plasmática de adiponectina podría indicar la carga aterogénica en un modelo experimental de SM asociado a aterogénesis inducida por HF. Se utilizaron 72 ratas machos Wistar: control(A), HFx30ds(B); HFx60ds(C), SM(D), SM+HF(E), HF+SM(F). La HF se realizó por laparotomías medianas y paramedianas, una cada 7 días en el grupo de 30 días y cada 15 días en el grupo de 60 días. SM se indujo por administración de fructuosa al 10% diluida en agua de bebida durante 30 días. Adiponectina (ug/dL) se determinó por Radioinmunoensayo. Los resultados se analizaron por ANOVA y Hotelling como test poshoc, nivel de significación p<0,05. Al comparar las concentraciones de adiponectina en los diferentes grupos observamos una disminución significativa de dicha proteína en todos los grupos (B)( $7,45 \pm 0,43$ ), (C)( $6,79 \pm 0,18$ )(p<0,001), (D)( $8,34 \pm 0,2$ ), (E)( $8,64 \pm 0,32$ ) y (F)( $9,57 \pm 0,28$ )(p<0,01) en comparación con el grupo (A)( $11,17 \pm 0,11$ ). La adiponectina suprime la proliferación y migración de células musculares lisas a la pared vascular, así como la capacidad fagocítica de los monocitos, células claves en la progresión y la formación de la lesión aterogénica. La disminución observada incrementaría la respuesta inflamatoria reflejado por la HF que generaría engrosamiento y aumento de la

proliferación de células musculares lisas arteriales. Valores bajos de adiponectina podría ser un nuevo marcador biológico para la asociación entre síndrome metabólico, sus complicaciones y el riesgo aterogénico aumentado.

### 238. (184) MODIFICACIONES EN LA CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME METABÓLICO

Becerra F.<sup>1</sup>; Baez M.<sup>2</sup>; Balceda A.<sup>3</sup>; Scribano Parada M.<sup>4</sup>; Signorini F.<sup>5</sup>; Bilbao J.<sup>6</sup>; Moya M.<sup>7</sup>; Tarán M.<sup>8</sup>  
*Cátedra de Física Biomédica, FCM, UNC<sup>1 4 5 6 8</sup>; Cátedra de Física Biomepédica, FCM, UNC, IICSHUM (UNLaR)<sup>2 3 7</sup>; Becaria SECyT<sup>8</sup>*  
 bflorchis@gmail.com

El síndrome metabólico (SM) es una entidad con una clínica multifactorial, incrementando al asociarse con otros factores de riesgo como la hiperfibrinogenemia (HF). El SM implica inflamación y estrés oxidativo (EO) pudiendo repercutir en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial. Se analizó la actividad de complejos mitocondriales I, II, III y IV para determinar la importancia del estrés oxidativo. Se utilizaron ratas Wistar: control (A), SM (B) y SM+HF (C) (n=12 en cada grupo). El SM se indujo por administración de fructosa al 10% diluida en agua de bebida durante 6 semanas. HF se indujo por injuria tisular (1xsemana). Se validó el estado de SM determinando insulina, glucemia, triglicéridos y HOMA. Se analizó la actividad de complejos enzimáticos mitocondriales por técnicas espectrofotométricas. Para realizar la estadística se utilizó ANOVA multivariado, estableciendo p<0.05 como nivel de significación.

	Control (A)	SM(B)	SM + HF (C)
Citrato sintetasa(moles CoA.min.mgprot)	0,36±0,01	0,25±0,003	0,07±0,01
CI(μmoles NADH.min.-mgprot)	0,0646±0,013	0,021±8*103	0,1516±0,009
CIII(μmoles succinato.min.-mgprot)	5,66 <sup>11</sup> ±3,8 <sup>12</sup>	6,40*10 <sup>19</sup> ±3,2*10 <sup>16</sup>	1,1 <sup>19</sup> ±5 <sup>11</sup>
CIII(μmoles Ubiquinona.min.-mgprot)	0,2617±0,022	0,4578± 0,05	0,234±0,013
CIV(μmoles Ferrocitocromoc.min.-mgprot)	0,1712±0,017	0,2016±0,055	0,233±0,01

Media±ES: CI:(A)vs(B):p<0.001, (A)vs(C):p<0.001, (B)vs(C):p<0.001. CII:(A)vs(B):NS, (A) vs(C):p<0.001, (B)vs(C):p<0.001. CIII:(A)vs(B):p<0.001, (A)vs(C):p<0.01, (B)vs(C):p<0.001. CIV:(A)vs(B):p<0.001, (A)vs(C) p<0.001, (B)vs(C):p<0.001.

El SM se asocia con elevados niveles de marcadores oxidativos causando disminución de la actividad de todos los complejos mitocondriales, lo cual produciría daño a biomoléculas constituyendo un mecanismo fisiopatogénico adicional para aumentar la carga aterogénica, debido a que la resistencia a la insulina induce a la dislipidemia con importante participación de las LDL-oxidadas retenidas en la íntima aórtica y aumento de células espumosas.

### 239. (236) EL SISTEMA DE LA TRH CARDIACO: NOVEL MEDIADOR DE LA ACCIÓN HIPERTRÓFICA Y FIBRÓTICA INDUCIDA POR AII?

Peres Diaz L.<sup>1</sup>; Landa M.<sup>2</sup>; Gonzales Mansilla N.<sup>3</sup>; Alvarez A.<sup>4</sup>; Dovijo J.<sup>5</sup>; Pirola C.<sup>6</sup>; Garcia S.<sup>7</sup>  
 Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo A Lanari, UBA- IDIM-CONICET<sup>1 2 4 6 7</sup>; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo A Lanari, UBA- IDIM-CONICET<sup>3 5</sup>  
 peresdiazls@yahoo.com.ar

El sistema de la TRH cardiaco participa en el desarrollo de hipertrofia cardiaca (HC) en ratas SHR. Su inhibición impide el desarrollo de HC (Hypertension 2011) y su sobre expresión induce un corazón hipertrofiado en la rata. Es conocido que la AII además de vasopresora es proinflamatoria e induce hipertrofia y fibrosis cardiaca. Realizamos en ratones C57 adultos infusión continua de angiotensina II (AII) (bomba ip. 2 mg/kg/día) vs. fisiológica (SF) durante 7d, y evaluamos los daños en dos grupos de animales, uno al que previamente se le inhibió el sistema de TRH a través de una inyección intracardiaca de un siRNA específico contra el precursor de TRH (siRNA-TRH) vs uno con el sistema de TRH cardiaco intacto (siRNA-Con). Registramos el peso corporal, la PAS, y el consumo de agua basal y 7d. Al sacrificio, se extrajo el corazón y se midió T3 y T4. A partir del RNA total se cuantificó la expresión del mRNA de preTRH, su receptor tipo I (r-TRH I),

colágeno III, BMHC, BNP y TGF-B por PCR en tiempo real.El tratamiento con AII indujo un aumento (p<0.05) de la PAS 7d en AII+siRNA-Con y AII+siRNA-TRH vs. PAS basal evidenciando su efectividad. La AII indujo un aumento (p<0.05) de la expresión de TRH sólo en el grupo AII+siRNA-Con, verificándose la efectividad del bloqueo del sistema mediante siRNA-TRH. No hubo cambios en el índice hipertrófico probablemente debido a la corta duración del experimento; aún así a los 7d, la AII indujo un aumento (p<0.05) de la expresión del mRNA de BNP, BMHC, colágeno III y TGF-B en el grupo AII+siRNA-Con, aumento que no se observó en el grupo con el sistema de la TRH cardiaco bloqueado previo al tratamiento, grupo que presento una expresión de los marcadores de daño cardiaco similar a los animales que recibieron SF, salvo en el caso del TGF-B que permaneció aumentado. Estos resultados sugieren que es necesario un sistema de TRH cardiaco intacto para la acción promotora del daño cardiaco (hipertrofia y fibrosis) de la AII en roedores.

### 240. (237) EFECTOS DE LA WORTMANINA (W) SOBRE LAS ACCIONES BENEFICIOSAS DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO EN CORAZONES DE RATA PERFUNDIDOS LANGENDORFF SOMETIDOS A ISQUEMIA GLOBAL-REPERFUSIÓN.

Torresin M.<sup>1</sup>; Velez 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>  
 etorresin@gmail.com

El preconditionamiento isquémico (PCI) es una de las intervenciones más poderosas que disminuye el daño por isquemia-reperfusion. Muchas son las señales moleculares involucradas en las acciones protectoras del mismo. El objetivo del siguiente trabajo fue investigar la participación de la fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) en los efectos beneficiosos del PCI. Se trabajó con corazones de rata perfundidos Langendorff sometidos a 25 min I (isquemia)-60 min RP (reperfusion). El PCI consistió en cuatro ciclos de 5 min de I y 5 min de RP, antes de los 25 min de isquemia global total. La wortmanina (W) (100 nM) se suministró en el medio de perfusión 5 minutos antes de comenzar el protocolo de PCI hasta finalizar la isquemia global total. Se evaluó la contractilidad por medio de la determinación del producto presión sistólica por frecuencia cardíaca (PxP), las velocidades de contracción y de relajación (±dP/dt) y se midió la presión diastólica final (PDF). Se determinó la liberación de creatina kinasa (CK) al medio durante los primeros 10 minutos de reperfusion. La estadística se hizo con ANOVA (n=8 / grupo). Coincidiendo con trabajos anteriores, el PCI mejoró la recuperación postisquémica de la contractilidad, mientras que la W disminuyó los efectos beneficiosos del PCI anulando las diferencias con el grupo control (C) (PxP (%) a los 10 min de RP: C 23,9±6,4; C+W 14,8±6,7; PCI 53,2±6,8\*; PCI+W 20,57±8,4; \* p<0,05 vs C, C+W y PCI+W). Se observó un aumento de la PDF en los PCI tratados con W (PDF (%) a los 10 min de RP:C 19,5±5,9; PCI 7,22±2,6\*; C+W 35,2±13,1; PCI+W 20,7±7,9; \* p < 0,05 vs C, C+W y PCI+W). Disminuyó la liberación de CK en los PCI y no modificó dicho perfil el empleo de W (CK (U/gh) C 38,6±2,8; PCI 22,6±5,0\*; C+W 38,4±5,1; PCI+W 25,7±4,6\*; \* p < 0,05 vs C y C+W). Estos resultados sugieren la participación de la PI3K en los efectos beneficiosos funcionales del PCI.

### 241. (246) RESPUESTA AL ISOPROTERENOL DE AURICULAS AISLADAS DE RATA SOMETIDAS A ISQUEMIA SIMULADA-REPERFUSION EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE 3-METILADENINA

Hermann R.<sup>1</sup>; Torresin M.<sup>2</sup>; Marina Prendes M.<sup>3</sup>; Savino E.<sup>4</sup>; Varela A.<sup>5</sup>  
 Cátedra de Fisiología, FFYB, UBA, IQUIMEFA-CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 rhermann@ffyb.uba.ar

Trabajos anteriores mostraron que en aurículas izquierdas aisladas de rata sometidas a isquemia-reperfusion simuladas (Is-Rs),

la 3-metiladenina (MA), inhibidor específico de la autofagia, careció de efectos sobre la fuerza pico de contracción y la viabilidad celular, pero incrementó el desarrollo de contractura durante la Is y los primeros minutos de la Rs. Por otro lado, se observó la aparición de arritmias severas durante la Rs sólo en presencia del inhibidor. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta contráctil al agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol (ISO) 2  $\mu$ M, de la aurícula izquierda de rata, luego de ser sometida a Is-Rs en ausencia y en presencia de MA. Se emplearon aurículas izquierdas aisladas de ratas hembras Sprague-Dawley estimuladas a 60 pulsos/minuto, registrándose la fuerza sistólica pico (FS) y la fuerza diastólica final (FD). Los preparados se montaron isométricamente e incubaron en medio Krebs-Ringer bicarbonato, conteniendo glucosa 10 mM, gaseado con O<sub>2</sub> 95%-CO<sub>2</sub> 5%, pH 7,4, mantenidos a una temperatura de 31°C. Luego de 60 min de estabilización, se inició la Is 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. Se empleó ANOVA, n=5. La máxima respuesta contráctil (expresada como porcentaje con respecto a la FS desarrollada antes del agregado de ISO entre 10-9 y 10-5M) en aurículas sometidas a aerobiosis, se obtuvo a partir de ISO 1  $\mu$ M. La FS aumentó a 201,00  $\pm$  28,41 % luego del agregado de ISO al medio de incubación de aurículas sometidas a 210 min de aerobiosis. Cuando el ISO fue agregado al medio de incubación de las aurículas sometidas a Is-Rs en presencia de MA se observó una menor respuesta contráctil que la observada en ausencia de MA (156,75  $\pm$  15,82 vs 301,00  $\pm$  32,02 %; p<0,01). El ISO no modificó la FD en ningún caso. Los resultados sugieren que, bajo estas condiciones experimentales, la MA disminuye la reserva contráctil de la aurícula aislada de rata luego del período experimental de Is-Rs.

**242. (352) EFECTO DEL TRATAMIENTO DE DISTINTAS DOSIS DE PROANTOCIANIDINAS EXTRAÍDAS DE LIGARIA CUNEIFOLIA (PLC) 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 T.<sup>5</sup>; Monti J.<sup>6</sup>; Frances D.<sup>7</sup>; Wagner M.<sup>8</sup>; Carnovale C.<sup>9</sup>; Luquita A.<sup>10</sup>

*Cátedra de Biofísica, Fac Cs Médicas, UNR<sup>1 2 3 4 10</sup>; Fisiología, Cs Bioquím y Farm, UNR, CONICET<sup>5 6 7 9</sup>; Farmacobotánica, FFyB, UBA<sup>8</sup>*  
adominighini@arnet.com.ar

La infusión de Lc o "muérdago criollo" es utilizada en medicina popular para dar mayor fluidez a la sangre disminuyendo el colesterol plasmático (Copl). Anteriormente demostramos que ratas tratadas con extracto crudo de Lc por vía intraperitoneal (i.p.), disminuye el Copl y aumenta la viscosidad sanguínea (VS), mientras que las tratadas con PLC en una dosis de 3mg/100g de peso corporal, disminuye el Copl sin modificar las VS. Objetivo: analizar el efecto del tratamiento con distintas dosis de PLC sobre la concentración de Copl y la VS. Métodos: Ratas Wistar macho adultas endocriadas (n=24), de 70 días de edad, tratadas de acuerdo a normas internacionales, 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=6) inyectadas i.p. con solución fisiológica y Tratadas (T) inyectadas i.p. con PLC 1,5 mg(n=6) y 6 mg(n=6) /100g peso corporal, cada 24 horas durante 3 días. Al cuarto día las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg peso corporal, i.p.), se les extrajo sangre por punción cardíaca. Se determinaron Copl (método enzimático de esterasa-oxidasa), CoHDL, y CoLDL. También VS y plasmática (VP) con viscosímetro rotacional Wells-Brookfield LVT- a 230 s-1, a 37 °C. La VS relativa estandarizada a un hematocrito del 45% (VSrs), se calculó como (VS/VP)45/Hto. Resultados: (media  $\pm$  ES). Copl (mg%): C : 108,54  $\pm$  2,21, T1,5: 71,56  $\pm$  3,64\* T6: 67,66  $\pm$  1,17\*; CoHDL: C : 25,00  $\pm$  0,74 ; T1,5:22,10  $\pm$  2,37\* T6: 18,75  $\pm$  0,95\*; CoLDL : C:25,60  $\pm$  0,81 ;T1,5:13,59  $\pm$  1,08\* T6:18,00  $\pm$  0,36\* (\*p<0,05 ) VSrs: C:5,98 $\pm$ 0,19, T1,5: 6,26 $\pm$ 0,39ns, T6: 7,05 $\pm$ 0,46 ns (ns: no significativo vs C). Conclu-

sión: Se ha obtenido una fracción de Lc que produce descenso de Co plasmático, CoHDL y CoLDL, sin modificar la fluidez sanguínea en ratas hipercolesterolémicas.

**243. (358) RELACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO C677T DEL GEN DE LA METILEN TETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN VARONES Y MUJERES.**

Turk Noceto P.<sup>1</sup>; Morales A.<sup>2</sup>; Gariglio L.<sup>3</sup>; Potenzoni M.<sup>4</sup>; Porcile R.<sup>5</sup>; Fridman O.<sup>6</sup>

*Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, UAI<sup>1 2</sup>; Hospital Universitario, UAI<sup>3 4 5</sup>; Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, UAI, CONICET<sup>6</sup>*

paulita\_turk@hotmail.com

La homocisteína (Hcy) es un factor de riesgo vascular independiente. Su remetilación a metionina es regulada por la enzima 5,10-metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La sustitución de C por T en el nucleótido 677 del gen MTHFR se asocia a hiperhomocisteinemia. Se evaluó la relación entre este polimorfismo y la Hcy plasmática (tHcy) en normotensos (NT) e hipertensos (HT) y la influencia de sexo y edad. Métodos: Estudio transversal sobre sujetos convocados en tres centros de salud de la Ciudad de Buenos Aires. El diagnóstico de hipertensión fue recabado de la historia clínica considerando la existencia de tratamientos antihipertensivos. Se midió tHcy por quimioluminiscencia y la mutación C677T por PCR-RFLP. Estadística: Test "t" Student o ANOVA y test LSD para parámetros y Chi cuadrado y análisis de regresión logística para no parámetros. Resultados: Se incluyeron 236 sujetos (68 varones y 168 mujeres). No hubo diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre NT e HT y tampoco entre los que presentaron tHcy por debajo y por encima de la mediana, tanto en la población total como estratificados por sexo y/o edad. Las tHcy fueron mayores en varones que en mujeres, en la población total y en los portadores del alelo T (p<0.01). En varones mayores de 47 años (mediana) tHcy fue más elevada que en menores independientemente del genotipo (p<0.05), pero en mujeres la tHcy más alta se observó solo en las mayores de 47 años con el alelo T (p<0.05). También solo en mujeres mayores, las HT presentaron tHcy más alta que las NT entre las portadoras del alelo T (p<0.05). Conclusiones: Se observó una asociación entre el polimorfismo C677T MTHFR y la tHcy con la hipertensión arterial que en mujeres se manifiesta con la edad. Dado que otras causales, como dieta y estado hormonal, modifican la expresión fenotípica de esta variante genética, las diferencias género y edad específicas observadas podrían deberse a la actividad endócrina. PIP CONICET 5716.

**244. (586) EFECTOS DEL EJERCICIO INTENSO SOBRE LA HIPERTROFIA MIOCÁRDICA Y LA RESERVA INOTROPICA EN RATONES TRANSGÉNICOS CON SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA GS $\alpha$ .**

Wilensky L.<sup>1</sup>; González G.<sup>2</sup>; Matorra L.<sup>3</sup>; Morales M.<sup>4</sup>; Gelpi R.<sup>5</sup>

*Instituto de Fisiopatología Cardiovascular<sup>1 2 3 4 5</sup>*

lucianawilensky@hotmail.com

Es conocido que la actividad física produce efectos beneficiosos reduciendo factores de riesgo cardiovascular y modificando favorablemente estados patológicos previamente establecidos como la hipertensión, el infarto de miocardio y la insuficiencia cardíaca. El objetivo fue estudiar en ratones no transgénicos (noTG) y transgénicos (TG) con sobreexpresión cardíaca específica de la proteína Gs $\alpha$  e hiperactividad simpática, aspectos funcionales e histológicos producidos por el ejercicio (E) intenso. Se realizaron 4 grupos: noTG (n=4): ratones sedentarios; TG (n=5): ratones sedentarios; noTG+E (n=7): ratones que realizaron ejercicio que consistió en 2 sesiones/día de 90 minutos de natación, 6 días/semana y TG+E (n=7): ratones que realizaron el mismo protocolo de ejercicio. A las 4 semanas, los animales fueron anestesiados y cateterizados registrándose la función ventricular basal y la respuesta al isoproterenol (ISO, 56ng/Kg). Luego de la eutanasia, los corazones fueron procesados para su estudio histológico. El

cociente peso del ventrículo izquierdo (mg)/longitud de la tibia (mm), índice de hipertrofia, fue  $5.1 \pm 0.4$  en noTG,  $5.5 \pm 0.3$  en TG,  $6.8 \pm 0.2$  en noTG+E ( $P < 0.05$  vs noTG) y  $6.7 \pm 0.3$  en TG+E ( $P < 0.05$  vs TG). El E no modificó el estado inotrópico basal respecto a sus controles, mientras que en respuesta al ISO, la  $+dP/dt_{max}$  se incrementó  $63 \pm 10\%$  en noTG,  $34 \pm 2\%$  en TG ( $P < 0.05$  vs. noTG),  $36 \pm 7\%$  en noTG+E ( $P < 0.05$  vs. noTG), y  $36 \pm 7\%$  en TG+E ( $P < 0.05$  vs TG). El colágeno fue similar entre los grupos. De esta manera, los ratones TG desarrollan hipertrofia miocárdica secundaria al ejercicio similar a los noTG. La reserva inotrópica se mantiene conservada en los TG, aunque partiendo de un valor control más elevado y disminuida en los noTG. Estos datos sugieren que el ejercicio crónico intenso podría ejercer un efecto deletéreo independiente de la hiperactividad simpática secundaria a la sobreexpresión de Gs $\alpha$ .

#### 245. (647) EL AUMENTO DE CORTISOL SÉRICO SE ASOCIA CON LA ACTIVIDAD DE MMP-2 EN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO

Miksztovcz V.<sup>1</sup>; Fernandez Machulsky N.<sup>2</sup>; Fabre B.<sup>3</sup>; Gonzalez D.<sup>4</sup>; Garcia Escudero A.<sup>5</sup>; Blanco F.<sup>6</sup>; Riccitelli M.<sup>7</sup>; Gagliardi J.<sup>8</sup>; Berg G.<sup>9</sup>

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto de Bioquímica Clínica, FFyB, UBA<sup>1 2 9</sup>; Laboratorio de Endocrinología, Depto Bioquímica Clínica-INFIBIOC, FFyB, UBA<sup>3 4</sup>; Sección Hemodinamia, División Cardiología, Hospital Argerich<sup>5 6 7 8</sup> veronicamik@fyb.uba.ar

El infarto agudo de miocardio (IAM) es un evento traumático, asociado con disfunción neuroendócrina y aumento de liberación de cortisol. Las metaloproteasas (MMPs) son collagenasas que degradan la matriz extracelular y se asocian con vulnerabilidad de la placa aterosclerótica. El efecto de los glucocorticoides sobre la actividad de MMPs es controversial y se desconoce su asociación con IAM. Objetivo: evaluar el comportamiento del cortisol, MMPs y marcadores de inflamación en pacientes hospitalizados con IAM, desde la internación hasta tres meses posteriores. Se realizó un estudio prospectivo, en pacientes hospitalizados por IAM y tratados con angioplastia coronaria ( $n=49$ ,  $57 \pm 12$  años). En suero obtenido al momento de la hospitalización, 24 hs, 7 días y tres meses se determinó cortisol, perfil lipoproteico, glucosa y PCRhs. Se midieron peso, talla, tensión arterial y circunferencia de cintura. En plasma se midió actividad de MMP-2 y 9. El cortisol se encontró aumentado en el momento del IAM, descendiendo a partir de las 24 hs ( $37$  ( $50-10$ ) vs  $14$  ( $47-4$ ),  $p < 0.001$ ) y manteniéndose posteriormente constante. PCRhs presentó aumento significativo a 24 hs y 7 días del IAM ( $p < 0.001$ ). MMP-2 presentó máxima actividad en la internación respecto a 7 días y 3 meses (AR:  $1.02 \pm 0.11$  vs  $0.92 \pm 0.12$  vs  $0.82 \pm 0.13$  respectivamente,  $p < 0.0001$ ). PCRhs correlacionó positivamente con el cortisol en el momento del infarto ( $r=0.34$ ;  $p < 0.03$ ), a las 24 hs ( $r=0.30$ ;  $p < 0.05$ ), 7 días ( $r=0.57$ ;  $p < 0.0001$ ) y 3 meses ( $r=0.35$ ,  $p < 0.05$ ), y la actividad de MMP-2 con PCRhs y cortisol a los 7 días del IAM ( $r=0.45$  y  $r=0.46$  respectivamente;  $p < 0.05$ ). En el IAM se observa aumento temprano de cortisol que desciende a valores normales hacia el tercer mes. La posible desregulación del eje hipotálamo hipófiso adrenal que causa aumento en la secreción de cortisol estaría asociada, tal vez mediante un mecanismo inflamatorio, con aumento en la actividad de MMPs, y a través de este con vulnerabilidad de la placa aterosclerótica.

#### 246. (730) CONOCIMIENTO DE ESCALAS DE EVALUACIÓN INICIAL DE ATAQUE CEREBROVASCULAR POR MÉDICOS DE GUARDIA

García Zamora S.<sup>1</sup>; Elias R.<sup>2</sup>; Panero Schipper N.<sup>3</sup>; Palameta F.<sup>4</sup>; Parodi R.<sup>5</sup>; Gallo R.<sup>6</sup>; Greca A.<sup>7</sup>  
Hospital Provincial del Centenario<sup>1 2 5 6 7</sup>; Estudiante de Medicina<sup>3 4</sup>  
gzssebastian@hotmail.com

La Asociación Americana del Corazón propone el empleo de la escala prehospitalaria del ataque cerebral -ACV- de Cincinnati (CPSS) y la escala de evaluación prehospitalaria del ataque ce-

rebral de Los Ángeles (LAPSS) para evaluar sujetos con posible ACV. Trabajos que analizaron el valor de ellas fueron realizados principalmente entre paramédicos y en ámbito prehospitalario. Nos propusimos evaluar el grado de conocimiento de ellas por médicos de guardia y su opinión respecto al valor que éstas podrían tener sobre su práctica. Se encuestaron 569 médicos de guardia durante el período diciembre 2008 – marzo 2009. La edad promedio fue de  $32.6 \pm 7.8$  años, con un promedio de años de graduados de 6. Un 33,2% no tenían especialidad, 36,2% se encontraban realizándola y 30,6% ya la habían completado. Al evaluar un paciente con posible ACV el 38,5% refirió sentirse muy seguro, el 53,8% moderadamente seguro y el 7,7% inseguro. El 32,3% manifestó conocer las escalas, pero solamente el 8,4% pudo enumerar los puntos de CPSS, un 1,9% pudo hacerlo con LAPSS y el 0,7% con ambas. En el subgrupo de neurólogos, neurocirujanos, emergentólogos e intensivistas ( $n=31$ ) un 35% pudo enumerar alguna de ellas. Quienes recordaban una o ambas escalas manifestaron sentirse más seguros al evaluar un posible ACV ( $p=0,02$ ); ninguno de los que recordaban LAPSS manifestó sentirse inseguro. Quienes se sentían menos seguros fueron los que atribuyeron más beneficios a las escalas ( $p=0,0003$ ). Los no especialistas las consideraron más útiles ( $p=0,005$ ), mientras que el subgrupo de intensivistas y afines juzgaron menos ventajosas a las escalas ( $p=0,002$ ). El 89% refirió que las escalas beneficiarían su práctica y un 98% querría contar con un sistema de formación-actualización continua. Concluimos que ambas escalas son consideradas de valor por médicos de guardia, especialmente entre no especialistas. Debido al elevado desconocimiento de estas, enfatizamos la necesidad de alcanzar una mayor difusión de las mismas.

### NEUROCIENCIAS 3

#### 247. (664) HYPERGLYCEMIA PREDISPOSED CEREBRAL TISSUE AND PLASMA TO AGE FORMATION AND APOPTOSIS

Silva L.<sup>1</sup>; Remor A.<sup>2</sup>; Matos F.<sup>3</sup>; Glaser V.<sup>4</sup>; Martins R.<sup>5</sup>; Holh A.<sup>6</sup>; Bem A.<sup>7</sup>; Latini A.<sup>8</sup>

Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>  
luciladebortoli@yahoo.com.br

The diabetic encephalopathy is one of the prominent characteristic of diabetes mellitus. A representative experimental model is the streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat, in which we investigated brain and blood biochemical parameters. Additionally, it was investigated whether this experimental model induces the accumulation of methylglyoxal-induced advanced glycation end products (AGE-MG), a major pathophysiological pathway in the pathogenesis of diabetes complications. Finally, the accumulation of AGE in samples from normo- (NPD) and hyperglycemic (HPD) diabetic patients was assessed (Ethical committee for human studies: CEPESH/435/09). Hyperglycemic rats were induced by administering a single STZ dose (55 mg/kg), and afterwards the rodents were divided into two groups; one of them remained hyperglycemic for 60 days (STZ) and the other received insulin (twice/day; STZ+INS), in order to control blood glucose concentrations. Proper controls were run in parallel. Blood glucose concentration was control each ten days, and the rat body weight every day. Diabetic rats showed body weight reduction, which was prevented by insulin administration until the thirtieth day of treatment. Hyperglycemic STZ rats showed increased immunoreactivity towards AGE-MG in rat brain (increase of 297%), which was prevented by insulin administration [ $F(2,37)=6.30$ ;  $P < 0.01$ ]. The cleavage of caspase-3 also was markedly increased in STZ rats (increase of 598%) [ $F(2,52)=32.45$ ;  $P < 0.001$ ], however the induction of apoptosis was not prevented by the tight blood glucose control. On the other side, plasma AGE content was increased in plasma from HPD, when compared to NPD [ $t(10)=3.26$ ;  $P < 0.01$ ]. These data indicate that brain DNA oxidation and induction of apoptosis, both possibly triggered by AGE accumulation, might be involved in the pathogenesis of the characteristic neuropathy



of diabetes mellitus, and that early and continuous insulin therapy is necessary to maintain proper brain metabolism.

**248. (669) EL ACETATO DE GLATIRAMER REVIERTE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL HIPOCAMPO DE RATONES BALB/C EXPUESTOS A ESTRÉS CRÓNICO MODERADO.**

Juarez Y.<sup>1</sup>; Gonzalez-murano M.<sup>2</sup>; Genaro A.<sup>3</sup>; Palumbo M.<sup>4</sup>  
CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
yami\_86@yahoo.com.ar

Tanto el estrés oxidativo como la producción de óxido nítrico (NO) han sido involucrados en varios procesos patofisiológicos en el cerebro incluyendo la respuesta al estrés. El acetato de glatiramer (GA) es un polímero sintético de aminoácidos que puede reaccionar débilmente con autoantígenos residentes en el SNC y estimular los efectos de protección y reparación de células T autoreactivas. En trabajos previos observamos que la exposición a estrés crónico moderado (CMS) indujo en ratones BALB/c una menor capacidad de aprendizaje y memoria que pudo ser revertida con la administración de GA. En el presente trabajo investigamos el efecto del GA sobre el estrés oxidativo en hipocampo (área involucrada con el aprendizaje y la memoria) de ratones BALB/c expuestos a CMS. Observamos en homogenatos de hipocampus provenientes de ratones CMS un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) ( $p < 0,001$ ). Con respecto a la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS), los ratones CMS presentaron una menor producción de NO principalmente debido a la disminución de la actividad de la isoforma neuronal, nNOS ( $p < 0,001$ ). 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 estresados. La administración de GA (100 mg por inyección s.c., 4 veces durante 3 semanas), después de 6 semanas de estrés crónico, revirtió los efectos inducidos por el CMS con respecto a la producción de ROS ( $p < 0,001$ ) y NO ( $p < 0,01$ ), mientras que no produjo cambios en los niveles de las defensas antioxidantes con respecto a los ratones estresados. 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 CMS. Además indican que el GA es capaz de revertir tanto la producción de ROS como de NO en ratones estresados, sin afectar las defensas antioxidantes.

**249. (680) IMPLICANCIAS DEL RECEPTOR ET-A EN LA REGULACIÓN DE LA TIROSINA HIDROXILASA EN BULBO OLFATORIO DE RATAS HIPERTENSAS DOCA-SAL.**

Guil M.<sup>1</sup>; Morales V.<sup>2</sup>; Soria C.<sup>3</sup>; Hope S.<sup>4</sup>; Bianciotti L.<sup>5</sup>; Vatta M.<sup>6</sup>  
Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA, IQUIMEFA, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 6</sup>; Cátedra de Fisiopatología, FFyB, UBA<sup>5</sup>  
mjuliaguil@hotmail.com

Recientemente demostramos que las ETs administradas exógenamente en los BO modulan la actividad y expresión de la tirosina hidroxilasa (TH) de manera diferencial en animales normotensos e hipertensos DOCA-Sal. Sobre estos antecedentes nuestro objetivo fue evaluar el papel de las ETs endógenas centrales en la modulación de la TH y su relación con la hipertensión arterial en el modelo DOCA-Sal. Para este objetivo se evaluó el bloqueo central agudo del receptor ETA sobre la presión arterial (PA), la frecuencia cardíaca (FC) y la actividad (Técnica Radioenzimática) y expresión (Western blot) de TH en los BO de ratas hipertensas DOCA-Sal. El antagonista del receptor ET-A, BQ-610 (20µM, 1µl/min) se administró vía intracerebroventricular. Se determinó la PA y FC durante 90 min. y luego los animales se sacrificaron, determinándose en los BO la actividad de TH y los niveles totales y formas fosforiladas de la enzima. Los resultados se expresan como % vs Control (ANOVA y test de Student-Newman-Keuls,  $p < 0,05$ ; n: 3-4). Los datos muestran que el BQ-610 disminuye la PA y FC en ratas DOCA-Sal ( $p < 0,05$ ). El antagonista ETA no reduce la actividad del BO Control mientras que en los animales hipertensos, cuyos valores se encuentran aumentados ( $p < 0,05$ ), disminuye a valores normales. Los niveles de TH se encuentran

elevados en animales DOCA-Sal al igual que las cantidades de p-Ser19, p-Ser31 y p-Ser40 ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  y  $p < 0,001$  vs. Control respectivamente). En ratas controles tratados con el BQ-610 no se observan diferencias significativas vs. Control, mientras que en los animales hipertensos los niveles de TH total, p-Ser 31 y p-Ser 40 disminuyen a valores normales ( $p < 0,001$ ;  $p < 0,001$  y  $p < 0,01$  vs. DOCA-Sal, respectivamente). Estos resultados demuestran una relación entre la hipertensión arterial en este modelo y la interacción entre ETs y TH a nivel del los BO.

**250. (687) PARTICIPACIÓN DEL NO Y DEL RECEPTOR CANNABINOIDE TIPO I (CB1) EN EL HIPOCAMPO DE RATAS ESTRESADAS CRÓNICAMENTE Y SUS POSIBLES CONSECUENCIAS EN EL COMPORTAMIENTO.**

Burdet B.<sup>1</sup>; Maur D.<sup>2</sup>; De Laurentiis A.<sup>3</sup>; Rettori V.<sup>4</sup>; Zorrilla Zubilete M.<sup>5</sup>  
Primera Cátedra de Farmacología, Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Medicina, CEFYBO-UBA-CO-  
NICET<sup>1 2 5</sup>; Laboratorio de Neuroendocrinología, CEFYBO-  
UBA-CONICET<sup>3 4</sup>  
bereburdet@hotmail.com

La relación entre el estrés prolongado y la aparición de trastornos psiquiátricos como la depresión y la ansiedad ha sido bien establecida. El hipocampo es una de las estructuras límbicas del cerebro implicadas en la fisiopatología de los trastornos del humor y se ha demostrado que el óxido nítrico (NO), radical libre producido por el óxido nítrico sintasa (NOS), participa en dichos procesos. Además, se ha demostrado una función reguladora del sistema endocannabinoide en la respuesta al estrés. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del estrés crónico por inmovilización en el comportamiento y su relación con la señalización del NO y del sistema endocannabinoide. Con este objetivo se llevó a cabo la prueba de campo abierto, se evaluó la actividad de la NOS y la expresión del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) en el hipocampo. El estrés por restricción del movimiento se aplicó a ratas macho adultas Sprague-Dawley por dos horas diarias durante 7, 14 o 21 días consecutivos (7d, 14d o 21d respectivamente). Los resultados muestran un incremento de CB1 en los niveles proteicos a los 14d respecto a los animales estresados a los 7d. La actividad de la NOS total a los 7d de estrés se redujo significativamente respecto a los animales controles y a los estresados por 14d. Por otra parte, todos los animales estresados mostraron una reducida habituación en la prueba de campo abierto. Estos hallazgos sugieren que los cambios en los niveles de NO y de la expresión de los receptores de CB1 en el hipocampo podrían estar relacionados con el déficit en la habituación inducido por el estrés. (BID-OCR-AR, PICT-06-0258)

**251. (703) REMODELADO SINÁPTICO Y DESBALANCE DE LAS MOLECULAS DE ADHESIÓN INDUCIDO POR HIPERESTIMULACION GLUTAMATERGICA: SU CORRELACION CON UN MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESION**

Podesta M.<sup>1</sup>; Codagnone M.<sup>2</sup>; Yam P.<sup>3</sup>; Colman D.<sup>4</sup>; Reines A.<sup>5</sup>  
Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA, CONICET-UBA) y Cátedra de Farmacología, FFyB, UBA<sup>1 2 5</sup>; Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University<sup>3 4</sup>  
podestamf@ffyb.uba.ar

La disfunción de la plasticidad hipocampal podría contribuir a la etiología de la depresión. Previamente reportamos que animales expuestos a un modelo experimental de depresión presentan una dramática disminución hipocampal de marcadores sinápticos como sinaptofisina (SYN) y PSD-95, y de las moléculas de adhesión NCAM y PSA-NCAM. Dado que los antagonistas glutamatérgicos previenen la atrofia dendrítica registrada en el hipocampo de dichos animales, se ha propuesto que el incremento en la liberación de glutamato podría ser un mecanismo subyacente. Por ello fue objetivo de este trabajo explorar in vitro la participación de glutamato en la disminución de los marcadores sinápticos y de las moléculas de adhesión observada en estos animales. La ex-

posición a glutamato de neuronas hipocámpales en cultivo indujo atrofia dendrítica sin muerte neuronal. La atrofia se determinó a las 24 horas por medio de la reducción de la inmunomarcación para MAP-2, marcador específico dendrítico. La ausencia de muerte neuronal se evidenció por la preservación de la morfología nuclear y la sobrevida neuronal. El tratamiento con glutamato transformó el patrón clásico de las conexiones sinápticas en un perfil discontinuo sugiriendo alteraciones en la adhesividad. Respecto a la inmunomarcación para SYN, PSD-95, NCAM y PSA-NCAM, se registraron disminuidas. Por medio de la técnica de live-imaging por microscopia confocal se evidenciaron cambios en el árbol dendrítico y en el patrón de conexiones entre las 4 y 5 hs posteriores al tratamiento. Sorprendentemente PSA-NCAM disminuyó a las 3 hs mientras que la reducción de NCAM y MAP-2 se registró horas más tarde. De esta manera, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la hiperactividad glutamatérgica podría subyacer a la atrofia dendrítica y a la reducción de las moléculas de adhesión, induciendo remodelado sináptico en el hipocampo de animales expuestos a un modelo experimental de depresión.

**252. (705) NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICOS DEL HIPOTÁLAMO. CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE SUS NEURONAS POR LA ACCIÓN DE LA DEHIDROEPIANDROSTERONA.**

Torres M.<sup>1</sup>; Puyo A.<sup>2</sup>; Taira C.<sup>3</sup>; Carranza A.<sup>4</sup>  
FFyB, Facultad de Medicina, UBA, CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
torres\_suarez@ffyub.uba.ar

Los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) ubicados en el hipotálamo, funcionan como marcapaso central para los ritmos circadianos. La hormona dehidroepiandrosterona (DHEA), el principal precursor del beta-estradiol, es neuroprotectora y llega a través de la barrera hematoencefálica al sistema nervioso central o es producida por los astrocitos. Nuestro objetivo fue analizar la morfología (superficie y número de neuronas) del NSQ en encéfalos de ratas tratadas con DHEA y controles. Se utilizaron ratas Sprague-Dawley macho de 250 g, que fueron divididas en 2 grupos: Control (C, n=6) y DHEA (D, n=6, DHEA 15 mg/kg/día, subcutáneo) durante 9 semanas. Se determinaron la trigliceridemia (TG) y la glucemia por kits comerciales y la presión arterial sistólica (PAS) por método indirecto para evaluar algunos efectos metabólicos y hemodinámicos de la DHEA. Los cerebros de los animales fueron fijados en formol, se realizaron cortes histológicos de 8 µm que fueron teñidos con la técnica de Nissl. La superficie neuronal y conteo del área estudiada se realizó con un analizador de imágenes (Micrometrics SE Premium). El tratamiento con DHEA no modificó la PAS (mmHg, C: 115±2 vs. D: 118±3, ns) ni la glucemia (mg/dl, C: 88±6 vs D: 79±1, ns) pero disminuyó los TG (mg/dl, C: 101±14 vs D: 37±5, p<0.01). El área neuronal fue significativamente mayor en el grupo D que el grupo C (µm<sup>2</sup>, C: 383±34 vs. D: 647±28; p<0.001) en tanto que el número de neuronas no se modificó (C: 283±12 vs D: 331±18). Los resultados obtenidos al analizar los NSQ permiten evidenciar que la DHEA produjo un aumento de las superficies neuronales en esta área relacionada con los mecanismos de adaptación ante cambios ambientales.

**253. (707) EFECTO DE LA OVARIECTOMÍA SOBRE LA EXPRESIÓN HIPOTALÁMICA DE TIROSINA HIDROXILASA, RECEPTORES HORMONALES Y COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE PRL EN RATAS LACTANDO.**

Campo Verde Arbocco F.<sup>1</sup>; Bonafede M.<sup>2</sup>; Pennacchio G.<sup>3</sup>; Soaje M.<sup>4</sup>; Valdez S.<sup>5</sup>; Jahn G.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU, CCT<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
farbocco@mendoza-conicet.gob.ar

Los esteroides ováricos son hormonas clave en la regulación hipotalámica de secreción de PRL, actuando en las neuronas TIDA. Los niveles elevados de progesterona (P4) de la lactancia en la rata son incapaces de inhibir la secreción de PRL inducida por succión. Sin embargo, la ovariectomía (OVX) en el 2º día postparto restituye la capacidad inhibitoria de P4. Nuestro objetivo fue analizar si estos cambios en la regulación hipotalámica

de la secreción de prolactina en la lactancia en respuesta a la privación de esteroides ováricos por OVX están mediados por cambios en la expresión de receptores (R) y de componentes de la vía de señalización de PRL. Grupos de 7-8 ratas Wistar hembras de 3 meses de edad se ovariectomizaron en los días 2 (L2) o 10 (L10) de lactancia, se sacrificaron en L12 y se diseccionó el hipotálamo medio basal para aislar ARN y proteínas. Se analizó el nivel de expresión de ARNm por PCR en tiempo real con primers específicos para: R de estrógeno (ER) α y β, de PRL (PRLR) y progesterona (PR) A+B y B, STAT5b, SOCS1, SOCS3, CIS y tirosina hidroxilasa (TH) y el nivel de expresión de proteínas para ERα, PR y TH por Western blot. Se aplicó ANOVA y test "t" y se consideró significativo un p< 0,05. La OVX en L2 y L10 disminuyó (p< 0.05) el nivel de ARNm de RPRL, SOCS-3, Stat5b y PR B, pero no tuvo efecto en el nivel de ARNm de TH, ERα, CIS y PR A+B. A nivel de proteína, la expresión del RE y de TH no cambió por OVX en L2 o L10 y el RP4 A aumentó solamente en el grupo OVX L10 (p < 0.05). Estos resultados sugieren que la privación de hormonas ováricas por OVX en L2 o L10 reprime la expresión de RPRL, Stat5b, SOCS-3 y RP estos dos últimos posiblemente compensarían la disminución del RPRL y mantendrían constante la expresión de TH tanto a nivel de ARNm como de proteína y la actividad de las neuronas TIDA. Este equilibrio se establece rápidamente, ya que los efectos de la OVX en L2 o L10 son similares excepto para el RPA que podría inducirse transitoriamente.

#### ONCOLOGÍA 4

**254. (51) EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE GALECTINA-8 Y SU LIGANDO CD166: RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA DUCTAL MAMARIO.**

Cardenas Delgado V.<sup>1</sup>; Bravo A.<sup>2</sup>; Nugnes L.<sup>3</sup>; Nuñez M.<sup>4</sup>; Russo F.<sup>5</sup>; Troncoso M.<sup>6</sup>; Rabinovich G.<sup>7</sup>; Wolfenstein-todel C.<sup>8</sup>; Elola M.<sup>9</sup>

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas<sup>1 3 6 8 9</sup>; Hospital Interzonal General de Agudos "Eva Perón"<sup>2 5</sup>; Cátedra de Bioestadística-FFyB-UBA<sup>4</sup>; IBYME-CONICET<sup>7</sup>  
vmanuel\_cd@yahoo.com.ar

La galectina-8 (Gal-8) es una proteína que une carbohidratos caracterizada por poseer secuencias de aminoácidos consenso y dos dominios de reconocimiento de carbohidratos b-galactósidos. En tumores, varias galectinas están involucradas en la regulación del crecimiento, la agresividad y la adquisición del fenotipo metastático. Previamente demostramos que Gal-8 está presente en tumores humanos y que la interacción entre Gal-8 y CD166 en células endoteliales produce un efecto pro-angiogénico. Son nuestros objetivos: 1-Examinar la expresión de Gal-8 en epitelio mamario humano normal y tumoral mediante inmunohistoquímica (n=40/grupo) 2-Cuantificar dicha expresión mediante los índices I=Intensidad de tinción (0-4), P=% de células epiteliales teñidas (0-100) e IxP (resume las observaciones de las variables citadas). 3-Analizar la localización subcelular de la lectina en epitelio mamario normal y tumoral. 4-Relacionar estos resultados con la progresión del carcinoma ductal mamario. 5-Estudiar la co-localización de Gal-8 y su ligando CD166 en las líneas celulares BAEC, MDA-MB-231, T47D, MCF-7 y en tejido epitelial mamario normal y tumoral. Se demostró que Gal-8 se expresa en el epitelio normal (IxP=1,1±0,4), en hiperplasia (1,6±0,6, p<0,05), en carcinoma ductal "in situ" (2,1±0,6, p<0,05) y en carcinoma ductal infiltrante (1,8±0,5, p<0,05). El índice IxP reflejó diferencias altamente significativas entre tejidos normales y de carcinoma ductal "in situ". Además, se observó para esta lectina una localización nuclear y citoplasmática en epitelio normal, la cual se torna citoplasmática conforme avanza la progresión tumoral. Gal-8 y CD166 se expresan con diferente intensidad en las líneas celulares citadas, detectándose co-localización de ambas señales en el citoplasma, lo cual también ocurre en tejido epitelial mamario. En resumen, nuestros resultados sugieren que la expresión de Gal-8 está significativamente aumentada en carcinoma ductal comparado con el tejido normal.

**255. (56) LA ISOFORMA "A" DE GALECTINA-8 (GAL-8A) PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS.**

Nugnes L.<sup>1</sup>; Cárdenas Delgado V.<sup>2</sup>; Gentilini L.<sup>3</sup>; Troncoso M.<sup>4</sup>; Rabinovich G.<sup>5</sup>; Wolfenstein-todel C.<sup>6</sup>; Compagno D.<sup>7</sup>; Elola M.<sup>8</sup>

*Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, FFyB, UBA<sup>1 2 4 6 8</sup>; Laboratorio de Glicómica Estructural y Funcional, FCEN, UBA<sup>3 7</sup>; IBYME-CONICET-UBA<sup>5</sup> lorena.nugnes@gmail.com*

Galectina-8 (Gal-8) es una lectina caracterizada por poseer dos dominios que unen carbohidratos y 7 isoformas ("Gal-8a-g") generadas por "splicing" alternativo. Demostramos previamente que Gal-8 posee efecto pro-migratorio y pro-angiogénico en células endoteliales. Se desea evaluar la influencia de Gal-8 en el proceso metastásico del cáncer de mama y estudiar si el "splicing" alternativo cambia durante la progresión tumoral. Son nuestros objetivos: 1-Examinar la expresión de Gal-8 total en las líneas celulares tumorales mamarias MDA-MB-231, T47D y MCF-7 mediante RT-PCR en tiempo real. 2-Cuantificar la expresión de la isoforma Gal-8a en células MDA-MB-231, T47D y MCF-7 mediante RT-PCR cuantitativa. 3-Determinar el rol de la isoforma Gal-8a en la migración de células MDA-MB-231. Mediante RT-PCR en tiempo real, se demostró una mayor expresión de Gal-8 total en las células de carcinoma mamario invasivo MDA-MB-231 respecto a las otras dos líneas no invasivas. Para analizar la expresión de la isoforma Gal-8a, se realizó una cuantificación mediante qPCR con una curva de calibración utilizando un plásmido que contiene dicha secuencia de cDNA. Así, se detectó que las células MDA-MB-231 poseen 2 y 12 veces más transcripto específico de la isoforma Gal-8a que las células T47D y MCF-7, respectivamente. Por ende, la isoforma a está más expresada en las células de carcinoma mamario más invasivas. Posteriormente, se estudió la migración de células MDA-MB-231 estimuladas con Gal-8a (0-10 nM). Se efectuó el "ensayo de la herida", realizando una cinética de migración a tiempos 0, 4, 8, 12 y 24 hs, y en presencia o ausencia de azúcares inhibidores (lactosa). Los resultados de migración (12 hs) fueron: Gal-8 (10 nM):  $66,9 \pm 11,9$ ; control:  $28,7 \pm 5,4$ ; Gal-8 (10 nM) + lactosa:  $32,2 \pm 10,1$  % de cierre de la herida. Concluyendo, la isoforma Gal-8a induce significativamente ( $p < 0,05$ ) la migración de células tumorales mamarias MDA-MB-231, siendo este efecto dependiente de glicanos.

**256. (95) MEDIO CONDICIONADO DE UNA LÍNEA DE CÁNCER COLORRECTAL INHIBE LA PROLIFERACIÓN E INDUCE APOPTOSIS EN LINFOCITOS CD8+.**

Bottino M.<sup>1</sup>; Madorsky Rowdo F.<sup>2</sup>; Aris M.<sup>3</sup>; Levy E.<sup>4</sup>; Mordoh J.<sup>5</sup>

*Fundación Instituto Leloir<sup>1 2 3 5</sup>; Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA<sup>4</sup> mbottino@leloir.org.ar*

En la actualidad, no se conoce aún con claridad qué rol cumple el infiltrado linfocitario en los tumores colorrectales. En un trabajo reciente (1), se ha observado que los pacientes que poseen alta densidad de linfocitos de memoria y citotóxicos en el infiltrado y margen tumoral presentan mayor tiempo libre de enfermedad y mejor sobrevida. El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de factores solubles producidos por la línea de cáncer colorrectal HT-29 sobre la proliferación y activación linfocitaria. Con ese fin, obtuvimos medio condicionado (MC) de la línea HT-29, que fue concentrado y utilizado para tratar linfocitos totales aislados de sangre periférica de dadores sanos. El tratamiento con concentraciones crecientes de MC HT-29 produjo una disminución significativa de la proliferación medida por ensayos de incorporación de timidina tritiada (control:  $11.357 \pm 1.768$  cpm vs MCHT-29  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ :  $8.733 \pm 630$  cpm,  $p < 0,01$ ; control vs MCHT-29  $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ :  $3.927 \pm 646$  cpm,  $p < 0,001$ ). Al analizar apoptosis por medio de ensayos de Anexina V-Ioduro de Propidio, observamos una tendencia a la inducción de apoptosis ante el tratamiento con MC HT-29 durante 48hs. Con el fin de determinar cuál era la población linfocitaria más afectada, aislamos linfocitos CD4+ y CD8+, y estudiamos

los efectos del MC sobre ambos. En ensayos de proliferación, fueron los linfocitos CD8+ los que mostraron mayor respuesta al tratamiento con MC (control:  $3.161 \pm 412$  cpm vs MCHT-29  $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ :  $2.254 \pm 204$  cpm,  $p < 0,001$ ; control vs MCHT-29  $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ :  $283 \pm 110$  cpm,  $p < 0,001$ ) y observamos un aumento de la apoptosis en esta población (% de células Anex+ control:  $3,9 \pm 3,1$  vs MCHT-29  $1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ :  $31,3 \pm 5,4$ ,  $p < 0,01$ ). Estos resultados demuestran la existencia de factores inhibitorios para linfocitos CD8+, que las células de cáncer colorrectal liberan al medio y serían capaces de bloquear su acción antitumoral. (1) Pages, F. y col. J.Clin.Oncol., 27: 5944-5951, 2009.

**257. (97) ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO DE NUEVOS DERIVADOS DIPEPTÍDICOS DE ALA PARA SU USO EN TERAPIA FOTODINÁMICA.**

Di Venosa G.<sup>1</sup>; Rodriguez L.<sup>2</sup>; Mamone L.<sup>3</sup>; Gándara L.<sup>4</sup>; Battah S.<sup>5</sup>; MacRobert A.<sup>6</sup>; Batlle A.<sup>7</sup>; Casas A.<sup>8</sup>

*CIPYP, CONICET, Hospital de Clínicas José de San Martín, UBA<sup>1 2 3 4 7 8</sup>; National Medical Laser Centre, Royal Free and University College Medical School, University College London, London, UK<sup>5 6</sup> gabrieladivenosa@yahoo.com.ar*

La Terapia Fotodinámica (TFD) se basa en la acumulación de un fotosensibilizante en células tumorales, y al iluminar la zona fotosensibilizada se destruye el tumor. La síntesis endógena de porfirinas a partir del ácido 5-aminolevulínico (ALA) ha ampliado el uso de la TFD pero su eficacia está limitada por la hidrofobicidad del ALA. El objetivo fue testear dos derivados hidrofóbicos dipeptídicos de ALA: AcLeuALAME y AcPheALAME, in vitro en dos líneas celulares, PAM212 y su derivada transfectada con el oncogén Ras, PAM212-Ras e in vivo, en un modelo de células LM2 transplantadas subcutáneamente. La viabilidad celular se determinó con el ensayo del MTT y se determinaron las dosis lumínicas letales que producen el 50% de la reducción de viabilidad (LD50). Las porfirinas se cuantificaron fluorométricamente. In vitro, se alcanzó un plateau de síntesis porfirínica a las 3h de incubación con una concentración de  $0,01 \text{ mM}$  de los derivados, mientras que con ALA el plateau se logró con  $0,5 \text{ mM}$ . La línea PAM212-Ras mostró mayor síntesis de porfirinas con cada uno de los derivados, sin embargo empleando  $0,01 \text{ mM}$  resultó más resistente a la TFD, siendo sus LD50 en  $\text{J}/\text{cm}^2$ :  $0,036$  en PAM212 y  $0,077$  en PAM212-Ras para AcLeuALAME y  $0,041$  en PAM212 y  $0,097$  en PAM212-Ras para AcPheALAME. Esta mayor resistencia en células transfectadas con el oncogén Ras ha sido previamente observada con otros fotosensibilizantes en otras líneas celulares. In vivo, al administrar los compuestos por vía i.p., se obtiene una mayor síntesis de porfirinas con AcPheALAME, en todos los tejidos, especialmente en tumor. Los mejores resultados se obtuvieron con la administración tópica de los derivados, donde la relación de porfirinas Tumor/Piel es de  $0,8$  para AcPheALAME, mientras que en ALA es  $0,5$ , lo que reduciría los efectos adversos de fotosensibilización cutánea de la TFD. Se concluye que los derivados dipéptidos de ALA pueden ser una muy buena opción para la TFD, siendo AcPheALAME el más prometedor.

**258. (101) RESPUESTA A LA TERAPIA FOTODINÁMICA EN CÉLULAS VASCULARES, TUMORALES Y NORMALES**

Rodriguez L.<sup>1</sup>; Di Venosa G.<sup>2</sup>; Mamone L.<sup>3</sup>; Gandara L.<sup>4</sup>; Batlle A.<sup>5</sup>; Casas A.<sup>6</sup>

*CIPYP<sup>1 2 3 4 5 6</sup> lorenagabrielarodriguez@yahoo.com.ar*

La Terapia Fotodinámica (TFD), es un tratamiento antineoplásico, basado en la administración de un fotosensibilizante (FS) que destruye selectivamente a las células tumorales cuando éstas son expuestas a la luz, desencadenando una serie de reacciones fotoquímicas, que resultan citotóxicas. Un aspecto importante en la TFD es el rol de la vasculatura. El objetivo del presente trabajo fue estudiar cuál es el blanco preferencial de la TFD in vitro, empleando como modelo una línea de endotelio vascular HMEC-1, una línea de queratinocitos normales HaCat y el par HB4a/HB4a-Ras de células de mama normal y tumoral

respectivamente. Se emplearon: Verteporfin, Naranja de Acridina (NA), Foscan (m-THPC), Photofrin (PII), Merocianina 540 (MC 540) y Clorina (Ce6). Se cuantificó la acumulación de los FSs en todas las líneas (en condiciones óptimas de tiempos de incubación y concentración) y se llevó a cabo la TFD con cada FS. Empleando dosis de FSs tales que induzcan igual concentración intracelular en todas las líneas, las dosis letales de luz (J/cm<sup>2</sup>) para matar el 50% de las células (DL50) son: PII: HMEC-1: 11, HaCat: 3,71, HB4a: 9,1, HB4a-Ras: 13,65; Verteporfin: HMEC-1: 1,13, HaCat: 0,44, HB4a: 0,87, HB4a-Ras: 1,305; MC450: HMEC-1: 83, HaCat: 78, HB4a: 79,2, HB4a-Ras: 118,8; NA: HMEC-1: 3, HaCat: 1,74, HB4a: 1,5, HB4a-Ras: 2,25; m-THPC: HMEC-1: 6,2, HaCat: 1,87, HB4a: 6,3, HB4a-Ras: 9,45; Ce6: HMEC-1: 15,3, HaCat: 7,6, HB4a: 12,6, HB4a-Ras: 18,9. Estos resultados indican que las células HMEC-1 son más resistentes a la TFD que las células HaCat y HB4a. Esto ocurre para los FSs de naturaleza tetrapirrólica y no para los colorantes. Sin embargo, las células HMEC-1 presentan igual resistencia a la TFD que las HB4a-Ras, aunque se trata de una línea que es particularmente resistente a otros tratamientos. En futuros estudios analizaremos el comportamiento in vitro de otras líneas tumorales para completar la presente comparación.

**259. (108) LA TERAPIA FOTODINÁMICA COMO MODULADORA DE LA INTERACCIÓN TUMOR-ENDOTELIO EN CARCINOMA COLORRECTAL**

Pansa M.<sup>1</sup>; Lamberti M.<sup>2</sup>; Rumie Vittar N.<sup>3</sup>; Rivarola V.<sup>4</sup>  
Laboratorio 14, Departamento Biología Molecular, FCEF-QyN, Universidad Nacional de Río Cuarto<sup>1 2 3 4</sup>  
florenciapansa@hotmail.com

La Terapia Fotodinámica (TFD) es una estrategia terapéutica basada en la administración de un fotosensibilizador (FS) que bajo luz visible provoca la destrucción tumoral. El cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte por cáncer luego del cáncer de pulmón. La angiogénesis asociada con la progresión y metástasis de dicho cáncer, afecta la supervivencia del paciente y ocasiona la mayoría de las muertes. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de la TFD sobre células de cáncer de colon, con diferente grado de malignidad y su modulación en el microambiente tumoral. Se utilizó ALA-Met para producir un FS endógeno, PpIX. Se evaluó la fototoxicidad sobre células de diferentes estadios de progresión tumoral, donde las de mayor grado de diferenciación (Caco-2) respondieron en forma más sensible a la terapia (LD50: 0.5mM ALA-Met+3J/cm<sup>2</sup>). Para obtener la LD50 en las menos diferenciadas (SW480-ADH) fue necesario duplicar la administración de ALA-Met (1mM). Por otro lado, para obtener la LD50 en cultivos esferoidales de Caco-2 fue necesario aplicar una dosis de luz mayor (0.5mM+5J/cm<sup>2</sup>). Se examinó el impacto de la TFD sobre la respuesta de células endoteliales (CE), protagonistas del fenómeno angiogénico. Para ello se utilizaron medios condicionados (MC) de células tumorales crecidas en monocapa y esferoides sometidas a TFD. Los MC de esferoides no tratados promovieron mayor porcentaje de migración (50%) y proliferación (40%) de CE, comparado con los MC de un número equivalente de células cultivadas en monocapa. Por otro lado, sólo la TFD sobre células Caco-2 crecidas en monocapa incrementó el porcentaje de migración de CE con respecto al control en un 20%, mientras que se vio inducida la capacidad proliferativa por el efecto fotodinámico sobre la totalidad de los modelos evaluados. Estos resultados sugieren que la TFD sería moduladora de propiedades inherentes al proceso angiogénico y ameritan continuar los estudios.

**260. (151) INTERRELACIÓN ENTRE HEMO OXIGENASA-1 Y EL PERFIL DE GLICANOS/LECTINAS EN CÁNCER DE PRÓSTATA.**

Jaworski F.<sup>1</sup>; Gueron G.<sup>2</sup>; Rabinovich G.<sup>3</sup>; Vazquez E.<sup>4</sup>; Laderach D.<sup>5</sup>  
Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Depto Química Biológica, FCEN, UBA, Laboratorio de Glicómica Estructural y Funcional, Depto QB, FCEN, UBA<sup>1</sup>; Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Depto Química Biológica, FCEN, UBA<sup>2 4</sup>; Laborato-

rio de Inmunopatología, IBYME, CONICET<sup>3</sup>; Laboratorio de Glicómica Estructural y Funcional, Depto QB, FCEN, UBA<sup>5</sup>  
fellepejaw@gmail.com

El cáncer de próstata (CaP) es una de las principales causas de letalidad en hombres ya que no existen tratamientos efectivos para combatir sus fases tardías, por lo que resulta crucial definir parámetros moleculares que permitan prevenir y/o controlar su diseminación. Varias alteraciones moleculares tempranas han sido descriptas en CaP. La enzima Hemo Oxigenasa-1 (HO-1), inducida como un mecanismo homeostático de la célula ante procesos inflamatorios, se ha asociado a menor proliferación, invasión y migración de células tumorales. Además se hallaron cambios significativos de expresión de glicanos y sus respectivas lectinas durante el proceso tumoral. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la existencia de un nexo entre HO-1 y el perfil de glicanos/lectinas en CaP. El análisis de muestras de tumores generados en ratones atímicos nude derivados de células PC3 sobreexpresando establemente HO-1 mostraron una inducción significativa de galectina-1 y galectina-8 respecto a los tumores control (n=5 por grupo). Sin embargo, no se encontraron cambios en el perfil transcripcional de distintas galectinas al inducir HO-1 por tratamiento con hemina en líneas celulares de CaP humanas y murinas con distinta sensibilidad a andrógenos: PC3, LNCaP y TRAMP-C1. Estas diferencias observadas entre tumores inducidos y líneas celulares evidencian una participación clave del microambiente tumoral. Por ello y teniendo en cuenta las propiedades inmunomoduladoras de las galectinas, se estudió cómo HO-1 afecta la proliferación mediada por lectinas de linfocitos normales. Estos ensayos de activación linfocitaria mostraron mayor proliferación en condiciones de inducción de HO-1, tanto para células CD3+CD8+ como para CD3+CD8-. Nuestros resultados sugieren la existencia de una conexión entre HO-1 y el perfil de lectinas/glicanos, y representan el punto de partida para investigar en detalle el rol de galectina-1 en la inmunomodulación ejercida por HO-1 en el marco del microambiente tumoral.

**261. (159) PARÁMETROS HISTOPATOLÓGICOS Y PERFIL GENÉTICO DE PACIENTES CON CÁNCER COLORECTAL**  
Piaggio F.<sup>1</sup>; Denninghoff V.<sup>2</sup>; Perazzo F.<sup>3</sup>; Tatangelo M.<sup>4</sup>; Krupitzki H.<sup>5</sup>; Garcia A.<sup>6</sup>; Avagnina A.<sup>7</sup>; Elsner B.<sup>8</sup>  
CEMIC<sup>1 3 5 6 7 8</sup>; CEMIC, CEPEA-UBA, CONICET<sup>2</sup>; Centro de Asistencia e Investigación Clínica Integral (CAICI)<sup>4</sup>  
fernandopiaggio@yahoo.com.ar

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más frecuente en hombres y el segundo más frecuente en mujeres, con una incidencia mundial aproximada de 1,2 millones de casos nuevos por año. El objetivo de este trabajo es estudiar la relación existente entre las características clínico-histológicas de individuos wild-type, polimórficos y mutados para los codones 12, 13, 15 y 61 del gen kras2 y del codón 600 del gen braf. Fueron seleccionados 60 individuos con cáncer colorrectal (30 wt y 30 con diferentes mutaciones en los codones 12 y 13 del exón 2 del gen kras2) de un total de 137 individuos estudiados entre septiembre de 2008 a mayo de 2011. Se amplificaron del gen kras2 los exones 2 (codones 1 al 37), y 3 (codones 38 al 81), y del gen BRAF el exón 15. Se secuenciaron los fragmentos amplificados. Se confeccionó una base de datos con los datos epidemiológicos, de laboratorio, de histopatología y de biología molecular. Se aplicaron técnicas de análisis univariado y/o análisis multivariado según correspondiese. En conclusión, no se encontró relación entre las características clínico-histológicas de individuos wild-type, polimórficos y mutados para los codones 12, 13, 15 y 61 del gen kras2 y del codón 600 del gen braf. El estudio adicional de los codones 15 del exón 2 y 61 de exón 3 del oncogen kras sólo encontró mutaciones dentro del grupo de los casos que ya presentaban mutaciones en los codones 12 y 13 de este oncogen. El codón 15 presenta una tasa del 33.3% (20/60) de polimorfismo. El estudio adicional del codón 600 del exón 15 del gen braf agregó un número significativo de casos mutados totales (5/30, 16.6%). Esto podría ser una explicación de porque algunos pacientes con adenocarcinomas colorectales con kras wild-type no responden de la misma manera al tratamiento

anti-EGFR. Si la hipótesis fuese confirmada, dicho estudio deberá ser agregado a todos los pacientes con *kras* wild-type antes de instaurar el tratamiento monoclonal.

**262. (280) LA MADURACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON CÉLULAS DE MELANOMA APOPTÓTICAS – NECRÓTICAS MEJORA CON LA UTILIZACIÓN DE UN CÓCTEL DE CITOQUINAS Y ADYUVANTES DURANTE SU COCULTIVO**

Pizzurro G.<sup>1</sup>; Blanco P.<sup>2</sup>; Roberti M.<sup>3</sup>; Gazzaniga S.<sup>4</sup>; Barrio M.<sup>5</sup>; Mordoh J.<sup>6</sup>

*Centro de Investigaciones Oncológicas, Fundación Cáncer<sup>1,2,3,5</sup>; Laboratorio de Biología Tumoral - FCEN - UBA<sup>4</sup>; Centro de Investigaciones Oncológicas, Fundación Cáncer, Fundación Instituto Leloir/IIIBA CONICET<sup>6</sup>*  
gabriela.pizzurro@gmail.com

El desarrollo de vacunas terapéuticas es actualmente una de las principales estrategias exploradas como terapia para melanoma (Mel). El uso de células dendríticas (CD) se debe al rol que cumplen iniciando la respuesta inmune adaptativa antígeno(Ag)-específica. En el laboratorio demostramos que, luego del cocultivo de CD humanas con una mezcla de células de Mel apoptóticas-necróticas (Apo-Nec), éstas presentan eficientemente los Ags MART-1 y gp100 a clones T CD8+ específicos. En un Ensayo Clínico de Fase I de la vacuna CD/Apo-Nec, 80% de los pacientes con estadios II y III presentaron una sobrevida libre de enfermedad > 8 años. Con el objetivo de optimizar la vacuna, se analizó el efecto del agregado de un cóctel de citoquinas (CC) con TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y PGE2 y adyuvantes (Ady), como BCG, Imiquimod (Imi) y GM-CSF, sobre la maduración de CD y su migración. Se evaluaron CD inmaduras (CDi), CD/Apo-Nec  $\pm$  CC  $\pm$  Ady y controles con LPS. Se analizó por FACS la expresión de marcadores de maduración (MM) y receptores (Rc) de quemoquinas (QQ). Se evaluó la migración in vitro en cámara de quimiotaxis contra QQ y se investigó la secreción de metaloproteasas (MMP) al medio de cultivo mediante zimogramas. Para CD/Apo-Nec, el agregado de CC solo y combinado con Ady, produjo un aumento ( $p < 0,05$ ) entre 31% (IC95%: 2-61%) y 712% (IC95%: 570-854%) en la expresión de MM/moléculas presentadoras (CD80, CD86, CD83/ HLA-I, HLA-II). Con el agregado de CC a CD/Apo-Nec se observó un aumento de expresión del Rc CCR7 y se incrementó su migración hacia CCL19 (77% IC95%: 35-130%;  $p < 0,05$ ). En todas las condiciones hubo menor migración hacia CCL3 respecto a CDi. Se observó una tendencia positiva en la migración hacia CCL19 agregando los Ady GM-CSF e Imi pero no con BCG, aunque este último efecto se revirtió con CC. Se determinó que en CD/Apo-Nec la secreción de MMP9 con respecto a CDi es 2 veces mayor en presencia de CC. El agregado de CC mejora la maduración y migración de la vacuna CD/Apo-Nec.

**263. (399) KLF4 ACTÚA COMO GEN SUPRESOR DE TUMOR EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER BUCAL CON ACTIVACIÓN DE K-RAS.**

Abrigo M.<sup>1</sup>; Calb D.<sup>2</sup>; Paparella M.<sup>3</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>4</sup>; Gutkind S.<sup>5</sup>; Raimondi A.<sup>6</sup>

*Área de Investigación del Hospital Angel H Roffo<sup>1,2,4,6</sup>; Cátedra de Anatomía Patológica, FOUBA<sup>3</sup>; NIDCR, National Institute of Health, USA<sup>5</sup>*  
marianela.abrigo@hotmail.com

El carcinoma de células escamosas bucal ocupa el sexto lugar entre los cánceres mas frecuentes y la tasa de sobrevida aun hoy es menor al 50%, lo cual refleja la necesidad de generar conocimiento mas detallado sobre su desarrollo. Previamente hemos generado un modelo de ratones transgénicos (K14-CreERTAM /K-rasG12D) para estudiar este cáncer, los cuales desarrollan papilomas bucales e hiperplasias de lengua. El factor de transcripción Klf4 regula la proliferación y diferenciación celular y está ausente en cáncer de estómago entre otros. Objetivo: estudiar el rol de Klf4 en la tumorigénesis bucal analizando el efecto de su ablación cuando *Kras* esta activada. Se utilizaron ratones knockout condicionales Klf4<sup>flx/flx</sup>,

generamos una línea K14-CreERTAM /K-rasG12D/ Klf4 -/- por retrocruza con K14-CreERTAM /K-rasG12D. Los ratones fueron genotipados por PCR y a los 30 días de edad se realizó la inducción del sistema con tamoxifeno. Estudiamos la expresión de KLF4 en las lesiones de los animales K-rasG12D por western blot e inmunohistoquímica observando su expresión en ambos casos. El índice de proliferación valorado con PCNA por IHQ (IP: células positivas/células totales) de las lenguas *Kras* vs control no fue significativo ( $p = 0,3$ ). Luego de la ablación de Klf4 en los ratones *Kras*, la nueva línea K14-CreERTAM /K-rasG12D/ Klf4 -/- desarrolló displasias, CIS y carcinomas verrugosos de lengua. Los animales Klf4 -/- no desarrollaron fenotipo. Un análisis de sobrevida (Kaplan-Meier) reveló diferencias significativas entre las líneas *Kras* (56 días), *Kras*/ Klf4 -/- (24 días) y Klf4 -/- (3 meses) ( $p < 0,001$  Log-Rank test). Las displasias expresaron queratinas 1 y 14 y los CIS y CA variaron el patrón de queratina 1 vs control (IHQ). Se estudió el IP de todas las lesiones encontrando que los animales *Kras*/ Klf4 -/- ( $0,9 \pm 0,01$ ) difirieron significativamente del resto (*K-ras*:  $0,57 \pm 0,03$ , Klf4 -/-  $0,47 \pm 0,008$ , wild type:  $0,6 \pm 0,01$ ), ANOVA  $p < 0,001$  post hoc Holm-Sidak. Analizamos la expresión de p27 (WB) que regula el ciclo celular inhibiéndolo, encontrando disminución de su expresión en los papilomas y CA de los animales *Kras*/ Klf4 -/- vs control. La delección de Klf4 junto a *K-rasG12D* produjo la transformación maligna del epitelio de la lengua en nuestro modelo. Estos resultados sugieren que Klf4 actúa como un gen supresor de tumor en la lengua.

**264. (534) AUMENTO EN LA INVASIÓN CELULAR Y EN LA ACTIVIDAD Y SECRECIÓN DE METALOPROTEASAS 2 Y 9 INDUCIDO POR HEXACLOROBENCENO EN LA LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE MAMA HUMANO MDA-MB-231**

Pontillo C.<sup>1</sup>; Chiappini F.<sup>2</sup>; Rojas P.<sup>3</sup>; Ventura C.<sup>4</sup>; Cocca C.<sup>5</sup>; Alvarez L.<sup>6</sup>; Lanari C.<sup>7</sup>; Kleiman De Pisarev D.<sup>8</sup>; Randi A.<sup>9</sup>  
*Laboratorio de Efectos Biológicos de Contaminantes Ambientales, Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,6,8,9</sup>; Laboratorio de Carcinogénesis Hormonal, IBYME-CONICET<sup>3,7</sup>; Laboratorio de Radioisótopos, FFyB, UBA<sup>4,5</sup>*  
caroponti@hotmail.com

El Hexaclorobenceno (HCB) es un contaminante orgánico persistente y un compuesto "tipo-dioxina", porque se une al receptor de hidrocarburos aromáticos (RHA), se acumula en tejidos grasos e induce la expresión de enzimas que metabolizan xenobióticos. En cáncer de mama, las metaloproteasas (MMPs) 2 y 9 juegan un rol importante en invasión celular. Demostramos que el HCB es co-carcinogénico en la formación de tumores mamaros en ratas y estimula las vías de c-Src/HER1/STAT5b y de HER1/ERK1-2, así como la migración celular en la línea de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Objetivo: estudiar la acción del tóxico: 1) In Vitro, en MDA-MB-231, sobre la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9, la invasión celular y el rol de c-Src, HER1 y RHA en estos parámetros; y 2) In Vivo, en el crecimiento tumoral de ésta línea celular en ratones atímicos. Observamos que HCB (0.05, 0.5 y 5mM) incrementa los niveles de ARNm (RT-PCR), la secreción (Western Blot) y actividad (zimografía) de MMP9 ( $p < 0,05$ ), mientras que HCB (0.5 y 5 mM) aumenta los niveles de ARNm y proteína de MMP2 ( $p < 0,01$ ). En ensayos con inhibidores de RHA (ANF ó 4,7PHE), de c-Src (PP2) ó de HER1 (AG1478), demostramos que el HCB (5 mM) incrementa los niveles de proteína de MMP2 en forma dependiente de RHA ( $p < 0,001$ ), de HER1 y c-Src ( $p < 0,001$ ); mientras que estimula la actividad y secreción de MMP9 a través de RHA ( $p < 0,05$ ) y de HER1 ( $p < 0,001$ ). El HCB (5 mM) incrementa la invasión celular (2.5 veces,  $p < 0,001$ ) (transwell con matrigel) dependiente de c-Src, HER1 y RHA ( $p < 0,01$ ). En ensayos In Vivo, en ratones atímicos tratados con HCB (0.3 y 3 mg/kg p.c.) aumenta el volumen (32 y 31 veces,  $p < 0,001$ ) y el peso (12 veces,  $p < 0,05$ ) de tumores crecidos por la inoculación de MDA-MB-231. En conclusión, el HCB estimula la expresión, secreción y actividad de MMP2 y 9; así como la invasión celular vía c-Src, HER1 y RHA en MDA-MB-231, y promueve el crecimiento tumoral de esta línea celular en ratones atímicos.

**265. (554) ROL DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN LA REVERSION DEL FENOTIPO TUMORAL POR SILENCIAMIENTO DE AKT1**

Herrera Paez J.<sup>1</sup>; Alippe Y.<sup>2</sup>; Perez H.<sup>3</sup>; Colombo L.<sup>4</sup>; Vanzulli S.<sup>5</sup>; Biancolini C.<sup>6</sup>; Carreras M.<sup>7</sup>; Poderoso J.<sup>8</sup>  
*Hospital de Clínicas, Laboratorio de Metabolismo del Oxígeno<sup>1 2 3 6 7 8</sup>; Instituto Roffo<sup>4</sup>; Academia Nacional de Medicina<sup>5</sup>*  
 jjherrepaez@gmail.com

La producción mitocondrial de oxidantes modula la actividad de quinasas, y la disfunción mitocondrial asociada al fenotipo tumoral impide esta regulación redox. Akt1 es una Ser/Thr quinasa que regula la proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis y la tumorigénesis; Akt contribuye al efecto Warburg, que implica el establecimiento del metabolismo glucolítico a expensas del oxidativo mitocondrial en células tumorales. Previamente demostramos que el silenciamiento de Akt1 en tumores LP07 provocaba disminución del volumen tumoral, aumento de peso y sobrevida de los animales respecto a los controles, aún después del restablecimiento de los niveles de Akt1. Con el objeto de relacionar dichos efectos con el perfil oxidativo, se evaluó la evolución de tumores LP07 en ratones Balb/c 2-40 días post-tratamiento, registrando las diferencias en: expresión de Akt1, de enzimas antioxidantes, histopatología, proliferación, apoptosis y desarrollo de metástasis (MTS). Se observó un aumento de la apoptosis en los tumores tratados respecto a los controles (60%), disminución de la mitosis (VV: 2,25% vs siAkt: 0,85% p<0,05), y reducción del Índice de Proliferación Celular (siAkt <3 veces la prolif. resp. a VV Ki-67(+)) p<0,005). Los animales del grupo control desarrollaron MTS, mientras que en los tratados solo se observó a 40d. El análisis de expresión por WB mostró que los niveles de Akt1 disminuyeron un 70% a 2d, pero superaron a los controles a 10d (>28% vs VV). Además, las enzimas antioxidantes aumentaron a 10d en los tumores tratados (respecto a siAkt1 2d: >92% para MnSOD, >500% para Trx1, >30% para Trx2) a diferencia de lo ocurrido con los controles (respecto a VV 2d: <5% para MnSOD, <45% para Trx1, <30% para Trx2). Los resultados sugieren que la reversión prolongada del fenotipo tumoral, sumada al switch en la expresión de enzimas antioxidantes, podría deberse a una reprogramación de las células tumorales a nivel metabólico, disparada por el knock down inicial de Akt1

**266. (637) ANÁLISIS DE TÉCNICAS MOLECULARES QUE SIRVAN COMO HERRAMIENTAS PARA IDENTIFICAR PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA CON UNA ALTA EXPRESIÓN DE LA ISOFORMA A DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA (RP-A)**

Sequeira G.<sup>1</sup>; Castillo L.<sup>2</sup>; May M.<sup>3</sup>; Gass H.<sup>4</sup>; Gonzalez P.<sup>5</sup>; Martinez Vazquez P.<sup>6</sup>; Lanari C.<sup>7</sup>; Rojas P.<sup>8</sup>  
*IBYME<sup>1 2 3 7 8</sup>; Hospital Magdalena G de Martinez de Gral. Pacheco<sup>4 5 6</sup>*  
 chicon27\_7@hotmail.com

El 75% de los pacientes con cáncer de mama expresa receptores de progesterona (RP) y de estrógenos (RE). En estos pacientes la terapia endócrina es la de elección y en la mayoría el blanco terapéutico es el RE. Resultados obtenidos en un modelo experimental murino mostraron que el tratamiento con antiprogéstágenos (ZK 98299; ZK 230211 y RU-486) indujo regresión tumoral sólo en los tumores con altos niveles de isoforma A del RP (RP-A). Además, resultados similares se observaron en cultivos primarios de cáncer de mama humano tratados con RU-486 (10nM). Proponemos que existen pacientes que se podrían beneficiar de la terapia con antiprogéstágenos y nuestro objetivo es identificarlos. En este trabajo nos propusimos establecer si el estudio del ARNm de RP nos podría brindar la misma información sobre la proporción de isoformas del RP (RP-A/RP-B) que el western blot (WB) en muestras de biopsias. Utilizando RT-PCR, qPCR y WB correlacionamos la expresión génica (ARNm) y proteica de las isoformas del RP. Debido a que ambas isoformas están incluidas en el mismo gen desarrollamos primers específicos que identifican a ambas isoformas o sólo a RP-B. Seleccionamos 50 muestras

de tumores de pacientes RP+ obtenidas del Hospital Magdalena V de Martinez, Gral. Pacheco, que firmaron previamente un consentimiento informado. Para empezar con el análisis, evaluamos muestras que reflejaran grupos con una alta (> 1.2), media (< 1,2 a 0.8) y baja (< 0,8) relación RP-A/RP-B obtenidas por WB. Hasta el momento se estudiaron 22 muestras mostrando que no existe correlación entre la expresión proteica de las isoformas del RP y la expresión génica determinada por RT-PCR (p<0.6) o qPCR (p<0.7). El estudio se completará con la evaluación de los 50 tumores. Los datos obtenidos sugieren que aun aumentando el número de valores, la técnica molecular, cuya ventaja es el uso de muy poco material, no sería la adecuada para su uso en pacientes para la determinación del perfil de isoformas.

**267. (257) EFECTO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO P15-TAT EN LA MODULACIÓN DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INVOLUCRADAS CON LA PROGRESIÓN MALIGNA DE TUMORES DE PULMÓN HUMANOS Y MURINOS.**

Cirigliano S.<sup>1</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>2</sup>; Farina H.<sup>3</sup>; Todaro L.<sup>4</sup>; Urtreger A.<sup>5</sup>  
*Instituto de Oncología Angel Roffo, Área de Investigación<sup>1 2 4 5</sup>; Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ<sup>3</sup>*  
 smcirigliano@gmail.com

CK2 es una serina/treonina quinasa involucrada en crecimiento celular, supervivencia y apoptosis. El péptido sintético P15-Tat (CIGB-300) es un inhibidor competitivo de CK2 que ha demostrado efectividad antitumoral en ensayos clínicos. En este trabajo estudiamos el efecto del CIGB-300, sobre vías de señalización implicadas en la progresión tumoral y efectos biológicos asociados a diseminación metastásica, empleando como modelo experimental de células de cáncer de pulmón. El péptido CIGB-300 presenta una dosis letal 50 (DL50) de 119±2,4 uM en células humanas H125 y 138,3±9,9 uM en las células murinas 3LL, mientras que las células murinas LP07 son altamente resistentes (DL50: 277,9±35,4 uM). Se analizó mediante Western blot los niveles nucleares y citoplasmáticos de componentes de las vías de Wnt y NFκB luego del tratamiento con CIGB-300. En relación a la vía de Wnt, pudimos observar una importante disminución en los niveles de b-catenina nucleares, sitio al cual se transloca a fin de regular la expresión de genes de supervivencia. En relación a la vía NFκB, también involucrada en sobrevida, se obtuvieron resultados similares en las tres líneas celulares, observándose una disminución en los niveles de p65 nuclear sin alterarse los niveles citoplasmáticos de IκBα. CIGB-300 redujo además los niveles de ERK1/2 fosforilado. En relación a la diseminación metastásica, estudiamos in vitro, la capacidad migratoria (ensayos wound healing) de las células 3LL. Observamos una importante reducción en la migración en forma dependiente de la dosis (reducción: 18,86±2,2% y 32,99±2,7% para ¼ y ½ de la DL50 resp. p<0,05). Estos resultados fueron coincidentes con la reducción en la secreción de uroquinasa (28,64±0,2% y 44,19±0,4% para ¼ y ½ DL50 resp. p<0,05). Nuestros resultados indican que el tratamiento con el péptido CIGB-300, modula negativamente vías de señalización implicadas en progresión tumoral y diseminación metastásica.

## REPRODUCCIÓN 3

**268. (429) PARTICIPACIÓN DE LA FAMILIA DE TIROSINA KINASA SRC (SFK) EN LA CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE DE RATA**

Battistone M.<sup>1</sup>; Weigel Muñoz M.<sup>2</sup>; Ernesto J.<sup>3</sup>; Maldera J.<sup>4</sup>; Krapf D.<sup>5</sup>; Visconti P.<sup>6</sup>; Cuasnicú P.<sup>7</sup>  
*IBYME CONICET<sup>1 2 3 4 7</sup>; IBR<sup>5</sup>; Department of Veterinary and Animal Science, University of Massachusetts<sup>6</sup>*  
 agubattistone@gmail.com

Estudios recientes de nuestro laboratorio sugieren la participación de la familia SFK en la fosforilación en tirosina del espermatozoide de rata, apoyando la existencia de dos vías paralelas conducentes a la capacitación, una dependiente de la activación de PKA, y otra mediada por la inactivación de las ser/thr fosfatasa

sas. Con el fin de investigar el rol de dichas vías en la cascada de señales que conduce a la capacitación del espermatozoide de rata, en el presente trabajo se evaluó el efecto de inhibidores de SFK sobre diversos parámetros de la capacitación. Ensayos de Western blot indicaron que la presencia de inhibidores de SFK (SKI606 y SU6656) durante la capacitación produjo una inhibición en los niveles de fosforilación tanto en tirosina como en los sustratos de PKA. Considerando que SFK inhibe a ser/thr fosfatasa, los espermatozoides fueron expuestos a un inhibidor de dichas fosfatasa (ácido okadaico, AO), observándose reversión del bloqueo descrito al inactivar a SFK. La inhibición de SFK produjo también una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) en los porcentajes de motilidad de los espermatozoides capacitados (control  $69,3 \pm 4,3$ , SU6656  $42,9 \pm 2,6$  y SKI606  $34,8 \pm 3,8$ ) mientras que la presencia de AO también revirtió esta inhibición (AO  $78,2 \pm 4,2$ , SU6656+AO  $65,5 \pm 2,1$  y SKI606 +AO  $58,1 \pm 6,9$ ). Finalmente, se estudió la capacidad fertilizante de espermatozoides expuestos a SKI606 y SU6656 durante la capacitación; observándose una reducción significativa ( $p < 0,001$ ) en el porcentaje de fertilización in vitro de ovocitos sin zona pelúcida (control  $92,6 \pm 3,7$ , SU6656  $17,3 \pm 4,3$  y SKI606  $11,3 \pm 5,7$ ). Esta disminución no se observó en espermatozoides capacitados en presencia de inhibidores de SFK conjuntamente con OA (AO  $60,4 \pm 13,9$ , SU6656+AO  $55,7 \pm 3,9$  y SKI606+AO  $45,8 \pm 10,0$ ). En conjunto, estos resultados confirman la participación de SFK en la capacitación del espermatozoide de rata y su rol indirecto a través de la inactivación de ser/thr fosfatasa.

**269. (486) EXPOSICIÓN AMBIENTAL A PLAGUICIDAS: MODIFICACIÓN EN LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y FUNCIONALIDAD DE MITOCONDRIAS EN CITOTROFOBlasto Y SINCIOtROFblasto DE PLACENTA HUMANA**

Rivero Osimani V.<sup>1</sup>; Fagali N.<sup>2</sup>; Valdez S.<sup>3</sup>; Vera B.<sup>4</sup>; Guñazú N.<sup>5</sup>; Magnarelli G.<sup>6</sup>

*LIBIQUIMA IDEPA-CONICET, Facultad de Cs Médicas, Universidad Nacional del Comahue<sup>1 4 5 6</sup>; INIFTA-CCTLA PLATA-CONICET, UNLP<sup>2</sup>; IMBECU-CCT, Instituto de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo<sup>3</sup> valetirivero@hotmail.com*

La membrana mitocondrial es blanco de plaguicidas lipofílicos. Debido a que la funcionalidad de mitocondria en placenta es clave para el aporte de energía y producción de progesterona (PG), el objetivo de este trabajo fue estudiar si la composición de ácidos grasos y la funcionalidad mitocondrial se afectan durante la exposición ambiental a organofosforados (OF). Previa utilización de criterios de exclusión y obtención de consentimiento informado, se colectaron placentas de residentes rurales (ZR) ( $n=18$ ) y urbanos (ZU) ( $n=15$ ) en período de aplicación de OF (PA) y de receso (PR). La actividad de carboxilesterasa disminuyó en PA indicando exposición a OF. Se aislaron por centrifugación diferencial mitocondrias livianas (MI), propias de sinciotrofoblasto (SCT) y pesadas (Mp), de citotrofoblasto (CT). Se determinó el porcentaje de ácido grasos (AG). por CG-Masa El AG 22:6 n3, representó el 7,5% en cardiopina asociada a supercomplejos respiratorios y disminuyó en PA respecto de PR tanto en MI (53%;  $p < 0,05$ ) como en Mp (60%;  $p < 0,01$ ). La actividad de NADH-Citocromo c reductasa de MI y Mp de ZR disminuyó durante el PA respecto de PR (Mp:  $164,80 \pm 22,78$  vs  $231,46 \pm 27,87$ ;  $p < 0,001$  y MI  $154,89 \pm 64,01$  vs  $268,14 \pm 32,56$ ;  $p < 0,001$ ; nmol/mg prot x min) y respecto de ZU ( $p < 0,05$ ). Mientras que la actividad de los complejos II-III disminuyó en ZR en ambos períodos respecto de ZU (ZR;  $17,49 \pm 4,72$  vs  $37,68 \pm 21,34$ ;  $p < 0,001$ ) La concentración de PG determinada por RIA en homogenato disminuyó el 33% en PA respecto de ZU (PA:  $1061 \pm 91,24$  vs ZU:  $1593 \pm 121$  ng/ml.mg prot,  $p < 0,05$ ). Estos resultados indican cambios en la composición y funcionalidad de ambos tipos de mitocondrias, posiblemente asociados al estrés oxidativo producido por OF. Sugieren además consecuencias en el transporte activo de sustancias y la actividad biosintética del SCT y del CT. Agradecimientos: Méd. M. Curioni., S. Santa Cruz. Subsidios: UNCo, CONICET, Beca FONCYT. Autorización del Comité de Bioética. (CAIBSH).

**270. (495) ESTUDIO HISTOLOGICO EN TESTICULO DE RATONES INFECTADOS CON TOXOCARA CANIS Y TRATADOS CON ALBENDAZOL**

Vazquez S.<sup>1</sup>; Echenique C.<sup>2</sup>; Hisano N.<sup>3</sup>

*Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>1</sup>; IFICE-CONICET, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacia, UNR<sup>2</sup> silvievez@hotmail.com*

Toxocara canis es un parásito muy común en caninos. En humanos es la causa de síndromes de variada gravedad, como larva migrans visceral siendo la afectación más grave a nivel del sistema nervioso central. Estudiamos el efecto sobre la histología testicular en la infección con T. canis de ratones con y sin tratamiento con albendazol. Se trabajó con ratones BALB/c machos de 60 días (adultos) de 25 a 30 g y se inocularon con 1000 huevos embrionados de T. canis por vía oral. Los animales recibieron albendazol (A) por vía oral, en una dosis de 100 mg/Kg de PC/día durante 3 días. Los grupos fueron: 1a- animales ( $n=5$ ) sin infectar (controles)(solución fisiológica,SF). 2a-animales ( $n=5$ ) infectados y SF, 3a- animales ( $n=5$ ) sin infección y A. 4a- animales ( $n=5$ ) infectados y A. Los grupos 1a, 2a, 3a y 4a se sacrificaron a la semana de infección, fase hepato-pulmonar de la migración del parásito. Otros grupos similares: 1b, 2b, 3b y 4b se sacrificaron el día 28<sup>o</sup> de infección, fase miotrópica-neurotrópica.Los testículos fueron, disecados, fijados en Carnoy y refijados en formaldehído 4 % en PBS. Los órganos se procesaron para el estudio histológico, coloreados con tricrómica (Masson). En el grupo 2a no se observaron modificaciones en los túbulos seminíferos con respecto a los controles (1a), mientras que en el 2b se hallaron células basófilas anómalas en la luz del túbulo seminífero, que podrían corresponder a espermatozoides primarios alterados, el resto del epitelio y el intersticio se vieron conservados. En 4a se detectó mayor número de células basófilas anómalas con núcleos picnóticos en la luz del tubular. En 4b se observaron lesiones de tipo tóxicas a nivel del epitelio seminífero con aumento de células basófilas anómalas, un intersticio con capilares ingurgitados sin infiltración. Estos cambios hallados en el epitelio germinal podrían atribuirse a la respuesta inmunológica sistémica ocasionada por la parasitosis y al efecto del albendazol.

**271. (533) EFECTO DEL ORIGEN GENÉTICO SOBRE EL FENOTIPO DE LOS ANIMALES KNOCK OUT PARA CRISP1.**

Weigel Muñoz M.<sup>1</sup>; Battistone M.<sup>2</sup>; Vasen G.<sup>3</sup>; Ernesto J.<sup>4</sup>; Da Ros V.<sup>5</sup>; Maldera J.<sup>6</sup>; Cohen D.<sup>7</sup>; Cuasnicu P.<sup>8</sup>

*IBYME<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup> marianaweigel@gmail.com*

Una de las moléculas propuestas como mediadoras del proceso de fertilización es la proteína epididimaria CRISP1, descrita por nuestro grupo y primer miembro de la familia CRISP (Cystein Rich Secretary Proteins). Con el fin de estudiar la relevancia de CRISP1 para la fertilidad, nuestro laboratorio generó ratones knock out (KO) para esta proteína, los cuales, si bien resultaron fértiles, presentaron espermatozoides con menores niveles de AMPc, fosforilación en tirosina y fertilización. Considerando que una mutación puede producir diferentes fenotipos dependiendo del origen genético de los animales, el objetivo del presente proyecto consistió en estudiar el fenotipo en animales KO para CRISP1 que exhiban un alto grado de homogeneidad génica. Para tal fin, los animales KO con un origen genético híbrido 129SvEv/C57BL/6 fueron sometidos a 7 ciclos de retrocruza con animales C57BL/6 a lo largo de dos años, hasta la obtención de animales KO con una base genética prácticamente homogénea (99.2%) para la cepa C57BL/6. El análisis de estos animales reveló un fenotipo diferente al de la colonia híbrida original a juzgar por el hecho de que el tiempo de parición fue significativamente mayor para hembras apareadas con machos KO que heterocigotas (HT). Asimismo, los espermatozoides provenientes de animales KO presentaron niveles de motilidad y reacción acrosomal inducida por progesterona (15  $\mu$ M), significativamente menores a los de los animales HT. La bajada en motilidad fue revertida por el agregado de dibutilil AMPc e IBMX (3-isobutil-1-metil-xantina) durante la capacitación,

sugiriendo que dicha bajada sería debida a los menores niveles de AMPc de los espermatozoides KO. En conjunto, estos resultados revelan la importancia de CRISP1 para la motilidad y reacción acrosomal de los espermatozoides, e indican que el KO para CRISP1 constituiría un nuevo ejemplo de la influencia del origen genético sobre el fenotipo de los animales.

**272. (538) EVALUACIÓN DE ACIDO HIALURÓNICO (AH) EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TROFOBLÁSTICA GESTACIONAL (ETG)**

Mascaró M.<sup>1</sup>; Ernst G.<sup>2</sup>; Lago N.<sup>3</sup>; Modenutti C.<sup>4</sup>; Lompardía S.<sup>5</sup>; Otero S.<sup>6</sup>; Alvarez E.<sup>7</sup>; Bianconi M.<sup>8</sup>; Hajos S.<sup>9</sup>  
*Laboratorio de Inmunología Tumoral, Cátedra de Inmunología -IDEHU, FFYB, UBA-CONICET<sup>1 2 5 7 9</sup>; Centro de Patología Experimental y Aplicada, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>; Servicio de Oncología, Hospital de Agudos "C G Durand"<sup>6 8</sup>*  
*mascaro@ffyb.uba.ar*

La ETG comprende un grupo de entidades interrelacionadas derivadas de la placenta humana tales como mola hidatiforme (parcial y completa), y tumores malignos como coriocarcinoma (CC). Son únicas ya que inusualmente provienen de un evento gestacional y por tanto, se caracterizan por representar un aloinjerto en el tejido materno. El AH es uno de los principales componentes de la matriz extracelular. Contribuye a la proliferación y migración celular. Con el aval del Comité de Ética del Hospital de Agudos "C G Durand", se utilizaron muestras de suero de pacientes con dicha enfermedad (n=8), embarazadas de 1er (1T) (n=6) y 3er trimestre (3T) (n=6), y mujeres no embarazadas (MNE) (n=12); y tejido de placenta temprana normal de aborto (n=3), mola hidatiforme (n=8) y CC (n=2), a fin de investigar la presencia de AH y evaluar si existen diferencias entre los grupos. Se analizó la expresión y distribución de AH en tejido parafinado mediante técnica histoquímica, y el nivel de AH en suero mediante ELISA competitivo, utilizando una proteína de unión a AH. Resultados: tanto en mola como CC se pueden observar pequeños acumulos de AH sobre el borde apical de las células de sincitiotrofoblasto(ST), a diferencia del tejido correspondiente a placenta de 1er trimestre donde se observa positividad en el estroma veloso. El análisis de los sueros arrojó una mediana de AH de 51,31 (Q=46,26-65,29); 66,76 (Q=49,10-70,80); 102,6 (Q=94,11-119,7) ug/ml en muestras de MNE, 1T y 3T, respectivamente, encontrando diferencias significativas entre MNE vs 3T (p<0.001) y 1T vs 3T (p<0.01). Como conclusión de estos resultados preliminares, se desprende que existen diferencias en la expresión y distribución de AH en los tejidos analizados. Sin embargo, dada la baja prevalencia de la patología en nuestro país los resultados obtenidos por ELISA con dichas muestras no son aún concluyentes necesitando para ello aumentar el número de pacientes.

**273. (539) LA HIPERANDROGENIZACIÓN PRENATAL PRODUCE ALTERACIONES EN LA FUNCIONALIDAD OVÁRICA DURANTE LA ETAPA PUBERAL**

Amalfi S.<sup>1</sup>; Velez L.<sup>2</sup>; Heber F.<sup>3</sup>; Ferreira S.<sup>4</sup>; Pignataro O.<sup>5</sup>; Motta A.<sup>6</sup>  
*CEFAYBO UBA CONICET<sup>1 2 3 4 6</sup>; IBYME<sup>5</sup>*  
*sabri\_amalfi@hotmail.com*

Una de las hipótesis sobre la etiología del Síndrome del Ovario Poliquístico es que un exceso de andrógenos intrauterino induciría reprogramación fetal, sin embargo se desconoce el alcance de la misma. Objetivo: establecer alteraciones ováricas inducidas por el hiperandrogenismo prenatal (HA). Ratas preñadas Sprague-Dawley se inyectaron entre los días 16 a 19 de gestación con 2 (T2) ó 5 mg (T5) de testosterona ó aceite (control: C), N=10 animales/determinación y por grupo. Las crías hembras se pesaron a los 21 y 60 días de edad (sacrificio) y se midió la distancia uro-genital (como parámetro de masculinización). Por extendido vaginal se determinó el estadio del ciclo sexual. Resultados: El estudio de la morfología ovárica por tinción con hematoxilina-eosina mostró que HA aumentó el número de folículos primarios por ovario, indujo luteinización anómala y quistes foliculares. A

los 21 días de edad, los animales T2 y T5 tenían menor peso que los controles (C: 40±2 g, T2: 34±3g, T5: 20±1 g) pero a los 60 días no había diferencia y la distancia uro-genital de T2 y T5 era mayor (1,7±0,2 y 1,9±0,1, respectivamente) que C (1,2±0,1 mm). La concentración de progesterona en suero evaluada por radioinmunoensayo (RIA) era mayor en T2 (149±50) y T5 (135±18) que en C (68±7 ng/ml suero) y la de estradiol (por RIA) era menor en T2 (0,05±0,02) y T5 (0,06±0,01) que en C (0,37±0,01 ng/ml suero). Testosterona en suero (por RIA), no varió entre los tres grupos. Los animales T5 no presentaron apertura vaginal y no ciclaban. El 20% de T2 tenía ciclos sexuales regulares vs 30% de C. La prostaglandina E ovárica de T2 (3,4±0,9) no era significativamente distinta a la C (3,5±1,09) pero era mayor en T5 (7,9±1,6 pg/mg proteína). Concluimos que HA genera un ambiente desfavorable para el desarrollo fetal que se traduce en un menor peso en los primeros días post-nacimiento. En la pubertad, la esteroidogénesis ovárica se ve alterada y se establece un estado pro-inflamatorio ovárico en T5.

**274. (565) EXPRESIÓN INTRAOVÁRICA DE COMPONENTES DE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE INSULINA EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA.**

Panzani C.<sup>1</sup>; Rodríguez M F.<sup>2</sup>; Benitez G.<sup>3</sup>; Salvetti N.<sup>4</sup>; Stangaferro M.<sup>5</sup>; Ortega H.<sup>6</sup>; Rey F.<sup>7</sup>  
*FCV, Universidad Nacional del Litoral<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
*carolinapanzani@yahoo.com.ar*

La creciente selección de bovinos para la alta producción de leche ha provocado modificaciones en el perfil hormonal dentro de los que se encuentran los niveles de insulina. Bajos niveles de insulina en post-parto inhibirían a la GnRH y subsecuente liberación de LH, asociada a alteraciones en mecanismos implicados en la ovulación. En el ovario la insulina actúa sobre la esteroidogénesis y el crecimiento de células de la granulosa y teca. Dada su importancia, en el presente trabajo se propuso evaluar si existen modificaciones en la expresión intraovárica de mediadores de la respuesta a insulina, en la enfermedad quística ovárica bovina. Se utilizaron muestras de vacas con quistes espontáneos, obtenidas en playa de faena y muestras de animales experimentales, cuyos ciclos estrales fueron sincronizados previamente, y luego divididos en dos grupos. En uno de ellos, se indujo la enfermedad por administración de ACTH, y el otro grupo se mantuvo como control. Luego de la confirmación del desarrollo de quistes por ultrasonografía se realizó la ovariectomía y se obtuvieron muestras de diferentes estructuras foliculares. Sobre cortes tisulares se realizaron inmunohistoquímicas para estudiar la expresión del receptor de insulina (IR beta), el sustrato del receptor tipo I (IRS-1) y la fosfatidilinositol 3'-OH quinasa (PI3K). Los resultados obtenidos mostraron una tendencia a incrementar de los niveles de expresión de IR beta en quistes respecto a las restantes estructuras foliculares (p>0.05). No se detectaron diferencias en la expresión de IRS-1 y PI3K, aunque resta analizar si la actividad de los mencionados intermediarios fosforilados se encuentra modificada. Asimismo, sobre la base de estos resultados, sería relevante estudiar la expresión y actividad de intermediarios subsiguientes en la cascada de señalización de insulina dada su importancia en la funcionalidad ovárica y potencial acción en el desarrollo de la enfermedad quística ovárica bovina.

**275. (717) EFECTO DE NANOPARTICULAS DE ZN Y CU EN EMBRIONES DE RHINELLA ARENARUM**

Herkovits J.<sup>1</sup>; D'eraimo J.<sup>2</sup>  
*Instituto de Ciencias Ambientales y Salud, Fundación PROSAMA<sup>1 2</sup>*  
*herkovit@retina.ar*

El empleo de nanomateriales se consolida para un creciente número de objetivos, incluyendo las ciencias de la salud. En el presente estudio se informa la toxicidad de dos de los nanomateriales potencialmente más tóxicos, el OCu (23 a 37 nm) y OZn (40 a 100nm) durante el desarrollo embrionario y larval de *Rhinella arenarum*. Los tratamientos para el periodo embrionario



se iniciaron en estadio de Contracción Muscular y los del periodo larval en Opérculo Completo. Se mantuvieron 10 individuos por triplicado en 40 mL de solución ANFITOX con OZn en un rango de 1.21 y 60mg/L y para el caso de OCu de 0.31 y 40 mg/L. Las soluciones fueron cambiadas cada 24 hs realizándose el informe de sobrevida, malformaciones y anomalías observables con microscopía óptica. Mediante PROBIT se obtuvieron las CL50 que resultaron para el OCu en 2.38, 0.98 y 0.94mg/L para las 24, 96 y 168 respectivamente. En cambio para el periodo larval los resultados para los mismos tiempos fueron de 6.86, 3.15, 3.14 respectivamente. En el caso del OZn la CL50 para estadios embrionarios fueron de 23.06, 5.25 para 96 y 168hs mientras que para el periodo larval fueron de 10.04, 6.50 respectivamente. En todos los casos se constató una reducción en la talla (20 a 30%). En el caso del Zn, presentaron un cuadro de inmovilidad y marcada bradicardia. No se detectaron efectos teratogénicos notorios. Los organismos experimentales prácticamente no se alimentaban. Los resultados indican que el OCu es en ambos periodos (embrionario y larval) mas toxico que el OZn siendo el periodo embrionario más susceptible en el caso del OCu. Además, la toxicidad de ambas nanopartículas se profundiza en función del tiempo que en el caso del OZn se extiende hasta las 168 hs de tratamiento. Estos resultados indican que las nanopartículas de estos metales presentan una alta toxicidad que deberá tomarse en consideración para las diferentes aplicaciones de los mismos.

**276. (329) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN LUTEAL DE LOS RECEPTORES DE HORMONAS TIROIDEAS EN RATAS GESTANTES; EFECTO DEL HIPERTIROIDISMO.**

Navas P.<sup>1</sup>; Redondo A.<sup>2</sup>; Cuello-carrion D.<sup>3</sup>; Vargas Roig L.<sup>4</sup>; Carreño N.<sup>5</sup>; Jahn G.<sup>6</sup>; Hapon M.<sup>7</sup>  
*IMBECU CCT MENDOZA*<sup>1,2,3,4,5,6</sup>; *IMBECU CCT MENDOZA, ICB UNCUYO*<sup>7</sup>  
 pnavas@mendoza-conicet.gob.ar

En animales de experimentación como en la rata; el hipertiroidismo se asocia con parto prematuro, mayor número de crías que el promedio y deficiencia en la lactancia. El modo clásico de acción de las hormonas tiroideas es modulando directamente la transcripción de genes, ya que sus receptores (TR) actúan como factores de transcripción en procesos tales como la diferenciación, el crecimiento y el metabolismo celular. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que el cuerpo lúteo (CL) de la rata expresa ARNm de las isoformas  $\alpha 1, \alpha 2$  y  $\beta 1$  del TR y su regulación varía a lo largo de la gestación y el postparto. No se conocía hasta la actualidad cuales de estos receptores son expresados a nivel proteico en el CL. El propósito del presente trabajo fue determinar en el CL la presencia a nivel proteico de las isoformas  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  del TR a lo largo de la gestación y el postparto, confirmar la localización celular de estas proteínas y también evaluar la posible modulación de la expresión de estos receptores por el efecto del hipertiroidismo. Por inmunohistoquímica se confirmó la presencia nuclear de TR $\beta 1$  en CL al final de la gestación. La determinación de la expresión por western blot mostró que TR $\beta 1$  aumenta hacia el final de la gestación alcanzando su máxima expresión en G19 y disminuyendo en G21 y postparto  $p < 0.05$ . El TR $\alpha 1$  se expresa en menor proporción que TR $\beta 1$  pero aumenta significativamente al final de la gestación comenzando en G15 y disminuye en G21 y postparto  $p < 0.05$ . El hipertiroidismo no modificó la proporción de la expresión de TR $\alpha$ /TR $\beta$  al final de la gestación pero sí mostró una regulación negativa de la expresión de ambas isoformas TR $\alpha$  y TR $\beta$   $p < 0.05$ . Podemos concluir que las patologías tiroideas durante la gestación pueden ejercer una acción directa a nivel luteal debido a la presencia de las isoformas  $\alpha 1, \beta 1$  del receptor. Por otro lado, se confirma que ambas isoformas son sensibles a la regulación de su expresión por las hormonas tiroideas a nivel luteal.

**277. (190) ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL EPIDÍDIMO DE RATAS BETA, OBESAS, DIABÉTICAS TARDÍAS HASTA LOS 18 MESES DE EDAD**

Tardivo A.<sup>1</sup>; Vazquez S.<sup>2</sup>; Posadas M.<sup>3</sup>; Hisano N.<sup>4</sup>

*Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR*<sup>1, 2, 4</sup>; *Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR*<sup>3</sup>  
 agostina\_tardivo@hotmail.com

Las dismetabolopatías y la edad modifican la estructura histológica del aparato reproductor masculino disminuyendo la espermatogénesis. En la presente comunicación estudiamos la histología epididimaria de las ratas  $\beta$  a distintas edades. Ratas macho de la línea  $\beta$ , obesas, diabéticas tardías y ratas Wistar de 2,4,8,12,y18 meses de edad, fueron alimentadas con alimento balanceado para roedores y se les suministró agua ad-libitum. Se sacrificaron 5 animales de cada grupo etario. Los epidídimos fueron disecados, pesados, en formaldehído 4 % en PBS. Los órganos se procesaron rutinariamente para el estudio histológico, coloreados con H-E, Giemsa y PAS. El peso corporal en la línea  $\beta$  es similar al grupo control y el peso epididimario es menor a los 12 meses con respecto al grupo control. Desde edades tempranas hasta los 8 meses de edad la histología epididimaria no mostró cambios morfológicos significativos y fue similar a las ratas controles. Desde los 12 meses se observaron alteraciones del epitelio epididimario, que se agravaron a los 18 meses de edad. El recuento espermatozoidal así como la histología epididimaria se correlaciona con las modificaciones estructurales observadas en el epidídimo. El recuento de espermatozoides demuestra dos poblaciones bien evidentes a los 18 meses de edad. En el epidídimo se pueden observar estructuras con alteraciones de diversos grados, y las paredes se pueden describir como epitelio hipotrófico y con bordes bien festoneados, sin contenido tubular. A pesar de que en esta línea de ratas la diabetes es de aparición tardía (8 meses) el comienzo de alteraciones morfológicas en epidídimo ese observa recién a partir de los 12 meses, a diferencia del grupo control. Las modificaciones histológicas observadas se correlacionan con la el grado de afectación observado a nivel testicular. En este modelo experimental, el síndrome metabólico a largo plazo genera alteraciones estructurales en el sistema reproductor, verificables entonces en epidídimo.

**278. (195) MODIFICACIONES HISTOLÓGICAS DEL TESTÍCULO EN RATAS BETA, OBESAS, DIABÉTICAS TARDÍAS HASTA LOS 18 MESES DE EDAD**

Vazquez S.<sup>1</sup>; Leiva R.<sup>2</sup>; Hisano N.<sup>3</sup>  
*Cátedra de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR*<sup>1, 3</sup>; *Cátedra de Biología, Facultad de Ciencias Médicas, UNR*<sup>2</sup>  
 silvievaz@hotmail.com

Las dismetabolopatías y la edad modifican la estructura histológica testicular. En la presente comunicación estudiamos la histología testicular en ratas de la línea  $\beta$  a distintas edades. Ratas  $\beta$ , macho, obesas, diabéticas tardías, normocolesterolémicas e hipertriglicéridémicas y ratas Wistar de 2,4,8,12,y18 meses de edad, fueron alimentadas con alimento balanceado para roedores y se les suministró agua ad-libitum. Se sacrificaron 5 animales de cada grupo etario. Los testículos fueron disecados, pesados, fijados en Bouin y refijados en formaldehído 4 % en PBS. Los órganos se procesaron rutinariamente para el estudio histológico, coloreados con H-E, Giemsa y PAS +H. El peso corporal de la línea  $\beta$  fue similar al grupo control y los pesos testiculares fueron menores a los 8 y 12 meses en las ratas  $\beta$  que en sus grupos controles. Desde edades tempranas hasta los 8 meses de edad la histología testicular fue similar a las ratas controles. A los 12 meses se observaron alteraciones morfológicas del epitelio germinal con desprendimiento de las células del compartimiento adluminal, picnosis, cariorrexis y cariólisis. Los túbulos se tornaron macizos, con bordes irregulares y su intersticio presentó capilares con engrosamiento de su pared. A los 18 meses encontramos, túbulos seminíferos atróficos con masas celulares indiferenciadas intraluminales, núcleos picnóticos y presencia de apoptosis. En el intersticio se hallaron gran número de capilares con paredes engrosadas en catáfilas de cebolla. En esta línea de ratas la diabetes es de aparición tardía (8 meses), pero, el comienzo de alteraciones morfológicas testiculares es temprana comparada con

su grupo control. En las ratas  $\beta$  la obesidad, la hipertrigliceridemia junto a la diabetes tardía con el tiempo afectan el metabolismo celular del epitelio seminífero con cambios histológicos severos. La diabetes no controlada con factores de riesgos secundarios en nuestro modelo experimental afecta la histología testicular.

**279. (115) EXPOSICIÓN NEONATAL AL PESTICIDA ENDO-SULFÁN Y SUS EFECTOS SOBRE LA FUNCIONALIDAD UTERINA DURANTE LA PREÑEZ**

Milesi M.<sup>1</sup>; Varayoud J.<sup>2</sup>; Alarcón R.<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, UNL*<sup>1 2 3 4 5</sup>

*mmilesi@fbc.unl.edu.ar*

En nuestro país, la producción agrícola y el consumo de agroquímicos han crecido de manera exponencial. En estudios previos demostramos que la exposición neonatal a endosulfán (pesticida organoclorado) altera la expresión de moléculas que intervienen en el desarrollo y diferenciación del útero en ratas hembras prepuberales. En el presente trabajo nos propusimos determinar los efectos a largo plazo de la exposición neonatal a endosulfán, con énfasis en los efectos sobre la fertilidad y la expresión de genes que regulan la diferenciación del útero en el período de peri-implantación. Ratas hembras fueron tratadas desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta el DPN7 con vehículo (control), dietilestilbestrol 0,2 ug/kg/día (DES) y endosulfán 6 ug/kg/día (Endo6) ó 600 ug/kg/día (Endo600). El DPN90 las hembras fueron preñadas y el día 5 de gestación (DG5) se obtuvieron muestras de útero para incluir en parafina. Por inmunohistoquímica se cuantificó la incorporación de bromodeoxiuridina (proliferación celular) y la expresión de receptor de estrógeno alfa (REa) y progesterona (RP) en el estroma subepitelial. Otro grupo de animales preñados fue sacrificado en DG19 para determinar parámetros de fertilidad: n° de cuerpos lúteos, sitios de implantación y reabsorción. Las hembras tratadas con DES o Endo600 mostraron menor proliferación celular y desregulación en la expresión de REa (Control: 3,4±0,2; DES: 2,4±0,4; Endo600: 4,3±0,4; p<0,05). El grupo Endo600 mostró además una mayor expresión de RP (Control: 3,4±0,4; Endo600: 5,3±0,6; p<0,05). Los animales expuestos a DES o Endo600 presentaron menor n° de sitios de implantación (Control: 12±0,4; DES: 7±0,9; Endo600: 9±1,0; p<0,05), sin diferencias en el n° de cuerpos lúteos y sitios de reabsorción. La exposición neonatal a endosulfán induce efectos adversos a largo plazo, caracterizados por una alteración en la diferenciación uterina en el período de peri-implantación los que podrían disminuir la eficiencia reproductiva de la hembra.

**280. (142) LA EXPOSICIÓN PERINATAL A ESTRÓGENOS AMBIENTALES MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES QUE REGULAN LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE LOS GLÓBULOS GRASOS DURANTE LA LACTOGÉNESIS EN LA GLÁNDULA MAMARIA.**

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

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL*<sup>1 2 3 4</sup>

*gabyaltamirano@hotmail.com*

En estudios previos demostramos que la exposición perinatal a bajas dosis de Bisphenol A (BPA) y Dietilstilbestrol (DES) altera la diferenciación funcional de la glándula mamaria y modifica el contenido proteico de la leche. En el presente trabajo nos propusimos evaluar la influencia de ambos xenoestrógenos sobre la expresión de proteínas que componen la membrana del glóbulo graso, otro de los principales componentes de la leche. Ratas preñadas de la cepa Wistar (F0) fueron expuestas a través del agua de bebida a BPA (0.5 and 50 ug/kg/día), DES (5 ug/kg/día) o vehículo (0.001% etanol) desde el día 9 de gestación (DG9) hasta el destete. Las crías hembras F1 fueron preñadas y se obtuvieron muestras de glándula mamaria en DG18 y DG21. Se utilizó RT-PCR en tiempo real para evaluar la expresión de los ARNm de Adipofilina (ADPF), Xantina-Oxidoreductasa (XOR) y

Butirofilina (BTN), cuya expresión se limita al epitelio mamario. En DG18, la exposición perinatal a DES y ambas dosis de BPA produjeron una disminución en los niveles del mensajero de ADPF; además, las hembras expuestas a BPA0.5 y DES presentaron menor expresión de XOR y BTN. En DG21, la expresión del ARNm de ADPF se mantuvo reducida en el grupo BPA50, mientras que no se observaron diferencias respecto al control en los grupos BPA0.5 y DES. Asimismo en DG21, los animales expuestos a BPA y DES exhibieron niveles de expresión del ARNm de XOR inferiores al control y los grupos BPA50 y DES presentaron una menor expresión de BTN. Los resultados muestran efectos a largo plazo de la exposición perinatal a bajas dosis de estrógenos ambientales, evidenciados por modificaciones -durante la gestación- en la expresión de genes que controlan la composición proteica de la membrana de los glóbulos grasos en el epitelio mamario. Esta alteración podría conducir a un incorrecto ensamblado y secreción de los glóbulos grasos durante la lactogénesis y, en consecuencia, modificar el contenido lipídico de la leche.

**281. (144) ALTERACIONES EN LA INTEGRIDAD Y PERMEABILIDAD DE LA BARRERA HEMATO-TESTICULAR (BHT) DURANTE EL DESARROLLO DE UNA ORQUITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL (OAE) EN LA RATA**

Pérez C.<sup>1</sup>; Sobarzo C.<sup>2</sup>; Theas M.<sup>3</sup>; Denduchis B.<sup>4</sup>; Lustig L.<sup>5</sup>

*Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA*<sup>1 2 3 4 5</sup>

*ceciliaperez77@yahoo.com.ar*

La OAE se caracteriza por la presencia de un infiltrado linfomocitario intersticial y daño severo del epitelio seminífero (ES) que presenta apoptosis y descamación de las células germinales (CG). El objetivo de este trabajo es analizar la expresión y localización de las proteínas que forman parte de las uniones estrechas que componen la BHT entre células de Sertoli, explorando el estado funcional de dicha barrera durante el desarrollo de la OAE. Se indujo OAE en ratas por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes. Ratas del grupo control (C) fueron inyectadas sólo con adyuvantes, estudiándose también ratas sin tratar (N). Los animales se sacrificaron a los 30 días (d) de la primera inmunización, 40d (inicio de la lesión focal), 50d (orquitis focal) y 80d (orquitis severa). Observamos por inmunofluorescencia (IF) y Western blot una reducción significativa en la expresión de ocludina en el testículo de las ratas con OAE focal y severa (p<0,01 vs C). Por IF observamos una deslocalización de claudina-11 y ZO-1 en el testículo de las ratas con OAE, mientras que no se detectaron alteraciones en su expresión por Western blot, comparado con las ratas C. Concomitante con los cambios en la expresión de las moléculas de adhesión celular detectamos un aumento de la permeabilidad de la BHT, ya que los trazadores inyectados en las ratas con OAE difundieron a través de las uniones estrechas, alcanzando el compartimento adluminal del ES a diferencia de las ratas C y N. La vía de señalización p38 MAPK está involucrada en la regulación de la dinámica de las uniones estrechas entre células de Sertoli ya que detectamos un aumento de la forma fosforilada de p38 en el testículo de las ratas con OAE. Especulamos que citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL6, IFN- $\gamma$ ) cuyo nivel está aumentado en el microambiente testicular en la OAE estarían modulando, entre otros factores, la dinámica de las uniones estrechas, alterando la funcionalidad de la BHT y la integridad del ES.

**282. (172) TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO EN RATAS ADULTAS EXPUESTAS PERINATALMENTE A BISFENOL A: ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL DEL ÚTERO**

Bosquiazzo V.<sup>1</sup>; Vigezzi L.<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, UNL*<sup>1 2 3 4</sup>

*vlbosqui@fbc.unl.edu.ar*

En trabajos previos demostramos que la exposición perinatal a Bisfenol A (BPA) afecta la respuesta uterina a las hormonas ováricas en la adultez. Nuestro objetivo fue estudiar la histomor-

fología y la expresión de moléculas en el útero de ratas adultas con terapia hormonal de reemplazo y que habían sido expuestas perinatalmente a BPA. Ratas preñadas fueron expuestas a través del agua de bebida al vehículo (control), BPA 0.5 o 50 ug/Kg/día desde el día 9 de gestación hasta el destete. A los 12 meses de edad las crías fueron ovariectomizadas y tratadas vía sc con 17 $\beta$ -estradiol (E2) durante 3 meses. Se diseccionaron los cuernos uterinos para incluirlos en parafina o conservarlos a -80°C. La histopatología uterina se estudió con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica de p63. Mediante RT-PCR en tiempo real se evaluó la expresión del ARNm de las isoformas de p63: TA y  $\Delta$ N, y del factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I) y su receptor (IGF-IR). El análisis histológico demostró una variedad de lesiones glandulares: glándulas quísticas, hipertróficas, con atipias nucleares (núcleos hipocrómicos), metaplasias escamosas y glándulas con glándulas hijas. En animales expuestos a BPA0.5 aumentó la densidad de glándulas con glándulas hijas (control 0,1 $\pm$ 0,1 vs BPA0.5 1,8 $\pm$ 0,7 p<0.05) y en los de BPA50 aumentó la densidad de glándulas con metaplasia escamosa (control 1,7 $\pm$ 0,3 vs BPA50 3,8 $\pm$ 0,8 p<0.05). La expresión de p63 y del ARNm de la isoforma TA fue menor en BPA0.5 (p63: control 63,8 $\pm$ 2,7 vs BPA0.5 50,9 $\pm$ 5,5; TA: control 1 vs BPA0.5 0,49 p<0.05). En BPA50 la expresión de TA aumentó (control 1 vs BPA50 2.1; p<0.05). Las hembras expuestas a BPA0.5 presentaron menor expresión de IGF-I e IGF-IR. Los resultados demostraron que la exposición a BPA modificó la respuesta uterina al tratamiento con E2. La susceptibilidad a diversas lesiones glandulares y la expresión de moléculas implicadas en la diferenciación funcional uterina difirió según la dosis de BPA administrada perinatalmente

### ENDOCRINOLOGÍA 3

#### 283. (347) ANÁLISIS DE MUTACIONES INACTIVANTES EN EL GEN DE LA TIROGLOBULINA HUMANA Y SUS EFECTOS SOBRE LOS DOMINIOS FUNCIONALES.

Citterio C.<sup>1</sup>; Machiavelli G.<sup>2</sup>; Belforte F.<sup>3</sup>; Olcese M.<sup>4</sup>; Rivolta C.<sup>5</sup>; Targovnik H.<sup>6</sup>

Laboratorio de Biología Molecular, Cátedra de Genética y Biología Molecular, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
<cintia\_citterio@hotmail.com

La biosíntesis de las hormonas tiroideas requiere la integridad de un sistema complejo de proteínas dependientes de la estructura tridimensional de la tiroglobulina (TG). La TG es codificada por un gen de 270 Kb que comprende 48 exones. El monómero contiene 2768 residuos y se compone de cuatro regiones funcionales y estructurales. El amino-terminal y la parte media contienen tres tipos de motivos repetitivos, organizados en tres regiones: I, II y III. La cuarta región se encuentra en el carboxilo-terminal y contiene un dominio no repetitivo que muestra una homología con la acetilcolinesterasa (ACHE-like domain). Los objetivos del presente trabajo fueron: a) Identificar nuevas mutaciones inactivantes en el gen de la TG; b) Predecir el impacto de sustituciones aminoácidas en la estructura y 3) Construir minigenes para el análisis funcional de las variaciones de secuencia en sitios consenso de splicing. Se identificaron diecisiete mutaciones no descritas: exón 4 (p.Y107X), g.IVS6+1G>A, exón 10 (p.Q717X, p.R768X, p.R893fsX946), exón 17 (p.S1203L, p.R1251C, p.I1244fsX1246, p.C1262Y), g.IVS19+3\_+4delAT, exón 27 (p.Q1777X), exón 28 (p.K1803fsX1833), exón 33 (p.C1981W, del exón 33), exón 38 (p.P2183R), exón 40 (p.R2317X), exón 48 (del exón 48). Se caracterizaron sitios críticos de "splicing" en los intrones 6 y 19 que son activados cuando los auténticos sitios están mutados (g.IVS6+1G>A, g.IVS19+3\_+4delAT). Factores específicos de secuencia y factores genéticos celulares contribuyen al uso diferencial de estos sitios críticos. Una extensa delección fue localizada en el último exón de la TG que se extiende a la región intergénica. Finalmente, se correlacionó funcionalmente la localización de las mutaciones con las cuatro regiones del monómero. En conclusión, los efectos más importantes de las

mutaciones en el gen de TG originan cambios conformacionales que eliminan sitios homonogénicos, activan sitios críticos de splicing y afectan su transporte intracelular.

#### 284. (464) DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y EVALUACIÓN ENDOCRINOLÓGICA EN LA DEFICIENCIA DE AROMATASA, TRES MUTACIONES NUEVAS Y UN POSIBLE EFECTO FUNDADOR.

Perez Garrido N.<sup>1</sup>; Marino R.<sup>2</sup>; Saraco N.<sup>3</sup>; Rocco C.<sup>4</sup>; Guercio G.<sup>5</sup>; Costanzo M.<sup>6</sup>; Warman D.<sup>7</sup>; Ciaccio M.<sup>8</sup>; Pena G.<sup>9</sup>; Garcia J.<sup>10</sup>; Miras M.<sup>11</sup>; De Lacerda L.<sup>12</sup>; Rivarola M.<sup>13</sup>; Belgorosky A.<sup>14</sup>

Hospital de Pediatría Garrahan<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 13 14</sup>; Hospital Infantil Municipal de Córdoba<sup>9</sup>; Hospital Regional de Concepción Tucumán<sup>10</sup>; Hospital de Niños de la Santísima Trinidad de Córdoba<sup>11</sup>; Universidad Federal de Paraná, Curitiba, Brasil<sup>12</sup>  
pgnatalia@yahoo.com.ar

Introducción: Varias alteraciones moleculares del gen CYP19A1, asociadas con deficiencia de cP450arom, fueron descritas en ambos sexos. Desde 1991, han sido reportados 19 casos de deficiencia de aromatasa, 11 mujeres y 8 varones. El fenotipo depende del sexo, edad y puede ser variable de acuerdo al grado de actividad enzimática. Objetivos: Detectar mutaciones en el gen CYP19A1 en pacientes con deficiencia de aromatasa. Describir características clínicas y endocrinológicas. Construir haplotipos ligados a una mutación recurrente. Métodos: Secuenciación de la región codificante y de las regiones intrónicas flanqueantes del gen CYP19A1 en todos los pacientes y sus padres. Material clínico: Estudiamos siete mujeres con genitales ambiguos al nacer. En 4/7 hubo ausencia de virilización materna durante el embarazo. Detectamos quistes ováricos en 5/7 y 3/7 presentaron desarrollo mamario espontáneo. Resultados: En 4/7 pacientes no relacionados detectamos la mutación de splicing c655G>A (2 en estado homocigota y 2 heterocigotas compuestas con otra mutación), previamente descrita en un paciente argentino XY con deficiencia de aromatasa. Encontramos 2 nuevas mutaciones sin sentido en 3 pacientes (p.Y81C, p.R192C) en estado homocigota o heterocigota compuesto y se encontró una nueva mutación de splicing en un paciente en estado homocigota (IVS9+5 G>A). Para investigar la posibilidad de un ancestro en común ligado a c655G>A en nuestra población, caracterizamos los haplotipos de los cuatro pacientes portadores de c655G>A utilizando 22 marcadores polimórficos del gen y los comparamos con población caucásica americana. Todos los alelos c655G>A compartieron el mismo haplotipo. Encontramos c655G>A ligada al mismo haplotipo con una frecuencia significativamente más alta que lo esperado (p=0.019). Conclusión: Estos resultados sugieren que c655G>A apareció en un haplotipo ancestral y su alta frecuencia en nuestra población sería consecuencia de un efecto fundador.

#### 285. (443) IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES DEL EJE GH-IGF1 EN PACIENTES ARGENTINOS CON TALLA BAJA

Juanes M.<sup>1</sup>; Marino R.<sup>2</sup>; Ciaccio M.<sup>3</sup>; Rivarola M.<sup>4</sup>; Belgorosky A.<sup>5</sup>

Hospital de Pediatría Juan P Garrahan<sup>1 2 3 4 5</sup>  
matiasjuanes@hotmail.com

En humanos alteraciones en el eje GH-IGF1 generan retardo del crecimiento postnatal. Se estudiaron 71 pacientes argentinos, 55 familias con deficiencia aislada de GH-1 (GHID) y 10 con insensibilidad a IGF-1. Los criterios de selección del grupo con GHID fueron: talla <-2 SDS, niveles séricos de GH <6.1ng/ml luego de la estimulación con dos tests farmacológicos y velocidad de crecimiento <-1.3 SDS, con RMN normal. Para el grupo con insensibilidad a IGF-1 fueron: niveles séricos normales de GH-1, normales o aumentados de IGF-1, falta de respuesta al test de estimulación con IGF-1 y retardo de crecimiento intrauterino. Se analizaron los genes GHRH-R, GH-1 e IGF1R por secuenciación automática luego de la amplificación por PCR del gen. El gen GH-1 también fue analizado por digestión con enzimas de restricción (Bgl II, Hae II, Sma I) de productos de PCR del

gen, para detectar grandes deleciones. En el gen GH-1 describimos 6 familias con la presencia de tres mutaciones puntuales heterocigotas (R183H, 4/55, 7.27%; Thr-24Ala, 1/55, 1.81%; V110I, 1/55, 1.81%), dos familias con la deleción de 6.7 kb en estado homocigota (2/55, 3.63%) y 46 familias sin alteraciones. Al analizar el gen GHRH-R se detectó una familia con la mutación M422T en estado heterocigota (1/55, 1.81%). El estudio del gen IGF1R dio como resultado la presencia de dos variantes alélicas, R1256S y R1337C (no descritas) en dos pacientes, ambas en estado heterocigota. Se analizaron los posibles efectos, a nivel de la función proteica, mediante dos ensayos *in silico* (Polyphen: 2.8; 2.5 de Score, Mutation Taster: 3.0; 4.9) sugiriendo, con una alta probabilidad, que estos cambios aminoacídicos afectarían la funcionalidad de la proteína. Si bien solo se puede detectar una alteración del sistema GH-IGF1 en un 16.9% de las familias, este estudio ha permitido caracterizar dos nuevas mutaciones en el gen IGF1R representando una herramienta de utilidad para definir con mayor precisión la conducta terapéutica.

#### 286. (198) ENFERMEDAD DE VON HIPPEL LINDAU: PRESENTACIÓN CLÍNICA DE ACUERDO A LA EDAD Y AL GENOTIPO

Vieites A.<sup>1</sup>; Sansó G.<sup>2</sup>; Levin G.<sup>3</sup>; Barontini M.<sup>4</sup>  
Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez<sup>1,2,3,4</sup>  
anavieites@yahoo.com

La enfermedad de von Hippel Lindau (VHL) es un síndrome hereditario causado por mutaciones en el gen supresor *vhl*. Pre-dispone al desarrollo de tumores benignos, malignos y quistes en diversos órganos. El objetivo fue evaluar la presentación clínica y la evolución de 49 pacientes con VHL de acuerdo a la edad de comienzo y al genotipo. Los pacientes (pac) se dividieron en 2 grupos (G): G1: menores de 21 años (n=31, masc:20, fem:11) y G2: 24-75a (n=18; masc:11, fem:7). G1: la manifestación inicial (MI) más frecuente fue el feocromocitoma (feo), presente en 25/31 pac (81%). 20/25 pac estuvieron libres de enfermedad con una mediana 6.5 años (rango 2-34 a). Los restantes (5/25) presentaron hemangioblastoma SNC (4), de retina (2) y/o carcinoma de páncreas (1), con un intervalo libre de enfermedad de 4-23 años (mediana 19). La MI de los 6 restantes fue hemangioblastoma de SNC (4), de retina (1) y tumor de saco endolinfático (1). En 3/6 pacientes el tumor recidivó o se afectó otro órgano (1-2 años). Un paciente murió. En el G2, la MI más frecuente fue el hemangioblastoma de SNC en 8/18 pacientes (45%), seguido por el feo en 6/18 pacientes (33%). En 2/18 la MI fue hemangioblastoma retinal, en 1/18 carcinoma de células renales y en 1/18 tumor neuroendócrino de páncreas. Nueve pacientes estuvieron libres de enfermedad con un seguimiento de 1-30 años (mediana de 5 años). Tres pacientes murieron. Mutaciones encontradas en los casos índice: Arg167Thr (4), Arg161Term (3), Pro193Leu (2), Arg161Gln (1), Arg167Gln (1), Arg9His (1), Gly144Term (1), Leu163Arg (1), Pro138Arg (1), Pro86Ser (1), Thr124Ile (1), Val84Leu (1), Arg200Pro (1). Todas se asocian con feocromocitoma, excepto Arg161Term. En conclusión, el feo es la manifestación inicial predominante en menores de 21 años, presentando estos pacientes una evolución mucho más favorable que los que tuvieron otros tumores como manifestación inicial. Dado que el período libre de enfermedad puede ser muy largo, el seguimiento clínico debe ser de por vida en estos pacientes.

#### 287. (701) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MUTACIONES EN EL RECEPTOR BETA DE HORMONAS TIROIDEAS CAUSANTES DE RESISTENCIA A 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>  
Cátedra de Genética y Biología Molecular, FFyB, UBA<sup>1,2,3,4,5</sup>  
escorpioceily@yahoo.com.ar

El receptor de hormonas tiroideas (TR) posee una estructura proteica conservada, que incluye un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio de unión al ligando (LBD). Es codificado por el gen *THRB*. El 90 % de las mutaciones en dicho gen son la causa del Síndrome de Resistencia a Hormonas Tiroideas (RTH) y la mayoría de las mismas se localizan en el LBD. Los

TRs son factores de transcripción dependientes de ligando que median las acciones biológicas de T3. La unión de esta hormona provoca cambios estructurales en el LBD que tienen como consecuencia la liberación de co-represores y el reclutamiento de co-activadores. La actividad también está influenciada por el estado oligomérico del receptor que principalmente establece heterodímeros con el receptor de ácido retinoico. Si bien muchas mutaciones disminuyen la afinidad del receptor por la hormona, otras afectan el recambio de co-reguladores. Se han identificado en nuestro laboratorio 14 mutaciones diferentes en 16 pacientes no relacionados. Entre las mismas, 8 no descritas previamente. En este estudio, hemos analizado las características de 7 mutaciones identificadas en pacientes con grados variables de RHT con el fin de comprender los posibles mecanismos moleculares de su patogenicidad: p.N331D, p.R338W, p.L346F, p.D351E, p.P447T, p.P453L y p.P453T. Se examinaron las variaciones estructurales y fisicoquímicas utilizando los programas Swiss-PdbViewer versión 4.0.3 y FOLDX versión 3.0, en base a estructuras cristalográficas del LBD del receptor de T3 humano (PDBs: 3GWS, 1NAX, 1BSX y 3D57). Nuestros resultados sugieren que las mutaciones p.R338W y p.D351E producen variaciones en las superficies de dimerización; p.P447T, p.P453L y p.P453T en las superficies de interacción con coactivadores; p.N331D y p.L346F en la estabilidad y distribución de cargas. En conclusión este análisis proporciona información útil para la comprensión de la relación genotipo-estructura-actividad-fenotipo.

#### 288. (35) TRATAMIENTO DE LA DIABETES TIPO 1 CON ACETIL-L-CARNITINA Y NICOTINAMIDA

Cresto J.<sup>1</sup>; Fernandez I.<sup>2</sup>; Trifone L.<sup>3</sup>; Toniatti M.<sup>4</sup>; Bergada I.<sup>5</sup>; Trabucchi A.<sup>6</sup>; Martucci L.<sup>7</sup>; Valdez S.<sup>8</sup>; Camberos M.<sup>9</sup>; Schenone A.<sup>10</sup>; Szlago M.<sup>11</sup>; Fretchel G.<sup>12</sup>; Tellechea M.<sup>13</sup>; Poskus E.<sup>14</sup>  
Centro de Investigaciones Endocrinológicas<sup>1,5,7,9</sup>; Servicio de Diabetes, Htal. de Niños "R. Gutiérrez"<sup>2</sup>; Servicio de Diabetes, Htal. de Niños "R. Gutiérrez"<sup>3,4</sup>; IDEHU, FFyB, UBA<sup>6,8,14</sup>; Enferm Metab (FESEN)<sup>10,11</sup>; Genética y Biol Mol, Htal. de Clínicas<sup>12,13</sup>  
jcresto@cedie.org.ar

Objetivos - Evaluar el tratamiento con acetil-L-carnitina (50 mg/Kg/ día) y nicotinamida (25 mg/Kg/día) en niños con riesgo de diabetes tipo 1. Métodos - Los niños fueron cosanguíneos de diabéticos tipo 1. Se determinó HLA-DQB1, anticuerpos (GABA, PAA, IA2A), PTEVG, carnitina y HbA1c. Resultados - Se separó aleatoriamente a los niños en grupo control y tratado. La evolución requirió que todos fueran tratados, ya que razones éticas en pediatría impiden esperar el desarrollo de la diabetes clínica. Diez niños fueron tratados durante 36 meses (rango: 18-59). Uno desarrolló diabetes clínica debido a un tratamiento incompleto. De los 9 niños restantes ninguno desarrolló diabetes clínica. Fueron divididos en 2 grupos de acuerdo a su evolución. El grupo 1 (6 niños) evolucionó favorablemente, 2 de ellos suprimieron el tratamiento, 1 continúa con ¼ de la dosis inicial y los otros 3 tratados han normalizado sus parámetros metabólicos. El grupo 2 (2 niños) detuvo la evolución de la enfermedad pero no han normalizado estos parámetros. Ambos grupos partieron en situación similar y en la actualidad se diferencian estadísticamente. Primer Pico (µU/Ins): 75 (n: 47) vs 43 (n: 18); glucemia basal (mg%): 85 (n: 48) vs 105 (n: 21); glucemia 60 min (mg%): 108 (n: 49) vs 135 (n: 21); HbA1c (%): 5.77 (n: 23) vs 6.55 (n: 15). Hasta la actualidad no presentaron signos de: intolerancia, toxicidad ni alteraciones en la conducta. El crecimiento, desarrollo, escolaridad y los juegos son normales. Conclusión - El tratamiento permite remitir o detener la evolución de la enfermedad.

## METABOLISMO Y NUTRICIÓN 2

#### 289. (83) EFECTO DE LA INGESTA DE CALCIO SOBRE EL REMODELAMIENTO Y LA MASA OSEA EN RATAS EN CRECIMIENTO DE LA CEPAS WISTAR (W) Y ESPONTANEAMENTE OBESAS (O).

Marotte C.<sup>1</sup>; Weisstaub A.<sup>2</sup>; Bryk G.<sup>3</sup>; Gonzales Chaves M.<sup>4</sup>; Portela M.<sup>5</sup>; Zeni S.<sup>6</sup>

Sección de Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, UBA, Cátedra de Bioquímica General y bucal, Facultad de Odontología, UBA, CONICET<sup>1,4,6</sup>; Cátedra de Nutrición y Bromatología, FFyB, UBA<sup>2,5</sup>; Sección de Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, UBA<sup>3</sup>  
clarisa128@hotmail.com

Estudios recientes relacionan a la insuficiencia de calcio (Ca) con el aumento en la prevalencia de obesidad/sobrepeso. El objetivo fue comparar durante el crecimiento los cambios que la ingesta de Ca produzca en la composición corporal, marcadores óseos y hueso de ratas W vs. O.

Desde el apareo madres W y O consumieron una de dos dietas que cumplían con los requerimientos nutricionales para roedores (AIN 93G) pero variando el Ca: GR conteniendo 0.6% de Ca (recomendada) y GI con 0.2% de Ca (insuficiente). Al destete, las crías macho continuaron con la dieta materna hasta los 50 días. A tiempo final se analizó: composición corporal (AOAC), densidad y contenido mineral (DMO y CMO, respectivamente) por DXA y en suero fosfatasa alcalina ósea (FAO), osteocalcina (BGP) y telopéptidos del colágeno tipo 1 (CTX) (ELISA). Resultados (medio± SD):

	G1 W (n=11)	G1 O (n=11)	G2 W (n=12)	G2 O (n=9)
Agua corporal (g/100 g)	64.0 ± 4.6a	66.7±2.8a	69.2±2.2a	67.3±2.2a
Proteínas totales (%PT)(g/100 g)	19.7 ± 2.9a	17.3±1.7b	17.9±1.3b	14.8± 2.6c
Cenizas totales (g/100 g)	3.2±0.4a	2.6±0.2b	2.1±0.3b,d	2.0±0.2c,d
Grasa corporal (%G)(g/100 g)	10.0 ± 1.7a	13.1 ± 2.2b	11.4±2.1b	15.9±2.6c
FAO (IU/L)	71 ± 7a	193 ± 39b	78±10a	186 ± 27b
BGP (UI/L)	791 ± 136a	352 ± 92b	1056±194c	478 ± 45b
SCTX	88± 16a	71±12b	85±19a	78 ± 11b
DMO esqueleto total (mg)	226±2a	235±7a	232±8a	222±9a
CMO/peso (g/100)	1.82±0.37a	1.48±0.24b	1.15±0.17c	1.04±0.9d

Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05). La disminución en el aporte de Ca indujeron cambios en la composición corporal de W y O: aumento de %G, disminución de %PT y % cenizas. Esta última disminución se evidenció en el CMO y por cambios en marcadores del remodelamiento óseo: menor resorción, aumento de FAO y disminución de BGP. Conclusiones: Ambas cepas responden por igual a la disminución del aporte de Ca y sugieren una interconexión entre la etiología de la obesidad y la disminución en la masa ósea. UBACYT (2008-10) B091.

## 290. (235) LA SALUD BUCAL Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO NUTRICIONAL DE CALCIO (CA) Y VITAMINA D (VITD) EN UN GRUPO DE ESTUDIANTES DEL PRIMER AÑO DE NUTRICIÓN.

Bryk G.<sup>1</sup>; Antonenko O.<sup>2</sup>; Pellegrini G.<sup>3</sup>; Zeni Coronel M.<sup>4</sup>; Brito G.<sup>5</sup>; Somoza J.<sup>6</sup>; Zeni S.<sup>7</sup>

Sección de Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, UBA<sup>1,4,5,6</sup>; Sección de Osteopatías Médicas, Hospital de Clínicas, UBA, Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, UBA<sup>2,3,7</sup>  
brykgabriel@hotmail.com

Nutrición y salud bucal se interrelacionan. A nivel mundial, incluyendo Argentina, existen dos insuficiencias nutricionales extendidas Ca y vitD que junto a ciertos hábitos como consumo de productos azucarados (momentos de azúcar: MA), de bebidas carbonatadas y escaso consumo de frutas y verduras afectan el estado los tejidos mineralizados. Objetivo: Evaluar el estado nutricional del Ca y vitD junto a ciertos hábitos en relación a la salud bucal en 65 (20-30 años) estudiantes universitarios de la carrera de Nutrición (Universidad ISALUD). A 15 varones y 50 de mujeres se les realizó un recordatorio semanal de ingesta, frecuencia de consumo y prácticas alimenticias, ejercicio y estilo de vida (consumo de tabaco y gaseosas, anticonceptivos, etc). Se calculó ingesta de Ca, se midió peso y altura, y se determinó 25hidroxivitamina D

(25OH), calcemia, fosfatemia y marcadores óseos en sangre. Se realizó un examen buco-dental y densitometría ósea de esqueleto total por DXA (Lunar). El 9% de mujeres y 20% de varones presentó sobrepeso y obesidad clase I. El 100% presentó DMO normal. Ingesta de Ca: 602±291 [118-1239] en mujeres y un poco menor en varones. Cantidad de Ca recomendada (1000 mg/d): ambos géneros 14%. Niveles de 25OHD de suficiencia (>30 ng/ml): 34% mujeres y 20% varones. No consumía frutas 26% y verduras 8%; gaseosas diariamente: mujeres 72% y varones 86%. Ejercicio: 20% de ningún tipo. Consumo de tabaco: mujeres 39% y varones 14%. Gingivitis 100%; bruxismo 72% y apretamiento 84%; MA>4 mujeres 61% y varones 82%; pérdida parcial de dientes: mujeres 45% y varones 29%. Conclusiones: existe una alta insuficiencia de vitD y bajo consumo de Ca que asociado a ciertos hábitos alimentarios y estilo de vida afectan enormemente la salud buco-dental y en el futuro la masa ósea. Una correcta educación nutricional mejoraría la calidad de vida previniendo el desarrollo de diversas patologías. Parte de tesis doctoral O Antonenko.

## 291. (531) INFLAMACIÓN DE LA MUCOSA INTESTINAL DE RATAS EN CRECIMIENTO POR ADMINISTRACIÓN DE DIETA A BASE DE QUINOA (CHENOPODIUM QUINOA W)\*

Vidueiros S.<sup>1</sup>; Fernandez I.<sup>2</sup>; Bertero H.<sup>3</sup>; Roux M.<sup>4</sup>; Pallaro A.<sup>5</sup>

Cátedra de Nutrición, FFyB, UBA<sup>1,2,5</sup>; Cátedra de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, UBA<sup>3</sup>; Instituto de Investigaciones Cardiológicas "Dr. Alberto C Taquini" (ININCA) UBA-CONICET<sup>4</sup>  
simavidu@ffyb.uba.ar

En estudios previos se caracterizaron las propiedades nutricionales del germoplasma de quinoa del Noroeste Argentino indicando una promisorio calidad nutricional. La semilla de quinoa sin tratamiento de lavado posee un alto contenido de saponinas que le otorgan un sabor amargo y por sus propiedades detergentes podrían alterar la mucosa intestinal. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la administración de una variedad de quinoa de la localidad de Campo Tapial de Colanzuli, Iruya, Salta sin tratamiento previo de lavado sobre la mucosa intestinal de ratas en período de crecimiento. Materiales y métodos: Ratas Wistar, divididas en 3 lotes (n=6/lote) fueron alimentadas desde el destete y durante 7 días con dieta al 10% de proteína de 1) quinoa sin lavar (Q); 2) quinoa comercial lavada (QR); 3) caseína (C), como grupo control. Se determinó el peso corporal (PC.g) y se calculó la velocidad de ganancia de peso (VGP.g/día/100g). Se registró el consumo de dieta (CD, g/día) durante toda la experiencia. Los intestinos fueron removidos, procesados por la técnica de Saint Marie y coloreados con Alcian Blue-H/E. Se determinaron las células goblets/100 células epiteliales en 10 vellosidades intestinales/animal (CG). Se caracterizó la IL-17 en lámina propia (LP) e intraepitelio (IE) por IFI (células+/30 campos). Análisis estadístico: ANOVA-SNK/Kruskal-Wallis. Resultados:

Lotes	PC*	VGP*	CD*	CG*	IL-17 LP*	IL-17 IE*
Q	45.0±2.7a	-1.97±0.6a	4.7±0.3 a	24.2±6.5b	60.3±9.0b	9.3±4.2a
QR	60.0±5.4b	1.63±0.5b	6.9±1.0ab	14.7±2.7a	41.7±4.6a	10.5±3.7a
C	69.7±6.4c	3.95±0.9c	8.4±0.6b	10.9±1.2a	38.0±3.9a	9.0±1.6a

\*Media±DS. Letras diferentes entre columnas, diferencia significativa 0.05>p<0.001. Conclusiones: El aumento significativo de las células goblets y la IL-17 en la vellosidad intestinal del lote Q indicaría un proceso inflamatorio probablemente provocado por la presencia de saponinas de la quinoa sin lavar. Este hecho podría afectar la normal absorción intestinal de nutrientes lo que se refleja en el PC, VGP y CD, comparando con el lote QR. \*Financiado por UBACYT 20020100100255 y 20620100100014

## 292. (570) CONSUMO DE OXIGENO: I. MODULADOR Y BIOMARCADOR DE LA TOXICIDAD POR CADMIO EN EMBRIONES DE RHINELLA ARENARUM.

Herkovits J.<sup>1</sup>; D'eraimo J.<sup>2</sup>; Grosskopf D.<sup>3</sup>  
Instituto de Ciencias Ambientales y Salud, Fundación PROSAMA<sup>1,2,3</sup>  
herkovit@retina.ar

La hipoxia puede resultar en eventos de extrema gravedad en la salud y hasta en muerte. La hipoxia en situaciones ambientales se considera indicadora de daño ambiental. En el presente estudio se informan los cambios en el consumo de oxígeno en embriones de *Rhinella arenarum* expuestos a Cd<sup>2+</sup> y el efecto del O<sub>2</sub> sobre la toxicidad del Cd<sup>2+</sup>. El efecto del Cd<sup>2+</sup> sobre el consumo de O<sub>2</sub> se evaluó mediante el tratamiento continuo de embriones en E.25 con concentraciones de Cd<sup>2+</sup> de 0,01; 0,1; 0,7 y 1,4 mg/l. mantenidos en 40mL de solución ANFITOX midiéndose el consumo de oxígeno a partir de 4 hs y luego cada 24hs hasta las 96 hs. Los tratamientos con Cd<sup>2+</sup> con 0,01 y 0,1mg/L Cd<sup>2+</sup> no resultaron en letalidad, mientras que 0,7 y 1,4 mg/L de Cd<sup>2+</sup> resultan en muerte para el 60% y 100% de los embriones a las 48hs de tratamiento. El consumo de oxígeno se midió utilizando un electrodo polarográfico inserto en una cámara acrílica, con agitación y termostatación presentando los embriones controles un incremento de 96 a 213 uL x 10<sup>-3</sup> de O<sub>2</sub> embrión/min. durante las 96hs de evaluación, valores que no presentaron diferencias significativas para las concentraciones subletales de Cd<sup>2+</sup>. En cambio, 0,7mg/L resultó en una disminución registrables pero no significativa a las 4hs post exposición y a valores de 16 y 45% por embrión respecto a controles para las 24 y 96hs respectivamente. El efecto del O<sub>2</sub> sobre la toxicidad del Cd<sup>2+</sup> se evaluó mediante tratamientos con anoxia por 30 min. post exposición de 30 min. a 0,5mg/L del metal pesado que resultó a las 24 hs. en la sobrevida del 90% de los embriones; 30 min. de anoxia resultó en 100% de sobrevida mientras que el tratamiento con Cd solo, resultó en 100% de letalidad. Los resultados indican que el consumo de O<sub>2</sub> es un biomarcador no invasivo y predictivo de letalidad por Cd<sup>2+</sup> y que el O<sub>2</sub> es un componente fundamental en la toxicidad del metal en cuyo contexto la reducción en su consumo podría implicar también un mecanismo de defensa del organismo.

**293. (575) ALTERACIONES FUNCIONALES Y MORFOLÓGICAS EN LA CORTEZA ADRENAL DE RATAS CON INSULINORRESISTENCIA (IR) INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN SACAROSA (DRS)**

Martinez Calejman C.<sup>1</sup>; Di Gruccio J.<sup>2</sup>; Jaime D.<sup>3</sup>; Astort F.<sup>4</sup>; Sanchez R.<sup>5</sup>; Mercou M.<sup>6</sup>; Arias P.<sup>7</sup>; Cymeryng C.<sup>8</sup>  
*Facultad de Medicina, UBA, CEFYBO CONICET<sup>1 2 3 4</sup>*  
<sup>5 6 8</sup>; *Facultad de Medicina, UBA, Facultad de Ciencias Médicas, UNL<sup>7</sup>*  
 camilamartinez@hotmail.com

Introducción: Tanto en sujetos como en animales de laboratorio con IR se describen alteraciones en la secreción y/o en el metabolismo de los glucocorticoides. En el presente trabajo evaluamos aspectos funcionales y morfológicos de la corteza adrenal durante la inducción de IR por una DRS, así como y el efecto del tratamiento insulinosensibilizador con rosiglitazona (RSG, agonista PPAR $\gamma$ ) sobre estos parámetros. Métodos: Ratas Wistar macho adultas recibieron sacarosa al 30% con el agua de bebida (DRS), o su dieta habitual. Se determinaron parámetros bioquímicos de IR y de función suprarrenal en suero y, a nivel adrenal, la expresión de proteínas involucradas en la esteroideogénesis (StAR, CYP11A1), en su regulación (NOS y COX-2) y en la señalización de insulina (fosfo-Akt). Se realizaron estudios de histoquímica (Sudan III) y se analizó la expresión del marcador de macrófagos F4/80. Los resultados (media  $\pm$  SEM) fueron comparados mediante pruebas paramétricas o no paramétricas según correspondió. Resultados: Tras 7 semanas de tratamiento los animales del grupo DRS mostraron niveles séricos aumentados de glucosa (130 $\pm$ 6 vs. 74 $\pm$ 5 mg/dl; p<0,001), triglicéridos (TG, 604 $\pm$ 60 vs. 105 $\pm$ 52 mg/dl; p<0,001), insulina (2.0 $\pm$ 0.2 vs. 1.0 $\pm$ 0.1 ng/ml; p<0,005) y corticosterona (9.6 $\pm$ 0.8 vs. 6.6 $\pm$ 1.1 ng/ml; p<0,001), así como una respuesta reducida a la ACTH i.v. En estas ratas detectamos una notable infiltración de las células corticoadrenales con TG, menores niveles de fosfo-Akt, y un incremento en la expresión de StAR, CYP11A1, eNOS, iNOS, COX-2 y de F4/80. El cotratamiento con RSG evitó los cambios asociados a la DRS, tanto a nivel sérico como corticoadrenal. Conclusiones: Los cambios morfológicos y funcionales en la corteza adrenal asociados al desarrollo de IR podrían deberse al efecto de metabolitos lipídicos (depósito

intraadrenal de TG) y/o a inflamación local. Los resultados de tratamiento con RSG confirmarían el papel de la IR en la generación de estas alteraciones.

**294. (702) EL CONSUMO DE OXIGENO: II LOS CAMBIOS DURANTE LA ONTOGENESIS COMO REFERENCIA DEL POTENCIAL CELULAR DE ORGANISMOS METAZOARIOS Y BIOMARCADOR DEL PROCESO FILOGENETICO**

Herkovits J.<sup>1</sup>  
*Instituto de Ciencias Ambientales y Salud, Fundación PROSAMA<sup>1</sup>*  
 herkovit@retina.ar

Las situaciones de hipoxia pueden resultar en diferentes patologías incluyendo la exacerbación de células cancerosas a elevada malignidad. En la presente contribución se ilustra el interés de considerar el proceso ontogenético para la comprensión del potencial de las células de organismos adultos de sobrevivir en diferentes situaciones de hipoxia y la ontogénesis misma como biomarcador de los cambios ambientales durante el proceso evolutivo. Si bien la célula huevo tiene una notable dotación de mitocondrias, el consumo de O<sub>2</sub> se incrementa gradualmente a partir del estadio de blástula y hasta opérculo completo que en el caso de *Rhinella arenarum* pasa de 0.37 a 28.35 X 10<sup>-3</sup> uL O<sub>2</sub>/min/embrión (el peso seco de los embriones para los diferentes estadios es constante). En forma inversa, la blástula y gástrula pueden cumplirse en hipoxia extrema (por debajo de 1mg de O<sub>2</sub>/L) mientras que para los estadios subsiguientes de neurula, botón caudal y opérculo completo, el Tiempo Letal 50 para dicha condición de hipoxia extrema fue de 19, 3 y 1 h respectivamente (O<sub>2</sub> normal en medio acuático es de unos 8-10mg/L). Estos cambios extraordinarios en el consumo de oxígeno que no pueden asociarse a condiciones ambientales actuales, resultan asociables con las condiciones ambientales del Planeta durante el proceso evolutivo. En efecto, se encuentra muy bien documentado que el O<sub>2</sub> libre existe en cantidades significativas desde hace unos 2.4 billones de años. En este contexto, y asumiendo que el proceso ontogénico guarda relación con el filogenético, el caso de las blástula que no consume O<sub>2</sub> y mas aun desarrolla perfectamente en su ausencia, funciona de acuerdo a las condiciones de anoxia/hipoxia de sus ancestros filogenéticos. Este abordaje conceptual nos permite considerar el potencial de funcionamiento de las células, incluyendo patologías, desde una perspectiva ontogénica, información que además reflejaría condiciones ambientales ancestrales asociables al proceso filogenético.

**295. (713) EL ECOSISTEMA URBANO DEL GRAN BUENOS AIRES: SU IMPACTO SOBRE LA SALUD**

Herkovits J.<sup>1</sup>  
*Instituto de Ciencias Ambientales y Salud, Fundación PROSAMA<sup>1</sup>*  
 herkovit@retina.ar

La Organización Mundial de la Salud, ha reconocido hace lustros que mas del 60% de las enfermedades son de etiología ambiental. El ecosistema urbano del Gran Buenos Aires, donde habitan 14 millones de personas se encuentra surcado por varios ríos y arroyos que junto con el Río de la Plata constituyen sus cuencas hídricas. En sus aguas y sedimentos se concentran los contaminantes, en este caso producto de las actividades antrópicas. Mediante estudios ecotoxicológicos estandarizados en nuestros laboratorios (AMPHITOX), realizados con embriones de anfibio sobre las cuencas de los Río Matanza-Riachuelo, Reconquista y algunos de los arroyos que desembocan directamente en el Río de La Plata como el arroyo Las Conchitas, publicados en revistas y libros internacionales, resulta que el nivel de toxicidad se encuentra entre 1.3 y 20 veces por encima del máximo admisible para efluentes industriales según valores establecidos por la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) hace mas de 20 años. En el caso de los sedimentos, la toxicidad es aun mayor ya que refleja la contaminación histórica, acumulada en los mismos. Entre los efectos subletales se destaca la teratogénesis, atraso en el desarrollo, reducción de la talla y neurotoxicidad.

Los parámetros físicos y químicos presentan grandes variaciones asociadas con las actividades antrópicas predominantes en cada zona pero la toxicidad se correlaciona con el espectro de especies encontradas, desplazándose hacia las más resistentes a medida que se incrementa la toxicidad. Este hecho implica una severa reducción en la calidad del agua para diversos servicios, usos y satisfacción estética. Las metodologías que se emplean para la evaluación de Impacto sobre la Salud Humana para la autorización de actividades productivas o de servicios no podrían avalar ninguna actividad que resulte con los niveles de impacto encontrados en las cuencas hídricas del Gran Buenos Aires.

### METABOLISMO Y NUTRICION 3

#### 296. (50) EL MOLIBDATO NORMALIZA LOS PROSTANOIDEOS VASCULARES EN EL SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL POR SOBRECARGA DE FRUCTOSA EN LA RATA

Puyó A.<sup>1</sup>; Santander Y.<sup>2</sup>; Andrade V.<sup>3</sup>; Peredo H.<sup>4</sup>

Cátedra de Anatomía e Histología, FFyB, UBA, Instituto de Morfología JJ Naón, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3</sup>; Laboratorio de Estudios del Síndrome Metabólico Experimental, CONICET<sup>4</sup>  
anapuyo@gmail.com

El molibdato de sodio tiene propiedades insulino-miméticas y normaliza los niveles de glucosa en ratas diabéticas por estreptozotocina. La sobrecarga de fructosa (F) provoca en la rata hiperglucemia, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina e hipertensión arterial, un cuadro comparable al síndrome metabólico humano. Previamente encontramos modificaciones en la producción vascular de prostanoideos (PR) en este modelo. Se estudió el efecto del tratamiento con molibdato de sodio (Mo) sobre parámetros metabólicos, presión arterial (PA) y la producción de PR en el 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-Mo (n=5), Mo 100 mg/Kg/día; y F-Mo (n=5), ambos tratamientos. A las 9 semanas los animales se sacrificaron, los LM se incubaron y los PR liberados se midieron por HPLC. La F incrementó la PA (mmHg, F: 140±3, vs. C: 115±3; p<0.001), la glucemia (mg/dl, 156±10 vs. C: 127±6, p<0.02); la trigliceridemia (mg/dl, 163±15 vs. C: 47±4, p<0.001) y la insulinemia (ng/ml, 4,5±0,8 vs. C: 1,9±0,3, p<0,02). El Mo previno las dos primeras alteraciones (PA, FMo: 107±5 vs. F, p<0.001; glucemia, 100±5 vs. F, p<0.002). Se detectaron prostaglandinas (PG) F2 alfa y E2, así como PG 6-cetoF1 alfa y tromboxano (TX) B2, metabolitos de prostaciclina (PGI2) y TXA2. F disminuyó los PR vasodilatadores PGI2 y PGE2 en LM (ng/mg tejido, F: 51±9 vs. C: 105±7, p<0.001, y F: 40±6 vs. C: 97±7, p<0.01). El Mo previno estas alteraciones: PGI2 (FMo: 92±10 vs. F, p<0.02); PGE2 (FMo: 89±7 vs. F, p<0.001). No se modificó la liberación de los PR vasoconstrictores PGF2 alfa y TXA2. Se concluye que el tratamiento con Mo, además de su conocido efecto beneficioso sobre el nivel de glucosa plasmático, previene el aumento de la presión arterial y el desbalance en la producción vascular de PR causado por el síndrome metabólico experimental por sobrecarga de fructosa en la rata.

#### 297. (69) BALANCE OXIDATIVO EN EL HUMOR VÍTREO DE PERROS CON GLAUCOMA.

Ferreira S.<sup>1</sup>; Weichsler N.<sup>2</sup>; Reides C.<sup>3</sup>; Llesuy S.<sup>4</sup>  
FFyB, UBA<sup>1 3 4</sup>; Facultad de Veterinaria, UBA<sup>2</sup>  
smferrer@ffy.uba.ar

Los objetivos de este trabajo fueron: evaluar el balance oxidativo del humor vítreo en perros con glaucoma (GG), perros glaucomatosos suplementados con melatonina (GM) y comparar estos grupos frente a perros controles (GC). Para llevar a cabo dicho objetivo se determinaron: la concentración de ácido ascórbico, glutatión, los niveles de nitritos y proteínas oxidadas. Todas las determinaciones se realizaron por técnicas espectrofotométricas, en el humor vítreo de perros controles (n=10), con glaucoma

(n=10), con glaucoma suplementados con melatonina (n=8). La concentración de glutatión en GG fue 1,25 ± 0,04 mM y en GC 1,17 ± 0,05 mM (ns); para GM 3,90 ± 0,30 mM (GM versus GC p< 0,001, GM versus GG p< 0,001). La concentración de ácido ascórbico en GG fue 50 ± 5 µM y en GC 175 ± 24 µM; (p< 0,001); para GM 158 ± 44 µM (GM versus GC ns, GM versus GG p< 0,05). Las proteínas oxidadas en GG fue 0,15 ± 0,01 nmol/ mg proteína y en GC 0,06 ± 0,02 nmol/ mg proteína (p< 0,01); para GM 0,04 ± 0,01 nmol/ mg proteína (GM versus GC ns, GM versus GG p< 0,001). La concentración de nitritos en GG fue 6,42 ± 0,39 mM (GC 1,82 ± 0,19 mM, p< 0,001); para GM 0,67 ± 0,11 mM (GC p< 0,05, GG p< 0,001). Las proteínas en GG fue 13,2 ± 0,9 mg/ mL y en GC 1,8 ± 0,2 mg/ mL (p< 0,001); para GM 2,1 ± 0,3 mg/ mL (GM versus GC ns, GM versus GG p< 0,001). Se observa una disminución significativa en las defensas antioxidantes no enzimáticas con un incremento de los prooxidantes evidenciado por el aumento en la oxidación de proteínas y los niveles de nitritos. La suplementación con melatonina mejora los niveles de ácido ascórbico y de glutatión, disminuye la oxidación de proteínas y disminuye los niveles de nitritos. Estos resultados sugieren que la suplementación con antioxidantes podría utilizarse en la terapéutica del glaucoma y 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.

#### 298. (72) DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL INDUCIDA POR TOXICIDAD CRÓNICA DEL HIERRO EN HÍGADO Y CEREBRO

Musacco Sebio R.<sup>1</sup>; Saporito Magriñá C.<sup>2</sup>; Repetto M.<sup>3</sup>  
Cátedra de Química General e Inorgánica, FFyB, UBA<sup>1 2 3</sup>  
rosario02@hotmail.com

Los efectos tóxicos del hierro (Fe) involucran alteración de la homeostasis redox intracelular y oxidación de biomoléculas. No se conocen actualmente los mecanismos bioquímicos intracelulares que relacionan el daño oxidativo (DO), alteración de la homeostasis y toxicidad del Fe con la etiología de enfermedades neurodegenerativas. Estos mecanismos podrían afectar la actividad y función mitocondrial. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos tóxicos del Fe sobre la actividad de las mitocondrias en hígado (H) y cerebro (Ce). Se administró FeCl<sub>2</sub> (1 g/L en agua de bebida) a ratas Sprague Dowley (250 g) durante 42 días. Se evaluó mediante: oxidación de lípidos (TBARS); oxidación de proteínas (carbonilos, CO); producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en estado 3 (en presencia de ADP) y estado 4 (reposo) y actividad de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones en mitocondrias aisladas de H y Ce. Se observó: en mitocondrias de H, incremento en un factor de 3,7 en la oxidación de proteínas (CO) a los 14 días de tratamiento (C:1,2±0,1nmol/mg proteína), A los 28 días, TBARS aumentó 90% (C:1,8±0,2nmol/mg prot). La actividad del complejo I incrementó 78% a los 7 días (C:214±19nmol NADH/min,mg prot) y del complejo II disminuyó 39% a los 4 días (C:132±17nmol succinato/min x mg prot). La velocidad de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estado 3 incrementó inicialmente a los 7 días un 100% y a los 14 disminuyó hasta un 38% del valor basal (C:0,08±0,01nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg prot); y en estado 4, disminuyó un 84% a los 14 días (C:0,11±0,02nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min,mg prot). En Ce, a los 4 días incrementó 3,6 veces CO (C:0,045±0,006nmol/mg prot.) y 80% TBARS (C:1,2±0,2nmol/mg proteína). La inhibición del complejo II en H y la oxidación de biomoléculas en ambos órganos indicarían que la toxicidad del Fe estaría asociada a la disfunción mitocondrial a nivel del metabolismo energético y depleción de ATP. El DO mitocondrial por exposición crónica a Fe ocurre primero en Ce que en H.

#### 299. (73) INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPLEJOS I Y II DE LA CADENA RESPIRATORIA EN MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y CEREBRO INDUCIDA POR TOXICIDAD CRÓNICA DEL COBRE.

Saporito Magriñá C.<sup>1</sup>; Musacco Sebio R.<sup>2</sup>; Semprine J.<sup>3</sup>; Repetto M.<sup>4</sup>  
Cátedra de Química General e Inorgánica, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
aspo\_48@hotmail.com

La alteración de la homeostasis redox intracelular conduce a la iniciación de daño oxidativo y el efecto tóxico del cobre (Cu) estaría asociado a la progresión de enfermedades neurodegenerativas mediante la alteración de la actividad mitocondrial. El objetivo de este trabajo fue evaluar si el daño oxidativo generado por la toxicidad crónica del Cu en hígado (H) y cerebro (Ce) está asociado a la alteración del transporte de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial. Se administró CuSO<sub>4</sub> (1 g/L en agua de bebida) a ratas Sprague Dowley (250 g) durante 42 días. Se evaluó el efecto del Cu sobre la actividad mitocondrial mediante: oxidación de lípidos (TBARS); oxidación de proteínas (carbonilos, CO), producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en estado 3 (ADP) y estado 4 (reposo) y actividad de los complejos I y II de la cadena respiratoria en mitocondrias aisladas de H y Ce. Se observó: a los 2 días, en mitocondrias de H, incremento del 72% de TBARS (C:1,8±0,2nmol/mg prot.) y en Ce 95% (C:1,0±0,1nmol/mg prot); CO aumentó un 50% (C:1,0±0,1nmol/mg prot) a los 4 días, y en Ce 150% (C:0,05±0,01nmol/mg prot), a los 2 días de tratamiento. En H, la velocidad de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estado 3 disminuyó a los 4 días un 60% (C:0,08±0,01nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg prot) y a los 2 días, un 71% del valor basal en estado 4 (C:0,11±0,02nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg prot). La actividad del complejo I disminuyó 17% a los 2 días y del 45% al día 42 (C:214±19nmol NADH/min x mg prot) y del 69% del complejo II a los 7 días (C:132±17nmol succinato/min x mg prot). En Ce, a los 2 días incrementó 44% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estado 4 (C:0,09±0,01nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg prot), disminución del 86% en estado 3 (C:0,4±0,1nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min x mg prot). La toxicidad crónica del Cu produce inhibición de la actividad de los complejos I y II de la cadena respiratoria, cambios en la velocidad de producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, déficit en el metabolismo energético y síntesis de ATP junto con la oxidación de biomoléculas en mitocondrias de H y Ce.

**300. (75) OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS, ALTERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DAÑO OXIDATIVO IN VIVO INDUCIDO POR TOXICIDAD CRÓNICA DEL COBRE EN HÍGADO Y CEREBRO.**

Semprine J.<sup>1</sup>; Musacco Sebío R.<sup>2</sup>; Saporito Magriñá C.<sup>3</sup>; Ferrarotti N.<sup>4</sup>; Massot F.<sup>5</sup>; Torti H.<sup>6</sup>; Ossani G.<sup>7</sup>; Repetto M.<sup>8</sup>  
*Cátedra de Química General e Inorgánica, FFyB, UBA<sup>1,2,3</sup>*  
*6; Cátedra de Química General e Inorgánica, Cátedra de Análisis Clínicos I, FFyB, UBA<sup>4</sup>; Cátedra de Física, FFyB, UBA<sup>5,6</sup>; Centro de Patología Experimental, Facultad de Medicina, UBA<sup>7</sup>*  
*jimenasemprine@hotmail.com*

Recientemente ha incrementado el interés por el estudio de los efectos tóxicos del cobre (Cu) en la salud humana ya que estarían relacionados con la etiología de enfermedades neurodegenerativas. La exposición crónica a este biometal podría generar alteración de la homeostasis redox tisular y daño oxidativo (DO) de biomoléculas. El objetivo de este trabajo fue comparar la toxicidad inducida por exposición crónica a Cu en hígado (H) y cerebro (Ce). Se administró CuSO<sub>4</sub> (1 g/L en agua de bebida) a ratas Sprague Dowley (250 g) durante 42 días. Se evaluó el DO en H y Ce y el tiempo de DO máximo respecto al control (C) (p<0.01) mediante: Quimioluminiscencia de órgano in vivo (QI), oxidación de lípidos (TBARS); oxidación de proteínas (carbonilos, CO), homeostasis redox (glutación: (GSH)/GSSG); actividad de NADPHoxidasa y catalasa (Cat). La concentración tisular de Cu (cCu) en H y Ce se determinó por absorción atómica. Se observó: incremento del 60% de QI en H (C:12±1cps/cm<sup>2</sup>) y 9 veces en Ce (C:11±2cps/cm<sup>2</sup>), ambos a los 7 días; TBARS aumentó 2,5 veces en H a los 2 días (C:7±1nmol/g), y de 3 en Ce a los 28 días (C:6,4±0,4nmol/g). A los 4 días, CO aumentó en 2,1 en H (C:115±19nmol/g) y 49% en Ce (C:111±3nmol/g). En H, a los 7 días aumentó 2,7 la actividad de Cat (C:548±108pmol/g), y disminuyeron 5% SOD (C:270±12 U/g) y 27% NADPHox (C:0,22±0,02 nmol/min.g). En Ce NADPHox incrementó 87% a los 2 días (C:30±4nmol/min.g). Al cuarto día GSH/GSSG disminuyó un 63% en H y 36% en Ce (C:0,49±0,01 y 0,28±0,01 respectivamente). El Cu genera DO por exposición crónica en H y Ce, proporcional al tiempo de exposición y dependiente de la oxidación de proteínas. En H la oxidación de

lípidos y el consumo de GSH son previos al DO tisular y alteración de la actividad enzimática. En Ce, el evento promotor del DO y oxidación de lípidos sería la alteración de la homeostasis redox: por incremento de NADPHox y consumo de GSH.

**301. (345) EL ESTRÉS OXIDATIVO Y PROTEÍNAS PRO-INFLAMATORIAS ESTÁN INVOLUCRADOS EN LA MICROALBUMINURIA POS EJERCICIO PROLONGADO EN DIABÉTICOS TIPO 1**

Cejas J.<sup>1</sup>; Rodríguez G.<sup>2</sup>; Estevez G.<sup>3</sup>; Minuchin G.<sup>4</sup>; Rodríguez-vitoria J.<sup>5</sup>; Cruzado M.<sup>6</sup>; Castro C.<sup>7</sup>  
*Facultad de Ciencias Médicas, UNCUYO<sup>1,2,4,5,6,7</sup>; Ministerio de Salud de Mendoza<sup>3</sup>*  
*jimecejas@hotmail.com*

El estrés oxidativo y los mediadores inflamatorios son probables mecanismos de mayor excreción urinaria de albúmina (EUA) en diabéticos tipo1 (DM1). El ejercicio intenso es capaz de aumentar la EUA en DM1 y no diabéticos en forma transitoria. Se desconoce los mecanismos precisos del aumento de la EUA en el ejercicio intenso y no está claro si la administración de antioxidantes podría tener algún efecto. Nos propusimos evaluar en 12 runners 6 DM1 y 6 controles (C) la EUA, antioxidantes totales (TAS), quimioquina de monocitos (MCP-1) y proteína C-reactiva ultra sensible (HS-PCR) al inicio, al final y a las 24h de correr una 1ª media maratón de 21 km (1ªM) y lo mismo en una 2ªM tras recibir Vitaminas E y C 1 g/d/7 días. Los datos (media±SEM) se analizaron con ANOVA y pos test de Bonferroni. La EUA (mg/g) basal fue normal en DM1 y C (5,66±1,2 vs 5,16±2,0 mg/g p=ns). Pos 1ªM se produjo una elevación significativa de la EUA en ambos grupos, mayor en DM1 (65,1±20,7 vs 20,0±2,4 mg/g P<0,01). 24h pos 1ª M los valores volvieron a los basales. El suplemento de vitaminas no modificó la EUA en la 2ªM. Los TAS (mM/L) disminuyeron 24h pos 1ªM en ambos grupos con mayor reducción en DM1 (0,6±0,1 vs 1,1±0,1P<0,02). La ingesta de vitaminas mantuvo los TAS en los valores basales sin disminuir post carrera ni 24 h después. En la 1ªM la HS-PCR, sin diferencias al inicio, aumentó 24h pos carrera en ambos grupos pero más en DM1 (5,5 mg/dL±0,9 vs 1,7±0,3, P<0,05). MCP-1 lo hizo pos inmediato en ambos grupos (985,1pg/mL±107,5 vs 710,9 ±77,5) sin volver al basal a las 24h en DM1. No se observaron cambios en la 2ªM. El estado hiperglucémico crónico junto a la menor capacidad antioxidante y al aumento de MCP-1 y HS-PCR, podrían estar implicados en la mayor EUA transitoria inducida por el ejercicio intenso y sostenido en DM1. La ingesta de vitaminas E y C mejora la reserva antioxidante total pero no modifica la EUA ni los marcadores inflamatorios estudiados.

**302. (610) EXPOSICION DE CADMIO SOBRE EL BALANCE REDOX E INFLAMATORIO EN AORTA. EFECTO DE LA SOJA COMO FUENTE DE PROTEINA DIETARIA**

Pérez Díaz M.<sup>1</sup>; Oliveros L.<sup>2</sup>; Gimenez M.<sup>3</sup>  
*Área de Química Biológica, Universidad Nacional de San Luis, IMBIO –SL, CONICET<sup>1,2,3</sup>*  
*matiaspdiaz@hotmail.com*

La elevada toxicidad del cadmio (Cd) está asociada a alteraciones cardiovasculares. Hemos comunicado que los efectos de 100 ppm de Cd en aorta, empleando caseína como fuente de proteína en la dieta, producen aumento en la actividad de las enzimas catalasa (CAT), Superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX). En este trabajo analizamos en aorta torácica los efectos de 15 y 100 ppm de Cd en el agua de bebida, y de la soja como fuente proteica dietaria, sobre la expresión del ARNm de CAT, SOD y GPX y de las proteínas NAD(H)Poxidasas (NOX-2). Asimismo, se determinaron las proteínas pro-inflamatorias: ciclooxigenasa-2 (COX-2) y sintasas de óxido nítrico iNOS y eNOS, y los niveles de (TBARS). Se trabajó con 2 grupos de ratas adultas macho de la cepa Wistar (18 ratas cada uno). Un grupo recibió caseína y otro soja como fuente de proteína en la dieta. A su vez, dentro de cada grupo proteico se conformaron 3 lotes. Un lote recibió como bebida agua corriente, mientras que los otros dos agua adicionada con 15 y 100 ppm de Cd (como



Ci2Cd), respectivamente, por 60 días. Los niveles de ARNm se determinaron por RT-PCR y los proteicos por Western Blot. Con caseína, en la aorta de ratas expuestas a 15 ppm de Cd se observó una disminución de los niveles de RNAm de CAT ( $p < 0,0001$ ), SOD ( $p < 0,05$ ) y GPX ( $p < 0,001$ ), y un aumento de las proteínas iNOS ( $p < 0,01$ ) y eNOS ( $p < 0,05$ ). Con 100 ppm de Cd, se observó una disminución de RNAm de CAT ( $p < 0,01$ ) y GPX ( $p < 0,05$ ) y de la proteína eNOS ( $p < 0,05$ ), y un aumento de RNAm de SOD ( $p < 0,05$ ) y de los niveles proteicos de NOX-2 ( $p < 0,05$ ), iNOS ( $p < 0,05$ ) y COX-2 ( $p < 0,001$ ). Los cambios en los parámetros redox producidos con 15 ppm de Cd se relacionaron con un aumento en los niveles de TBARS en aorta. Con soja, no se observó modificación de los parámetros estudiados tanto con 15 como con 100 ppm de Cd, sugiriendo que la sustitución de caseína por soja en la dieta podría prevenir los efectos pro-inflamatorios y pro-oxidativos producidos por Cd.

### 303. (649) ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE DECORINA EN LAS CELULAS ENDOTELIALES VASCULARES FRENTE A LA INJURIA CON LIPOPROTEÍNAS RICAS EN TRIGLICÉRIDOS.

Oberkersch R.<sup>1</sup>; Valotta R.<sup>2</sup>; Yuschak S.<sup>3</sup>; Calabrese G.<sup>4</sup>  
*Cátedra de Biología Molecular y Celular, FFyB, UBA<sup>1-4</sup>; Servicio de Obstetricia del Complejo Médico Churrucá-Visca<sup>2,3</sup>*  
*roberkersch@fyb.uba.ar*

Las células endoteliales están permanentemente expuestas a factores injuriantes que desencadenan modificaciones dinámicas en la organización de su matriz extracelular (MEX). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la producción del proteoglicano decorina en las células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) frente a las lipoproteínas ricas en triglicéridos (VLDL), con el fin de evaluar el remodelado de la MEX vascular en un modelo in vitro. Las HUVEC fueron aisladas y cultivadas según la metodología descripta (Ching-Yi Chen; Life Sciences, 2007). Las VLDL fueron obtenidas a partir de suero de voluntarios sanos por ultracentrifugación y caracterizadas por 1) su contenido en triglicéridos, colesterol y fosfolípidos (Wiener, Rosario, Argentina) y 2) su perfil proteico por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Este protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de las dos instituciones participantes. La producción de decorina fue determinada por: 1) Western-blot sobre la fracción citoplasmática obtenida por centrifugación diferencial; y 2) inmunofluorescencia; a partir de los cultivos celulares monoconfluentes con y sin tratamiento. Las células fueron incubadas durante 24hs frente a 70  $\mu\text{g/ml}$  de VLDL, luego de ser arrestadas durante 24 hs en ausencia de suero. El SDS-PAGE de las VLDL reveló la presencia de bandas de 550kDa, 32kDa y 8.8kDa; siendo la relación colesterol/ triglicéridos de  $0,24 \pm 0,05$  ( $n = 24$ ). El Western-blot mostró dos bandas correspondientes al esqueleto proteico de decorina (50kDa) y al proteoglicano (100 kDa), siendo esta última significativamente superior en las células tratadas con VLDL respecto a las control ( $0,51$  vs  $0,11$  DO/ $\mu\text{g}$  proteína; tratadas vs control;  $P < 0,001$ ). Estos resultados fueron confirmados por inmunofluorescencia. Las células endoteliales activarían un programa de remodelado de la MEX frente a las VLDL, a través del cual se modificaría la glicosilación de decorina.

### 304. (665) EFECTO DE LA CASTRACIÓN EN EL SISTEMA ANTIOXIDANTE DEL PULMÓN

Piguillém S.<sup>1</sup>; Perez Chaca M.<sup>2</sup>; Biaggio V.<sup>3</sup>; Gomez N.<sup>4</sup>; Gimenez M.<sup>5</sup>  
*Universidad Nacional de San Luis<sup>1-2,3,4,5</sup>*  
*gomez.nidia@gmail.com*

Numerosas investigaciones dan cuenta de que el estrés oxidativo juega un rol clave en las patologías pulmonares. Por otro lado, la presencia de receptores para andrógenos en el pulmón sugiere que las hormonas sexuales tienen un rol en la función pulmonar. El presente estudio fue realizado para comparar la capacidad antioxidante después de 2 y 6 meses de castración, en rata macho adulta. Para ello se utilizaron ratas Wistar macho

( $200 \pm 20\text{g}$ ), separados en dos lotes: Control (Co) y castrados (Ca), ambos lotes (Co y Ca) se dividieron en dos grupos, los cuales se sacrificaron a los 60 y 180 días. Los pulmones se conservaron a  $-80^\circ\text{C}$  y se determinó posteriormente la lipoperoxidación cuantificando las sustancias reactivas al Acido tiobarbitúrico (TBAR'S). Además, por RT-PCR se determinó la expresión de las enzimas del sistema de defensa antioxidante. También se utilizó muestra de pulmón para histología usando como fijador Bouin y se realizaron para ello cortes de 12 micras. Tanto a los 2 meses como a los 6 meses se observó un aumento significativo de los TBAR'S ( $p < 0,01$ ) de las ratas castrada con respecto a los controles. A los 2 meses las enzimas SOD2 y GPX-1 aumentaron significativamente ( $p < 0,01$ ), no se modificaron; NOX2, CAT y Nrf2; mientras que a los 6 meses no observamos diferencias significativas en: NOX2, CAT, Nrf2 e iNOS. Los pulmones con 2 meses de castración presentaron una marcada infiltración y en algunas regiones se observó proliferación del tej. conectivo. Estos resultados, con dos meses de tratamiento, nos sugieren que la castración estaría produciendo un estado pro-inflamatorio que produce una activación del sistema de defensa antioxidante. Mientras que a los seis meses de castración la respuesta es diferente, no se advierte el grado de proliferación presente a los dos meses, no hay infiltración y se observa más espacios no funcionales. Por lo que estos resultados nos permiten plantear que a los seis meses de castración hay una claro desbalance entre el sistema pro y antioxidante.

### 305. (682) GLICACIÓN NO ENZIMÁTICA: EVIDENCIAS EXPERIMENTALES DE LA INCORPORACIÓN DE LA GLUCOSA A LA PORFOBILINÓGENO SINTETASA HUMANA (PBGDH)

Varela L.<sup>1</sup>; Oliveri L.<sup>2</sup>; Rossi J.<sup>3</sup>; Battle A.<sup>4</sup>; Gerez E.<sup>5</sup>  
*CIPYP<sup>1</sup>; CIPYP-CONICET, Hospital de Clínicas, UBA<sup>2,4,5</sup>;*  
*IQUIFIB, FFyB, UBA<sup>3</sup>*  
*lauravarela0@gmail.com*

La diabetes mellitus se caracteriza por una elevada concentración de glucosa en sangre, la cual esta asociada a las complicaciones de la enfermedad. Estudios realizados en una población diabética demostraron que la actividad de la PBGD en sangre está disminuida respecto a individuos controles. El primer paso común de la biosíntesis del hemo, es la condensación asimétrica de dos moléculas de ácido  $\delta$  aminolevulínico (ALA), catalizada por la enzima PBGD (E.C.4.2.1.24). Esta enzima de 280 kDa, está compuesta por ocho subunidades idénticas. La inactivación de la PBGD podría involucrar alteraciones postraduccionales como la glicación no enzimática de la/s lisina/s cercanas al sitio activo de la enzima, o la oxidación de los residuos cisteína esenciales para la actividad. Una hipótesis complementaria es la combinación de ambos fenómenos (glicooxidación). El objetivo de este trabajo fue estudiar la glicación no enzimática de la PBGDh. Para ello, se realizaron ensayos in vitro con la enzima pura recombinante PBGDh-GST la cual se incubó a diferentes tiempos con glucosa (20 mM) / NaBH<sub>4</sub> y manitol (20 mM) / NaBH<sub>4</sub>. La reducción con NaBH<sub>4</sub> estabiliza la formación de los aductos primarios de glicación de la enzima. A partir de la hora de incubación en presencia de glucosa se observó una disminución del 57% en la actividad de la PBGDh (VC:  $620,67 \pm 30,89$  U/mg; VG:  $269 \pm 26,87$  U/mg,  $p < 0,05$ ). Cuando se pre incubó la enzima en presencia del sustrato (0,27 mM), no se observó pérdida de actividad de la PBGDh, sugiriendo un efecto protector del ALA en el sitio activo de la misma. La incorporación de la glucosa a la enzima, se comprobó mediante ensayos de glicación con glucosa tritiada. Dichos ensayos demostraron una incorporación de un mol glucosa/mol PBGDh. Estos resultados muestran la primera evidencia experimental de que altas concentraciones de glucosa llevan a la glicosilación no enzimática y a la consecuente pérdida de la actividad de la PBGDh.

### 306. (710) PARTICIPACION DE LA HSP27 Y HSP70I EN PROCESOS DE CITOPROTECCION CON UNA DEFICIENCIA DE ZINC

Biaggio V.<sup>1</sup>; Perez Chaca V.<sup>2</sup>; Alvarez Olmedo D.<sup>3</sup>; Fanelli M.<sup>4</sup>; Ciocca D.<sup>5</sup>; Gimenez M.<sup>6</sup>; Gomez N.<sup>7</sup>

Universidad Nacional de Cuyo - IHEM - CONICET<sup>1</sup>; Universidad Nacional de San Luis - Laboratorio de Química Biológica, CONICET, IMIBIO<sup>2,6,7</sup>; Laboratorio de Oncología, IMBECU, CCT-MENDOZA-CONICET<sup>3,4,5</sup>  
vbiaggio@gmail.com

**Introducción:** Existe una amplia variedad de evidencias que revelan la acción anti-inflamatoria y anti-apoptótica de las proteínas de golpe de calor (HSP), principalmente HSP70 inducida y HSP27. Por otro lado, se ha señalado que el Zinc actúa inhibiendo la activación de la caspasa-3 y por lo tanto la apoptosis. Resultados previos demostraron en animales con una deficiencia moderada de Zinc (DZ) un elevado estrés oxidativo y nitrosativo en pulmón (Gomez y col. 2006). **Objetivo:** determinar la expresión de marcadores de permeabilidad vascular VEGF y HSP en DZ y además analizar si la situación se revierte con la realimentación. Para ello se usaron ratas Wistar de (200 ± 20g) separadas en tres lotes: Grupo Control (Co) con un contenido de Zn de 30mg/Kg de dieta, un lote deficiente en zinc (DZ) 5 mg/Kg dieta y un tercer lote (Ral) que recibió dieta DZ y se realimentaron luego por 10 días con dieta Control. Usando técnicas de inmunohistoquímica se estudió la expresión de VEGF, HSP27 y HSP70 inducida en pulmón. Se determinó marcación positiva tanto en células, citoplasma, núcleo o ambos, según el patrón de expresión de cada anticuerpo. Los resultados muestran inmunomarcación positiva para HSP27 y HSP70i (p<0.001; p<0.01 respectivamente), en el grupo Ral comparado con el grupo Co. La expresión de VEGF incrementó en el grupo Ral (p<0.001). **Conclusión:** Observamos presencia de HSP27 en el grupo ZD y Ral lo cual podría estar asociado a la citoprotección. El incremento de VEGF en el grupo Ral indicaría un aumento de la angiogénesis para favorecer la funcionalidad del pulmón.

**307. (715) ALTERACIONES BIOQUÍMICAS Y CLÍNICAS EN UN MODELO GENÉTICO DE PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE PRODUCIDAS POR DROGAS PORFIRINOGÉNICAS**  
Ruspini S.<sup>1</sup>; Zuccoli J.<sup>2</sup>; Martínez M.<sup>3</sup>; Lavandera J.<sup>4</sup>; Batlle A.<sup>5</sup>; Buzaleh A.<sup>6</sup>  
*CIPYP<sup>1,2,4,5</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>3</sup>; CIPYP, CONICET, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>6</sup>*  
marvinsil@hotmail.com

Las Porfirias hepáticas agudas tienen sintomatología neuroabdominal con disfunción del sistema nervioso central y polineuropatía motora. Los fármacos son factores exógenos que precipitan ataques en las Porfirias agudas. Previamente describimos alteraciones en la biosíntesis del hemo y otros metabolismos relacionados en modelos farmacológicos de porfiria por administración de drogas porfirinogénicas a ratones. El objetivo fue continuar la investigación con un modelo genético de Porfiria Aguda Intermitente (PAI). Se usaron ratones knockout deficientes en la enzima Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D) (Pbgd<sup>-/-</sup>) y se compararon los efectos en ratones heterocigotas para dicha mutación (Pbgd<sup>+/-</sup>). Los animales recibieron alilisopropilacetamida (AIA, 350 mg/kg). Se midieron las actividades de Acido 5-aminolevulónico sintetasa (ALA-S), PBG-D y Hemo oxigenasa (HO) en hígado, riñón y cerebro. El grupo de ratones Pbgd<sup>-/-</sup> macho mostró signos neurológicos similares a los observados en ataques agudos de porfirias humanas. En cuanto a los estudios bioquímicos, se observó una importante inducción en la actividad de ALA-S en hígado (7 veces, p<0,01) y riñón (100%, p<0,05), efecto no detectado en cerebro. En el grupo de hembras Pbgd<sup>-/-</sup>, el incremento de la actividad hepática fue aún mayor (14 veces; p<0,01), aunque la condición clínica no fue tan severa como en los ratones macho. La actividad de PBG-D no se alteró en ninguno de los grupos. La actividad de HO en hígado aumentó 4 veces (p<0,05) sólo en el grupo Pbgd<sup>-/-</sup> macho. En los animales Pbgd<sup>+/-</sup> la actividad de ALA-S hepática se indujo 132 y 283% (p<0,05) en machos y hembras respectivamente. Este aumento no se reflejó en su estado clínico. En conclusión, es de destacar que los signos clínicos sólo se observaron en ratones machos Pbgd<sup>-/-</sup>, hecho que no concide con lo observado en humanos

donde la PAI se desencadena con más frecuencia en mujeres. Además el aumento de HO indicaría que el estrés oxidativo es mayor en los ratones macho.

**308. (726) EFECTO DE ISOFLURANO, ETANOL Y ÁCIDO 5-AMINOLEVULÓNICO EN UN MODELO MURINO DE HEMOCROMATOSIS SOBRE DIFERENTES METABOLISMOS INTERRELACIONADOS CON LA BIOSÍNTESIS DEL HEMO**  
Buzaleh A.<sup>1</sup>; Moreno Carralero M.<sup>2</sup>; Cuadrado Grande N.<sup>3</sup>; Mendez M.<sup>4</sup>; Batlle A.<sup>5</sup>; Enriquez De Salamanca R.<sup>6</sup>; Morán Jimenez M.<sup>7</sup>  
*Instituto de Investigación, Hospital Doce de Octubre, España, CIPYP, CONICET, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1</sup>; Instituto de Investigación-Hospital Doce de Octubre-España<sup>2,3,4,6,7</sup>; CIPYP-CONICET<sup>5</sup>*  
anabuza@hotmail.com

En la hemocromatosis (HH) hay alteración en la homeostasis del Fe. La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se desencadena por sobrecarga de Fe y alcohol. Hay asociación entre HH y PCT. El objetivo fue evaluar en un modelo murino de HH (Hfe<sup>-/-</sup>) los niveles de estrés oxidativo y nitrosativo en hígado y su relación con alteraciones en el metabolismo del hemo por Isoflurano (1 dosis, 2 ml/kg), etanol (30%, 7 días), y ácido 5-aminolevulónico (ALA; 1 dosis, 40 mg/kg), precursor del hemo. Se comparó entre sexos. El sistema de defensa antioxidante en Hfe<sup>-/-</sup> machos estaba alterado: nivel basal menor de GSH (28% p<0,05) y actividad de Catalasa (25% p<0,05) respecto control C57BL/6J. Los ratones Hfe<sup>-/-</sup> hembras tenían mayor nivel de GSH (65%, p<0,05) y de capacidad antioxidante total (25% p<0,05) que los Hfe<sup>-/-</sup> machos, pero con actividad de Catalasa menor (32% p<0,05) que el control. Al evaluar el metabolismo del hemo, en Hfe<sup>-/-</sup> machos y hembras la actividad de ALA sintetasa era 100% mayor (p<0,05), también la PBG-deaminasa (PBG-D) (27% p<0,05) pero sólo en Hfe<sup>-/-</sup> machos. La actividad de Hemo oxigenasa (HO) era menor que el control en Hfe<sup>-/-</sup> machos (37% p<0,05), esto protegería contra un aumento del Fe circulante, producto de la degradación del hemo y habría más hemo para síntesis de hemoproteínas como Catalasa. Al estudiar el efecto de las drogas porfirinogénicas Isoflurano y etanol los resultados variaron según agente y sexo. Ambas alteraron el metabolismo del hemo: reducción de actividad de PBG-D (20% p<0,05) y aumento de HO (45% p<0,05), lo que indicaría potenciación del estrés oxidativo que fue más importante debido al etanol que indujo la actividad de Superóxido dismutasa (65% p<0,05). El ALA también alteró el sistema antioxidante. El Isoflurano redujo la expresión de Óxido Nítrico Sintasa (35% p<0,05). En conclusión, en el modelo de HH estudiado estaban alterados diferentes metabolismos que se afectaron más por la administración de drogas porfirinogénicas.

**309. (492) CURVAS DE COMPOSICIÓN CORPORAL DE PREESCOLARES POR ABSORCIOMETRÍA DE DOBLE ENERGÍA DE RAYOS X (DXA), UTILIZANDO EL METODO LMS**  
Rodríguez P.<sup>1</sup>; Hecht J.<sup>2</sup>; Enrique F B.<sup>3</sup>; Angela B A.<sup>4</sup>; Patricia L C.<sup>5</sup>; Eduardo J L.<sup>6</sup>; Vanesa E M.<sup>7</sup>; Silvia M F.<sup>8</sup>  
*Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Facultad de Odontología, UBA<sup>1,3,5,7,8</sup>; Cátedra de Biofísica, Facultad de Odontología, UBA<sup>2</sup>; Cátedra de Odontología Preventiva y Comunitaria, Facultad de Odontología, UBA<sup>4</sup>; Cátedra de Técnica Operatoria Dental, Facultad de Odontología, UBA<sup>6</sup>*  
patriciaguez@hotmail.com

El objetivo de nuestro trabajo fue establecer valores preliminares de referencia de composición corporal por DXA, utilizando el método LMS. Se estudió transversalmente una población de 121 niños clínicamente sanos, entre 2 y 5 años de edad (62 varones y 59 niñas) de igual etnia, que concurrían a Jardines Integrales de La Matanza, Buenos Aires, Argentina, con puntaje Z de talla para edad y de peso para talla dentro de los puntos de corte de normalidad (OMS, 2007) y con criterios de inclusión. Se determinó % de grasa corporal (%Gra), contenido (CMO, g) y densidad mineral ósea (DMO, g/cm<sup>2</sup>) por DXA, con un equipo Lunar DPX-L, soft-

ware pediátrico. En el análisis de los datos se excluyó la cabeza; cada una de las mediciones fue realizada por un mismo individuo, para evitar la variación inter-observador. El estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética de Investigación en Salud de la Municipalidad de La Matanza y el de la Facultad de Odontología de la UBA. Para ser incluidos en el estudio, los padres o tutor dieron su autorización consentida. %Gra no mostró diferencias significativas entre grupos etarios, pero sí entre género, siendo mayor para las niñas ( $P < 0.0001$ ). Por el contrario, CMO y DMO aumentaron significativamente con la edad ( $P < 0.05$ ), si bien no se hallaron diferencias entre género. Se calcularon los percentilos y valores tipificados Z utilizando el método LMS (LMSchartmaker Pro versión 2.4.3, 2010), que responde a un modelo matemático no estructural que posibilita ajustar datos y obtener estándares de percentilos normalizados. El método asume que, en cada grupo de edad, los datos pueden ajustarse a una distribución normal luego de transformarlos adecuadamente, teniendo en cuenta el grado de asimetría (L), la mediana (M) y la dispersión (S). El método LMS proporciona una serie de parámetros estadísticos que posibilitará profundizar la interpretación clínica de la composición corporal y su comparación con otras poblaciones. Subsidiado por UBACyT O015.

### 310. (591) DIABETES GESTACIONAL: ¿ES LA COENZIMA Q10 UN POSIBLE BIOMARCADOR DE RIESGO?

Martinefski M.<sup>1</sup>; Puzio C.<sup>2</sup>; Contín M.<sup>3</sup>; Di Carlo M.<sup>4</sup>; Lungiangoli S.<sup>5</sup>; Tripodi V.<sup>6</sup>

*Cátedra de Química Analítica, FFyB, UBA, CONICET<sup>1</sup> 2 3 6; Departamento de Bioquímica Clínica, FFyB, UBA<sup>4</sup>; Cátedra de Control de Calidad de Medicamentos, FFyB, UBA, CONICET<sup>5</sup>*  
mrmartinefski@gmail.com

La diabetes gestacional es un estado de intolerancia a la glucosa asociada al embarazo que origina mayor riesgo de enfermedad o muerte, tanto para la madre como para el niño, durante el embarazo, por lo que se la define como "embarazo de riesgo". Es por ello que resulta imprescindible la evaluación de marcadores bioquímicos en la madre que actúen como predictores con el objeto de tomar los recaudos necesarios para disminuir la probabilidad de que dicha condición se manifieste. En este estudio proponemos a la coenzima Q10 (CoQ10) como posible evaluador de riesgo para esta patología. La CoQ10 es un potente antioxidante endógeno y componente esencial de la cadena respiratoria en la producción celular de energía. Dado que se reportó una deficiencia secundaria de CoQ10 en diabetes tipo II presuimos que en la diabetes gestacional también se observará dicha deficiencia lo cual incrementaría el riesgo de estrés oxidativo en los recién nacidos, puesto que son más susceptibles por su deficiente capacidad antioxidante. Por ello resulta de sumo interés evaluar dicha coenzima en pacientes con diabetes gestacional como primera aproximación para, posteriormente, evaluarla en los recién nacidos en caso de que dicha deficiencia se confirme. La determinación plasmática de CoQ10 fue realizada utilizando una micropreparación de muestra y un sistema cromatográfico miniaturizado desarrollado previamente por nuestro grupo de trabajo. Los resultados preliminares obtenidos indican que existe, respecto de embarazos controles, una disminución significativa de los niveles plasmáticos de CoQ10 en diabetes gestacional. De los resultados obtenidos podemos concluir que la determinación de CoQ10 podría ser utilizada como evaluador bioquímico que complementaría el control y seguimiento en este tipo de embarazos de riesgo. Por otra parte, basados en dichos resultados se podría considerar a la CoQ10 como posible tratamiento en la prevención y disminución del riesgo en la diabetes gestacional.

### 311. (706) SÍNDROME METABÓLICO Y FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN UN GRUPO POBLACIONAL DE SANTA FE

Contini M.<sup>1</sup>; Millen N.<sup>2</sup>; Mahieu S.<sup>3</sup>

*Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL<sup>1 2 3</sup>*  
mcontini@fbc.unl.edu.ar

Síndrome metabólico (SM) e insulino-resistencia (IR) no son sinónimos pero IR aumenta la probabilidad de desarrollarlo. IR

puede estar presente en sujetos obesos y no obesos y no es una enfermedad sino un cambio fisiológico que incrementa el riesgo de desarrollar SM. El objetivo del presente trabajo fue determinar los valores de IR, frecuencia de SM según diferentes criterios de diagnóstico y su relación con la hipertensión arterial (HTA) en un grupo poblacional de un barrio periférico de Santa Fe. En 150 sujetos de ambos sexos, voluntarios, entre 30 y 50 años se relevaron datos personales, se tomaron medidas antropométricas y presión arterial y se determinó: Colesterol total (CT), C-HDL, Triglicéridos (TG), uricemia, glucemia en ayunas e insulinemia. Además se calcularon: Índice de Insulino Resistencia (IR) y C-LDL, Índice de masa corporal (IMC), Índice cintura cadera (ICC), CT/C-HDL y TG/C-HDL. Del total de la población el 66% tuvo diagnóstico nutricional antropométrico de obesidad y el 18% presentó sobrepeso. El diagnóstico de SM le correspondió al 14.7% de la población según el criterio de OMS, al 25% de la población según ATPIII y al 32% según IDF. El 16% de la muestra presentó IR. Un 25% de la población presentó HTA y la asociación de HTA con hiperuricemia arrojó un Odds Ratio de 5.25 (1.45-19.03)  $p=0.0076$ . Además el 100% de los hipertensos mostró sobrepeso u obesidad. De la población total solo el 43% realizaba actividad física contra un 57% de sedentarios. Con un 84% de sobrepeso y obesidad y un alto grado de sedentarismo el criterio IDF sería un predictor más sensible de SM para la identificación de individuos que presentan sobrepeso y obesidad y tienen mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes tipo II. Los resultados sugieren la importancia de la detección de SM para la corrección de los factores de riesgo modificables.

## NEFROLOGÍA 1

### 312. (4) PATOLOGÍA MOLECULAR DE LA INSUFICIENCIA RENAL AGUDA POR DEFICIENCIA DE COLINA

Denninghoff V.<sup>1</sup>; Ossani G.<sup>2</sup>; Uceda A.<sup>3</sup>; Rugnone M.<sup>4</sup>; Fernandez E.<sup>5</sup>; Fresno C.<sup>6</sup>; Gonzalez G.<sup>7</sup>; Avagnina A.<sup>8</sup>; Elsner B.<sup>9</sup>; Monserrat A.<sup>10</sup>

*CPEA-Facultad de Medicina-UBA, CEMIC, CONICET<sup>1</sup>; CPEA-Facultad de Medicina-UBA<sup>2 3 10</sup>; Laboratorio de Genómica Comparativa del Desarrollo Vegetal, Fundación Instituto Leloir, Instituto de Investigaciones Bioquímicas (IIB-BA, CONICET<sup>4</sup>); Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de Córdoba, CONICET<sup>5 6 7</sup>; CEMIC<sup>8 9</sup>*  
vdenninghoff@cemic.edu.ar

La patogenia de la lesión renal en la IRA inducida por deficiencia de colina es controvertida. El aceite de pescado (AP) tiene un notorio efecto protector en este modelo experimental. Se desconoce el perfil genético de expresión en este modelo experimental. El objetivo es describir el perfil genético de expresión del daño renal inducido por deficiencia nutricional de colina, y describir los cambios que en este perfil ocurren por la utilización de aceite de pescado como lípido. Ratas Wistar, macho, del Bioterio del CPEA, fueron divididas en 4 grupos y alimentadas con las siguientes dietas: 1- Colina deficiente (CD) con aceite de maíz (AM) y aceite vegetal hidrogenado (AVH) como lípidos; 2- Colina suplementada (CS) con AM y AVH como lípidos; 3- CD con AP como lípido; y 4- CS con AP como lípido. Los animales fueron sacrificados al día 6 de recibida la dieta experimental. El riñón derecho fue criopreservado. En este ensayo se utilizaron duplicados biológicos para cada condición. Para evaluar los cambios de expresión génica se utilizó WT Expresión Kit (Ambion, USA) sobre la plataforma GeneChip® Gene 1.0 ST Rat Genome Array (Affymetrix Inc, USA). La distribución fluorescente en el array fue obtenida usando lenguaje R ([www-r-project.org](http://www-r-project.org)), algoritmos propios y otros de <http://www.bioconductor.org/>. Se analizó la expresión diferencial de genes, utilizando como valor de corte  $p < 0.01$  &  $\log FC > 1.5$ , de los cuatro grupos. Los datos preliminares muestran que CSAM, CSAP y CDAP tienen un perfil génico globalmente más semejante. Sin embargo la comparación de CSAM vs. CSAP determinó 35 genes con expresión diferencial. Dado que CSAM y CSAP no tienen histológicamente necrosis renal, podríamos inducir que la expresión diferencial se debe al agregado de AP a la dieta.

En conclusión, el análisis de expresión génica masivo permitió confirmar el efecto protector del aceite de pescado e identificar 35 genes que estarían confirmando esa protección.

**313. (133) EL KNOCKDOWN DE LA EXPRESIÓN DE AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL (AQP8MT) DISMINUYE LA EXCRECIÓN DE NH<sub>4</sub><sup>+</sup> EN CÉLULAS DEL TÚBULO PROXIMAL RENAL HUMANO.**

Molinas S.<sup>1</sup>; Bonfils A.<sup>2</sup>; Trumper L.<sup>3</sup>; Marinelli R.<sup>4</sup>  
*IFISE-CONICET<sup>1,4</sup>; Farmacología, Fac de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>2</sup>; Farmacología, Fac de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, CIUNR<sup>3</sup>*  
*molinas@ifise-conicet.gov.ar*

En trabajos anteriores mostramos que la línea celular HK2 (derivada de epitelio de túbulo proximal renal humano) responde ante la acidosis produciendo y excretando una mayor cantidad de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Esta incrementada excreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se encontró asociada a un aumento de la expresión de AQP8mt. Dado que AQP8 facilita el transporte difusivo transmembrana de NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y se localiza en membrana interna mitocondrial de las células proximales, nuestra hipótesis supone que AQP8mt participaría en la salida mitocondrial del NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos de una expresión defectiva de AQP8mt sobre la excreción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en células HK2 en condiciones basales y en respuesta a la acidosis. El knockdown de la expresión de AQP8mt (AQP8mt-) se realizó mediante la transfección con ARN de interferencia (ARNi) específico para AQP8 humana. Como control (C) se usó ARNi no específico conteniendo los nucleótidos en secuencia irregular. El análisis por inmunoblotting indicó que después de 48 h de transfección, las fracciones enriquecidas en mitocondrias mostraron una disminución del 60 % en la expresión de AQP8mt. En el medio de cultivo se observó una menor acumulación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (C= 2,36 ± 0,14; AQP8mt- = 1,63 ± 0,12, μmol NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/μg proteína, p<0,05, n=6). La viabilidad celular (evaluada por la liberación de LDH) no se encontró afectada. Una vez establecido el knockdown, las células fueron expuestas durante 24 h a un medio ácido (pH 6,9). Se observó una disminución de la acumulación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en las células silenciadas (C= 3,86 ± 0,15; AQP8mt- = 1,60 ± 0,29, μmol NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/μg proteína, p<0,05, n=6). Estos resultados sugieren que la AQP8mt está involucrada en la respuesta a la acidosis de las células proximales humanas, posiblemente facilitando el transporte mitocondrial del NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

**314. (263) EFECTOS DE TOXINA SHIGA 2 Y SUBTILASA EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE MICROVASCULATURA GLOMERULAR HUMANA: ACCIÓN DE UN INHIBIDOR DE LA GLUCOSIL CERAMIDA SINTASA.**

Amaral M.<sup>1</sup>; Sacerdoti F.<sup>2</sup>; Silberstein C.<sup>3</sup>; Ibarra C.<sup>4</sup>  
*Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,3,4</sup>*  
*mamaral@fmed.uba.ar*

La destrucción de las células endoteliales de la microvasculatura renal por acción de la toxina Shiga (Stx), es una de las características del Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Se postula que Subtilasa (SubAB), recientemente identificada en cepas de *E. coli* productor de Stx (STEC), podría contribuir a esta patología. En este trabajo se pusieron a punto cultivos primarios de células endoteliales de microvasculatura de corteza renal humana (CEGH) para evaluar los efectos de Stx2 y SubAB. Las células se obtuvieron de fragmentos de corteza renal provenientes de nefrectomías realizadas en el Hospital Posadas. La expresión del factor von Willebrand y de globotriaosilceramida (Gb3) en CEGH, fueron detectadas por citometría de flujo y cromatografía en capa delgada (TLC), respectivamente. Para los estudios de viabilidad celular, las CEGH se incubaron con distintas concentraciones de Stx2 o SubAB durante 72 hs. La viabilidad se evaluó mediante la incorporación de rojo neutro. La DC50, que corresponde a la dosis de toxina que causa un 50% de mortalidad celular, fue de 1pg/μl para Stx2 y 15 pg/μl para SubAB. La necrosis (N) y apoptosis (A) de CEGH fueron analizadas a distintos tiempos por tinción con naranja de acridina-bromuro de etidio y visualizadas

por microscopía de fluorescencia. Stx2 (10 pg/μl) causó más N que A con un aumento significativo a las 4 hs: 41,0 ± 15,3% vs. 5,2 ± 0,14% (N vs. A, p < 0,05, n=3). En cambio SubAB (3ng/μl) produjo más A que N en todos los tiempos considerados, siendo significativamente mayor a las 6hs: 37,4 ± 2,5% vs. 19,7 ± 4,6% y 24hs: 66,0 ± 11,6% vs. 17,0 ± 5,0% (A vs. N, p < 0,05, n=3). Finalmente, el C-9 (5 μM, Genzyme Corp.), un inhibidor de la glucosilceramida sintasa neutralizó la acción de Stx2 pero no de SubAB en CEGH pre-tratadas 24 hs con el inhibidor y tratadas con Stx2 (10 pg/μl). Estos resultados indican que los efectos de Stx2 son dependientes de la presencia de Gb3 en la superficie de las células de la microvasculatura renal.

**315. (267) ALTERACIONES EN LA EXCRECIÓN URINARIA DEL TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS 5 (OAT5) EN RATAS CON INSUFICIENCIA RENAL AGUDA INDUCIDA POR CISPLATINO**

Bulacio R.<sup>1</sup>; Torres A.<sup>2</sup>  
*Área Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>1,2</sup>*  
*robulacio@hotmail.com*

El agente antitumoral Cisplatino (Cpt) es muy utilizado como terapia contra diferentes clases de tumores sólidos, como ser de ovarios, testículos y pulmones. El Cpt se acumula principalmente en los túbulos proximales renales produciendo insuficiencia renal. Oat5 es un transportador de aniones orgánicos que se expresa en membrana apical del túbulo proximal renal. Estudios previos realizados por nuestro grupo permitieron detectar por primera vez Oat5 en orina y postular a su excreción urinaria como potencial biomarcador de insuficiencia renal isquémica e inducida por mercurio. El objetivo de este trabajo fue determinar si la excreción urinaria de Oat5 se modifica luego del tratamiento con diferentes dosis de Cpt. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas controles (C) y tratadas con dos dosis diferentes de Cpt (2 y 10 mg/kg, i.p.; Cpt2, Cpt10) 48 horas antes de los experimentos. Se evaluó la excreción urinaria de Oat5 mediante Western blotting y parámetros tradicionales de daño renal como nitrógeno ureico en sangre (BUN), glucosa en orina (Glo), actividad urinaria de fosfatasa alcalina (FAo) usando métodos espectrofotométricos. Los datos se analizaron con el test de ANOVA plus Newman-Keuls P < 0.05: (a) vs C, (b) vs Cpt2, (c) vs Cpt10, y se expresan como media ± SEM.

	C (n = 4)	Cpt 2 (n = 4)	Cpt 10 (n = 4)
BUN(mg/dL)	14,9 ± 0,7	12,9 ± 0,4 <sup>c</sup>	57,7 ± 4,1 <sup>a,b</sup>
FAo (U/l/g Cr)	81 ± 2	41 ± 11 <sup>c</sup>	397 ± 130 <sup>a,b</sup>
Glo(g/gCr)	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01 <sup>c</sup>	5,5 ± 2,3 <sup>a,b</sup>
Oat5o (%)	100 ± 9	426 ± 19 <sup>a,c</sup>	786 ± 70 <sup>a,b</sup>

En el grupo Cpt10 se observó un gran incremento de la excreción urinaria de Oat5 y de las demás variables estudiadas con respecto al grupo C. El grupo Cpt2 no mostró alteración de los parámetros tradicionales para evaluar daño renal, pero sí un aumento de los niveles urinarios de Oat5 del 326 %, lo que sugeriría que la excreción urinaria de Oat5 podría ser utilizada como biomarcador temprano del daño renal inducido por este fármaco.

**316. (344) EFECTOS DE LA TOXINA SUBTILASA, SECRETADA POR CEPAS DE STEC, EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CÉLULAS EPITELIALES DE CORTEZA RENAL HUMANA**

Velazquez N.<sup>1</sup>; Mirarchi F.<sup>2</sup>; Amaral M.<sup>3</sup>; Ibarra C.<sup>4</sup>; Silberstein C.<sup>5</sup>  
*Lab de Fisiopatología, Depto de Fisiología, Fac de Medicina, UBA<sup>1,2,3,4,5</sup>*  
*natalia.velazquez@gmail.com*

*Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) causa diarrea, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). La toxina Subtilasa (SubAB), recientemente aislada de cepas de STEC, también es capaz de desarrollar SUH en modelos experimentales, aunque se desconoce su papel en el

desarrollo de la enfermedad en humanos. El objetivo del trabajo fue estudiar los efectos citotóxicos de SubAB en cultivos primarios de células epiteliales de corteza renal humana (CERH) y comparar sus efectos con aquellos producidos por la toxina Shiga 2 (Stx2). Para ello, se desarrollaron cultivos de CERH a partir de nefrectomías de pacientes pediátricos, que fueron incubados a distintos tiempos y diluciones con SubAB y Stx2. Se midió la viabilidad celular por incorporación de rojo neutro y la apoptosis celular por coloración con naranja de acridina-bromuro de etidio. La SubAB produjo inhibición de la viabilidad celular de CERH de manera dosis y tiempo dependiente. Luego de 72 hs de incubación, la DC50 para SubAB (5 ng/ml) fue 100 veces mayor que para Stx2 (0,05 ng/ml). En cambio, a diluciones mayores no se observaron diferencias significativas entre los efectos de ambas toxinas. Luego de 24 hs, SubAB (400 ng/ml) y Stx2 (100 ng/ml) estimularon la apoptosis de CERH a un 21% y 28% respectivamente mientras que redujeron la viabilidad celular a  $88 \pm 7\%$  y  $75 \pm 3\%$  respectivamente. La co-incubación de CERH con SubAB y Stx2 produjo niveles de apoptosis similares a los de cada toxina por separado, pero estimuló la necrosis celular. Cuando CERH fueron incubadas con una mutante de la SubAB en el sitio activo de la subunidad A (SubA272B), la viabilidad y apoptosis fue similar al control sin tratamiento. En conclusión, la toxina SubAB tiene un efecto citotóxico directo a nivel de las células epiteliales de los túbulos de riñón humano, pudiendo contribuir de esta manera junto a la Stx2 a la insuficiencia renal característica del SUH.

**317. (376) EXPRESION RENAL Y HEPATICA DE LA PROTEINA ASOCIADA A MULTIRESISTENCIA A DROGAS 2 (MRP2) EN RATAS TRATADAS CON CLORURO MERCURICO.**

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

Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR, CONICET<sup>1,2</sup>  
mariaherminiahazelhoff@yahoo.com.ar

Luego de la exposición a compuestos que contienen mercurio, los iones mercúricos se acumulan en diferentes órganos (entre ellos hígado y riñón), ocasionando toxicidad. Se ha descrito que los iones mercúricos luego de entrar a las células hepáticas y renales son exportados de las mismas a través de Mrp2. Mrp2 se localiza en la membrana canalicular de los hepatocitos y en la membrana apical de las células de túbulo proximal renal. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la expresión hepática y renal de Mrp2 en ratas expuestas a HgCl<sub>2</sub>. Se trabajó con ratas Wistar hembras adultas tratadas con una dosis única de cloruro mercúrico (HgCl<sub>2</sub>, 4 mg/kg p.c., i.p.) 18 horas antes de los experimentos (grupo T, n=4). Paralelamente se procesó un grupo de ratas controles (C, n=4). En estos animales se determinaron los niveles plasmáticos de urea (U) y de las transaminasas AST y ALT por espectrofotometría. Se evaluó también la histología renal y hepática. La expresión de Mrp2 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  $\pm$  SEM. U (g/L): C =  $0.36 \pm 0.02$ , T =  $1.87 \pm 0.32^*$ ; AST (U/L): C =  $13 \pm 1$ , T =  $53 \pm 6^*$ ; ALT (U/L): C =  $4.3 \pm 0.4$ , T =  $4.8 \pm 0.9$ ; Mrp2 Hr (%): C =  $100 \pm 14$ , T =  $289 \pm 84^*$ ; Mrp2 Mr (%): C =  $100 \pm 20$ , T =  $1383 \pm 276^*$ ; Mrp2 Hh (%): C =  $100 \pm 7$ , T =  $68 \pm 3^*$ ; Mrp2 Mh (%): C =  $100 \pm 8$ , T (%):  $59 \pm 5^*$ ; \*p<0.05. Los estudios histológicos corroboraron el daño renal y hepático ocasionado por la dosis empleada de HgCl<sub>2</sub>. Se observó una respuesta diferente en la expresión de Mrp2 de ambos órganos frente a la exposición con HgCl<sub>2</sub>. La disminución de la expresión de Mrp2 en hígado podría deberse a una mayor sensibilidad hepática a los efectos tóxicos inducidos por el mercurio. Por el contrario, el aumento en la expresión de Mrp2 en riñón sugeriría la presencia de un mecanismo compensador renal destinado a aumentar la eliminación de este metal.

**318. (460) EFECTOS DE LA TOXINA SHIGA 2 EN CULTIVOS PRIMARIOS TRIDIMENSIONALES DE CÉLULAS EPITELIALES TUBULARES DE CORTEZA RENAL HUMANA**  
Mirarchi F.<sup>1</sup>; Velazquez N.<sup>2</sup>; Repetto H.<sup>3</sup>; Silberstein C.<sup>4</sup>

Laboratorio de Fisiopatología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,4</sup>; Servicio de Pediatría Hospital Nacional Prof Alejandro Posadas<sup>3</sup>  
tomas\_fm19@hotmail.com

Las infecciones por Escherichia coli productora de toxina Shiga pueden causar diarrea, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). La toxina Shiga 2 (Stx2) es responsable de la insuficiencia renal aguda característica del SUH. El objetivo del trabajo fue estudiar los efectos de Stx2 sobre la proliferación celular y la tubulogénesis en cultivos primarios de células epiteliales tubulares de riñón humano (CERH). Para ello, se desarrollaron cultivos tri-dimensionales (3D) a partir de cultivos primarios de CERH sembradas en una matriz extracelular (matrigel). Las CERH fueron aisladas de fragmentos renales de pacientes sometidos a nefrectomías en el Hospital Nacional Prof. A. Posadas. Se midió la viabilidad celular mediante la incorporación de rojo neutro en los cultivos primarios y se observó el desarrollo de tubulogénesis en los cultivos 3D. Luego de 3hs de ser sembradas en matrigel, las CERH presentaron cambios morfológicos con elongación celular seguida de migración celular. Luego de 24 hs, los cultivos 3D formaron agregados celulares que dieron lugar a estructuras tubulares, las cuales crecieron en tamaño y complejidad en los días siguientes. Cuando los cultivos primarios de CERH fueron incubados con una dosis de Stx2 que inhibió la viabilidad celular al 50 %, las células vivas remanentes redujeron la capacidad de migración y de tubulogénesis al ser sembradas en matrigel. La incubación con SB203580 10  $\mu$ M, inhibidor de la p38 MAP kinasa, estimuló el crecimiento de CERH y produjo un aumento significativo del 30 % (p < 0,01) en el tamaño de las estructuras tubulares en los cultivos 3D, respecto de las CERH controles. La pre-incubación de las células con dicho inhibidor, seguida de la incubación con Stx2 por 24 hs, disminuyó en un 19 % el efecto citotóxico de Stx2 sobre la viabilidad celular. Los cultivos 3D de CERH puede ser un modelo in vitro para estudiar mecanismos de desdiferenciación y proliferación celular luego del daño renal producido por Stx2.

**319. (463) ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS Y ULTRAESTRUCTURALES RENALES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERURICEMIA LEVE: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FSP-1**

Romero C.<sup>1</sup>; Leimgruber C.<sup>2</sup>; Torres A.<sup>3</sup>; Mukdji J.<sup>4</sup>  
Centro de Microscopía Electrónica FCM UNC<sup>1,2,3,4</sup>  
cromero@cmefcm.uncor.edu

La hiperuricemia se asocia a enfermedad renal progresiva e hipertensión arterial. El objetivo de este estudio fue analizar los cambios histopatológicos y ultraestructurales renales inducidos por la hiperuricemia leve; relacionándolos con la expresión tubular de la proteína FSP-1 como indicadora de transición epitelio-mesenquimática. Se utilizaron ratas Wistar machos adultas: Grupo I (n=4): dieta normosódica e inyección SC de ácido oxónico (bloqueante de la uricasa hepática) + ácido úrico (7 semanas). Grupo II, control (n=4): dieta normosódica e inyección de vehículo. Los riñones fueron procesados para microscopía óptica y electrónica de transmisión. La inflamación intersticial se clasificó en bajo y alto grado. Se determinó la expresión de la proteína FSP-1 por inmunohistoquímica, evaluando el número de túbulos positivos por superficie cortical (superficie por grupo:  $1,6 \times 106 \mu$ m<sup>2</sup>). Además, se analizaron los cambios en la celularidad y ultraestructura glomerulares. Estadística: prueba de Levene para homogeneidad de varianzas. Test T para variables cuantitativas y Chi cuadrado para las cualitativas. Los niveles de ácido úrico aumentaron de manera progresiva y significativa: (p<0,01) generando un estado de leve hiperuricemia (Grupo I:  $1,02 \pm 0,15$ mg%; Grupo II:  $0,33 \pm 0,2$ mg%). Este estado cursó con niveles elevados de urea en sangre (p<0,01), leve fibrosis intersticial multifocal con infiltrado inflamatorio de alto grado en la región del laberinto cortical (p<0,01), aumento de la celularidad a nivel glomerular (p<0,01) y expansión edematosa del espacio subendotelial de los capilares glomerulares. El grupo hiperuricémico evidenció mayor número de túbulos con expresión de FSP-1, pero sin alcanzar

significancia estadística ( $p=0,057$ ). Los hallazgos descriptos indicarían que estados de hiperuricemia leve inducen eventos fibrogénicos-inflamatorios a nivel renal con cambios glomerulares y variaciones en la expresión de FSP-1, contribuyendo así a la progresión del daño renal.

### 320. (528) RESPUESTA RENAL EN DOS MODELOS DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR GLUTAMATO MONOSÓDICO (GMS) EN RATAS MACHOS

Mahieu S.<sup>1</sup>; Contini M.<sup>2</sup>; Millen N.<sup>3</sup>

LIFE, Facultad de Bioquímica y Cs Biológicas, UNL<sup>1,2,3</sup>  
smahieu@fbc.unl.edu.ar

El tratamiento a ratas con GMS a través de dos modelos diferentes: neonatal y por vía oral induce síndrome metabólico caracterizado por obesidad, aumento del índice de Lee, pruebas de tolerancia a la glucosa endovenosa y a la insulina alteradas y dislipemia. Nuestro objetivo fue determinar si existen diferencias entre ambos modelos en la función y estado oxidativo renal. Se trabajó con cuatro grupos: GMSn, administración subcutánea postnatal (4 mg/g peso), Cn control tratado con solución fisiológica, GMSo tratado por vía oral (3 g/100 g alimento y 1% en el agua de bebida) diariamente durante 7 meses, Co reemplazo del glutamato por una cantidad equimolar de NaCl. Se estudiaron los aspectos metabólicos, la función renal (clearance de Inulina y PAH, EF% Na, K y agua, y capacidad para concentrar la orina) y el estado oxidativo renal: lipoperoxidación (LPO), contenido de glutatión (GSH) y actividad de glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) a los 7 meses. Los cambios vinculados al síndrome metabólico fueron similares en ambos modelos. Los parámetros hemodinámicos se afectaron en ambos grupos: VFG (ml/min.g riñón) Cn:  $0,88 \pm 0,09$ , GMSn:  $0,62 \pm 0,09^*$ , Co:  $1,0 \pm 0,01$  GMSo:  $0,58 \pm 0,07^*$ ; CPAH (ml/min.g riñón) Cn:  $3,9 \pm 0,3$ , GMSn  $3,1 \pm 0,1^*$ , Co:  $4,8 \pm 0,3$ , GMSo  $2,34 \pm 0,3^*$ . Solo el grupo GMSo mostró un aumento en la EF% Na, K y agua con reducción de la concentración sérica de aldosterona, y reducción en la capacidad de concentrar la orina con DDAVP. GMSn y GMSo presentaron reducción de GSH, pero en GMSn estuvo acompañado de un aumento en la actividad de GPx y GR, mientras que en GMSo las actividades disminuyeron. No hubo cambios en LPO, CAT, SOD. Estos resultados ponen de manifiesto que si bien las alteraciones metabólicas podrían afectar el funcionamiento renal, los niveles séricos elevados de glutamato actuando a través de los receptores NMDA expresados en riñón podrían ser responsables en parte de los efectos observados.

### 321. (540) INHIBICIÓN DEL SISTEMA DE ENDOTELINA DURANTE EL PERÍODO POSTNATAL: EXPRESIÓN RENAL DE AQP2. DIFERENCIAS DE SEXO

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>; Majowicz M.<sup>6</sup>

FFyB, UBA<sup>1,2,3,4,5,6</sup>  
mfalber@ffyb.uba.ar

Endotelina (ET) participa en la aparición y en el mantenimiento de las funciones del riñón durante el desarrollo perinatal. ET-1 aumenta la expresión del RNAm del receptor (R) V2 de AVP y de la acuaporina 2 (AQP2) a nivel de los túbulos colectores renales papilares, a través del R ETB y modula la expresión y la actividad de las diferentes isoformas de la óxido nítrico sintasa (NOS) renales. A su vez, el NO participaría en la regulación de la expresión de AQP2. El objetivo del trabajo fue estudiar la expresión mediante Western Blot (WB) de AQP2, NOS I y NOS III en médula (M) y papila (P) renal de ratas Sprague Dawley machos (Ma) y hembras (He) de 21 días, que fueron tratadas con bosentan (B; inhibidor mixto de los receptores de ET) por vía oral (20 mg/Kg/día) desde el día 1 al 20 postnatal. Se midieron además parámetros de función renal. Los controles (C) recibieron un volumen equivalente de agua destilada. Los resultados del WB se expresaron normalizando la DO con respecto a tubulina. La expresión de AQP2 disminuyó en M y P en las He tratadas con B [He-B] (M:  $0,38 \pm 0,02^*$ ; P:  $0,15 \pm 0,01^*$ ) vs su control (M:  $0,55 \pm 0,05$ ; P:  $0,20 \pm 0,02$ ) y vs los Ma tratados con B [Ma-B] (M:

$0,48 \pm 0,05^*$ ). La expresión de NOS I disminuyó en M y P en las He-B (M:  $0,35 \pm 0,02^{**}$ ; P:  $0,28 \pm 0,02^{**}$ ) vs su control (M:  $0,51 \pm 0,05$ ; P:  $0,71 \pm 0,04$ ) y vs [Ma-B] (M:  $0,42 \pm 0,02^*$ ). La expresión de NOS III disminuyó en P en las He-B ( $0,07 \pm 0,01^*$ ) vs su control ( $0,23 \pm 0,03$ ) y vs Ma-B ( $0,14 \pm 0,02^{**}$ ). La osmolaridad urinaria disminuyó en He-B vs Ma-B ( $853 \pm 62^*$  vs  $1414 \pm 168^*$ ) y la diuresis tiende a aumentar en He-B vs su control. ANOVA + Tukey;  $^*p < 0,05$ ;  $^{**}p < 0,01$ ; n=5. La inhibición de ET durante el período postnatal afecta la expresión de AQP2, NOS I y NOS III, siendo este efecto diferente según el sexo. La disminución de AQP2 en las He-B se correlaciona con parámetros renales. AQP2 y NOS varían en el mismo sentido, lo que sugiere una relación entre las dos proteínas.

### 322. (617) EFECTO DE DOSIS LETALES Y SUBLETALES DE LA TOXINA SHIGA TIPO 2 EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL SÍNDROME URÉMICO HEMOLÍTICO (SUH) EN RATAS.

Ochoa F.<sup>1</sup>; Oltra G.<sup>2</sup>; Gerhardt E.<sup>3</sup>; Ibarra C.<sup>4</sup>; Lago N.<sup>5</sup>; Zotta E.<sup>6</sup>

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2</sup>  
<sup>3,4,6</sup>; Centro de Patología Experimental y Aplicada, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>  
fochoa@inbox.com

Introducción: En la Argentina, el SUH constituye la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda en los niños. El objetivo de nuestro estudio fue analizar la respuesta tubular temprana al efecto de la toxina Shiga tipo 2 (Stx2) y la evolución a la cronicidad, en un modelo experimental de SUH en ratas. Métodos: Las ratas adultas Sprague-Dawley (150-200 g) fueron inyectadas por vía intraperitoneal con sobrenadante de cultivo bacteriano de E-coli recombinante que expresa Stx2, 3 mL/200 g de peso (dosis letal, grupo agudo) y 0.25 mL/200 g de peso (dosis subletal, grupo en evolución). El grupo control se inoculó con el mismo volumen de solución salina. Se realizaron estudios funcionales, histológicos, inmunohistoquímicos y de biología molecular en ambos grupos. Resultados: Los túbulos renales mostraron en el grupo agudo un aumento en la expresión del factor de crecimiento transformante beta-1 (TFG- $\beta$ 1) con un cambio inmunofenotípico de las células tubulares. Así mismo se observó la expresión de novo de un marcador de miofibroblastos (Fsp-1) originados por transformación epitelio-mesenquimática (EMT) a nivel cortico-medular y fibrosis en la zona periglomerular. El grupo en evolución desarrolló una EMT en glomérulo a la primer semana y medular en el tercer mes con fibrosis corticomedular y esclerosis focal y segmentaria. Conclusión: Nuestros resultados indican que la respuesta tubular temprana a los efectos de dosis letales de Stx2 se relaciona con una EMT de las células tubulares corticales y medulares y la presencia de fibrosis leve en el intersticio. Los estudios realizados en ratas inoculadas con dosis sub-letales destinados a evaluar la progresión, mostraron que desarrollaron una EMT glomerular a la primer semana con esclerosis focal y segmentaria posteriormente y una EMT a nivel medular en el tercer mes. Nuestros resultados sugieren una diferente evolución de cada sector de la nefrona dependiente de la dosis de toxina y el tiempo de evolución.

### 323. (620) RESPUESTA TUBULAR AL MANEJO DE PROTEÍNAS EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA EN RATAS

Oltra G.<sup>1</sup>; Ochoa F.<sup>2</sup>; Dietrich V.<sup>3</sup>; Damiano A.<sup>4</sup>; Lago N.<sup>5</sup>; Zotta E.<sup>6</sup>

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2</sup>  
<sup>6</sup>; Departamento de Ciencias Biológicas, FFyB<sup>3,4</sup>; Departamento de Patología, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>  
giselaoltra@gmail.com

Introducción: La insuficiencia renal crónica se caracteriza por la pérdida progresiva de nefronas. Las nefronas remanentes experimentan modificaciones a medida que el riñón intenta adaptarse a dicha reducción. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar los mecanismos de adaptación relacionados con la evolución de la enfermedad renal progresiva. Métodos: Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos de 250 g de peso, a las que se le indujo insuficiencia renal crónica (IRC) a partir del modelo de 5/6

de nefrectomía. Se realizaron estudios funcionales, histoquímicos (IHQ) y de biología molecular a las semanas 1, 3, 5 y 20 post cirugía. Resultados: Por IHQ se evidenció la presencia del factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 (TGF-  $\beta$ -1) sobre todo en los túbulos proximales y de alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) a nivel túbulointerstitial en la 1, 3 y 5 semanas de evolución. No detectamos estos cambios a las 20 semanas. El estudio IHQ del mecanismo de reabsorción proximal de proteínas evidenció una disminución en la expresión de megalina tiempo dependiente. El contratransporte sodio-protón3 (NHE-3) que interviene en la regulación de la megalina mostró por western blot un aumento significativo en semanas 3 y 5, con disminución a las 20 semanas a nivel citosólico. Este resultado fue coincidente con la presencia de microalbuminuria a partir de la semana 2 y proteinuria a partir de las 20 semanas. Conclusión: Durante la evolución de la IRC por 5/6 de nefrectomía la secuencia en la aparición de microalbuminuria y proteinuria podrían asociarse a la alteración en la expresión de megalina, al aumento en la expresión del TGF-  $\beta$ -1 y el cambio de ubicación del NHE-3. Mientras que la aparición de fibroblastos intersticiales indica la glomerulosclerosis focal y segmentaria a las 20 semanas.

### 324. (700) RESPUESTA RENAL Y HORMONAL EN EL ANIMAL ENTERO AL BLOQUEO DEL CANAL EPITELIAL DE POTASIO

Solerno M.<sup>1</sup>; Oddo E.<sup>2</sup>; Azurmendi P.<sup>3</sup>; Muchnik C.<sup>4</sup>; Ibarra F.<sup>5</sup>; Arrizurieta E.<sup>6</sup>

Laboratorio de Riñón Experimental, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
pazurmendi@lanari.fmed.uba.ar

Varias líneas de evidencia indican que los canales epiteliales de potasio son necesarios para el transporte transepitelial de cloruro de sodio por el asa ascendente de Henle. El síndrome de Bartter, p.e., generado por mutaciones en el canal de potasio de la medular externa renal (ROMK), provee información genética respecto de la importancia de dichos canales en la reabsorción de sodio mencionada. Es de nuestro interés, en esta oportunidad, estudiar la respuesta renal y hormonal en el animal entero al bloqueo del ROMK por glibenclamida (G). Se estudiaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR) de 12 semanas de vida a las que se les administró G (10 mg/kg p.c.) por vía oral los 3 días previos al estudio. Se usaron como control ratas SHR (C) y, ambos grupos recibieron como agua de bebida solución glucosada al 4%. La excreción de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> previa a la administración de G fue de 0.89±0.11 y 2.28±0.17 mEq/día y, después del tratamiento se observó un aumento en la excreción de Na<sup>+</sup> de 2.5 veces y una disminución de la excreción de K<sup>+</sup> en un monto similar (p<0.0001). La relación Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> basal de 0.38±0.02 aumentó a 0.59±0.07 y 2.53±0.37 en C y G (p<0.0001), respectivamente. El potasio plasmático permaneció en 3±0.5 mEq/l, la glucemia se mantuvo en rango normal y la aldosteronemia fue 45±9.6 pg/ml. La glucosuria fue negativa excepto en un caso. El bloqueo del ROMK en el animal entero, confirma la disminución de la reabsorción de sodio y de la excreción de potasio observada en estudios in situ, sin cambios en la presión arterial. La depleción de K<sup>+</sup> se manifiesta por un descenso de K<sup>+</sup> y aldosterona plasmática, normalmente involucrados en su regulación.

### 325. (714) EFECTO DE LOSARTAN SOBRE LA EXPRESIÓN DE HSP70 Y CHIP EN CÉLULAS EPITELIALES DE TÚBULOS PROXIMALES Y SU EFECTO SOBRE LA REGULACIÓN DE NOX4

Gil Lorenzo A.<sup>1</sup>; Bocanegra V.<sup>2</sup>; Lopez Appiolaza C.<sup>3</sup>; Bernardon M.<sup>4</sup>; Vallés P.<sup>5</sup>

Área de Fisiopatología, Fac de Cs Médicas, UNCUYO - IMBECU - CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>  
andreafermandagillorenzo@gmail.com

Introducción. La señalización de Angiotensina II (All) involucra la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) derivadas del complejo NAD(P)H-oxidasa. Nox4 se expresa en células epiteliales tubulares proximales (TP); su mecanismo de regulación

es desconocido. Hsp70 protege ante el estrés oxidativo, participa en el transporte de proteínas a localizaciones intracelulares específicas e interactúa con proteínas de membrana. CHIP es una ligasa de Hsp70 y ubiquitina E3; interviene en la ubiquitinación, agregación y degradación proteica. Objetivo. Analizar el efecto de Losartan sobre expresión de Hsp70 y CHIP en células TP y su participación en la regulación de la expresión de Nox4. Métodos. Cultivo primario de células PT derivadas de animales SHR, controles WKY y cultivos HK2, fueron estimuladas con All 1x10<sup>-7</sup>M durante 15min o previamente tratadas con Losartan 1x10<sup>-5</sup>M durante 30, 90 y 120min en medio libre de suero. Cultivos sin tratar se utilizaron como control. La expresión de proteínas fue analizada por Western blot y su interacción por inmunoprecipitación e inmunofluorescencia (microscopía confocal). Resultados. Losartan incrementó la expresión de Hsp70, C:100% vs L30: 142,7±2,8\*\* y L90:215,1±0.4\*\*\* (P<0,001), efecto que se mantuvo luego del tratamiento con All. Incremento en la expresión de CHIP fue mostrada en función del tiempo de tratamiento con Losartan respecto del control, C:100% vs L30:196,9±10,1\*\* (P<0.01) y L90:272,1±20,2\*\*\* (P<0.001), en tanto que el tratamiento previo con Losartan bloqueó el incremento de Nox4 provocado por All. Demostramos colocalización de Nox4 con CHIP y Hsp70 por IP e IFI posttratamiento con Losartan en células tubulares proximales de animales espontáneamente hipertensos. Conclusión. Nuestros resultados permiten sugerir la participación activa de Hsp70 y CHIP en el mecanismo citoprotector de Losartan mediante la regulación negativa de Nox4 en células tubulares proximales HK2 estimuladas con All y en cultivos primarios de SHR.

## MODELOS ANIMALES 2

### 326. (188) EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE RATAS SPRAGUE DAWLEY LACTANTES, CON MADRES ALIMENTADAS CON TRES ALIMENTOS BALANCEADOS COMERCIALES

Gullace F.<sup>1</sup>; Casanova V.<sup>2</sup>; Cicale E.<sup>3</sup>; Galassi Gerez P.<sup>4</sup>; Caturini E.<sup>5</sup>; Veksler Hess J.<sup>6</sup>; Quintana H.<sup>7</sup>; Carcagno A.<sup>8</sup>; Argibay T.<sup>9</sup>; Gonzalez G.<sup>10</sup>

Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10</sup>  
fgullace@fvet.uba.ar

Introducción: El animal utilizado en investigación debe recibir el mejor alimento que cubra las necesidades de crecimiento, mantenimiento y/o reproductivas. Si se usan lactantes como modelo experimental es importante la influencia del alimento sobre las madres gestantes y en el desarrollo de las crías lactando. Objetivos: Comparar el crecimiento de crías lactantes de rata utilizando los tres alimentos comerciales más usados en nuestro medio. Materiales y métodos: ratas Sprague Dawley (Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias - UBA), en condiciones convencionales bajo barreras, con parámetros ambientales estandarizados. Se organizaron al azar tres grupos de 10 hembras preñadas c/u: Grupo 1 (G1); Grupo 2 (G2) y Grupo 3 (G3) alimentadas desde su nacimiento y durante todo la experiencia respectivamente con Alimento 1 (AL1), Alimento 2 (AL2) y Alimento 3 (AL3), al igual que los machos con las que se aparearon. Al parto a cada hembra se le dejaron 10 crías: 5 hembras y 5 machos; 300 crías en total; 100 por alimento en estudio (50 hembras y 50 machos). Las crías se pesaron a partir del segundo día de vida, cada 3 días y hasta el día 21. Se tomaron los pesos promedio de cada camada para su comparación. En la evolución de la curva de peso se consideraron dos períodos: desde el día 2 hasta el día 12 y desde el día 2 hasta el día 21. Los datos fueron procesados por ANOVA para determinar diferencias significativas (p< 0,05) entre grupos. Resultados: Se observaron diferencias significativas en los períodos analizados entre el AL3 y los AL1 y AL2. Entre AL1 y AL2 se observaron diferencias significativas el día 21 con mayores pesos a favor del AL2. Los promedios de los pesos se detallan en tabla adjunta. El AL3 fue el que produjo menor ganancia de peso en las crías. Conclusiones: Las diferencias obedecerían a las diferentes calidades de los ingredientes utilizados y/o en los procesos industriales usados en la elaboración de los alimentos.

Pesos promedio en gramos a diferentes edades y distintas dietas en ratas Sprague Dawley

DIETA	DIA 2	DIA 12	DIA 21
AL 1	7,62a	29,77a	53,34a
AL 2	7,44a	29,53a	55,57b
AL 3	6,61b	21,39b	41,94c

Para cada tiempo a letras diferentes/diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

### 327. (221) EVENTOS CELULARES Y MOLECULARES QUE CARACTERIZAN AL OVIDUCTO DE CAIMAN LATIROSTRIS EN ESTADIOS PRE Y PERI-ADENOGÉNESIS.

Galoppo G.<sup>1</sup>; Stoker C.<sup>2</sup>; Canesini G.<sup>3</sup>; Zayas M.<sup>4</sup>; Durando M.<sup>5</sup>; Luque E.<sup>6</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>7</sup>

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

ggaloppo@fbc.unl.edu.ar

Caiman latirostris (yacaré overo) es una especie de nuestra fauna nativa. El oviducto es un órgano hormonodependiente y en las especies ovíparas, como el yacaré, tiene un papel fundamental en la secreción de proteínas y formación de la cáscara del huevo. Nuestro objetivo fue caracterizar algunos parámetros oviductales en periodos pre y peri-adenogénesis. Hembras nacidas de huevos recogidos en zonas pristinas e incubados en condiciones controladas fueron sacrificadas a diferentes edades (desde neonatos hasta juveniles). El oviducto se procesó hasta su inclusión en parafina. En cortes teñidos con PAS o picosirius hematoxilina se evaluaron características histo-morfológicas que permitieron establecer dos grupos: pre-adenogénesis y peri-adenogénesis. Pre-adenogénesis (n=14): edad 40,71±6,5 días y masa corporal 75,25±12,72g; peri-adenogénesis (n=7): edad 17,86±2,6 meses y masa corporal 1624,0±196,2g. Estudiamos la expresión de receptor de estrógeno alfa (RE), receptor de progesterona (RP), proliferación celular (PCNA) y  $\alpha$ -actina de músculo liso por inmunohistoquímica. La expresión de  $\alpha$ -actina permitió distinguir subepitelio de capa muscular. La expresión de RE en epitelio luminal y subepitelio no mostró cambios relacionados con la adenogénesis mientras que la expresión de RP en el epitelio luminal aumentó en la peri-adenogénesis (test t,  $p=0,0004$ ). La actividad proliferativa no se modificó en los estadios estudiados, mostrando una tendencia a mayor proliferación en epitelio luminal relacionada a la aparición de las glándulas. En el estadio pre-adenogénesis se observó PAS positividad difusa en el borde apical del epitelio luminal y durante la adenogénesis un patrón granular intenso en el citoplasma del epitelio luminal y glandular. Los parámetros evaluados permitieron caracterizar al oviducto del yacaré en dos estadios de diferenciación funcional. Estudios futuros permitirán definir si estos parámetros son biomarcadores de perturbación endócrina.

### 328. (328) ANESTESIA INTRA-RECTAL EN COBAYOS UTILIZANDO LA COMBINACIÓN DE UN ANESTÉSICO DISOCIATIVO Y UNA BENZODIAZEPINA (KETAMINA/DIAZEPAM)

Caturini E.<sup>1</sup>; Bergerou C.<sup>2</sup>; Pucheta N.<sup>3</sup>; Julin H.<sup>4</sup>; Gullace F.<sup>5</sup>

INAME ANMAT<sup>1 2 3 4 5</sup>

ecaturin@anmat.gov.ar

La práctica anestésica parenteral en cobayos implica una situación de stress importante para la especie. Generalmente la vía de administración de drogas anestésicas es la intraperitoneal, lo que requiere una sujeción física particular que empeora la situación de stress del animal. El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una vía de administración de fármacos anestésicos alternativa que permitiera, administrando bajas dosis de droga una cómoda manipulación del animal, facilitando la tarea del operador en el momento de la extracción de fluidos y proveyera una anestesia rápida y segura para realizar procedimientos quirúrgicos o maniobras experimentales de corta duración. Se utilizó una muestra de 20 cobayos macho albinos, cuyo peso promedio fue de 300

+/- 50g, provenientes del Instituto Carlos G. Malbran, mantenidos bajo condiciones controladas en el Bioterio del INAME. Se les administró ketamina/diazepam en una dosis de 50 mg/kg + 2,5 mg/kg por vía intra-rectal, utilizando una sonda nasogástrica CA35 de 1,4 mm de diámetro adaptada en su longitud (aproximadamente 2 cm.), previo vaciamiento manual de la ampolla rectal. Se registró un tiempo de latencia de las drogas de 3 a 4 minutos y una duración del efecto de las mismas entre 15 y 30 minutos en todos ellos. La administración intra-rectal de la combinación anestésica utilizada es una opción sencilla y rápida para el operador y segura para el animal. Permite realizar procedimientos de corta duración donde sólo se requiera analgesia somática y buena relajación, siendo una alternativa que ofrece un mayor margen de seguridad en comparación con la anestesia parenteral y/o inhalada contribuyendo, por ser menos invasiva, al bienestar animal.

### 329. (339) EFICIENCIA EN TÉCNICAS DE TRANSGENESIS EN LOS SERVICIOS DEL INSTITUT PASTEUR DE MONTEVIDEO

Schlapp G.<sup>1</sup>; Goyeneche L.<sup>2</sup>; Cardenas-rodriguez M.<sup>3</sup>; Crispo M.<sup>4</sup>

Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación, Institut Pasteur de Montevideo<sup>1 2 4</sup>; Laboratorio de Genética Molecular Humana<sup>3</sup>

gschlapp@pasteur.edu.uy

Los animales transgénicos son ampliamente utilizados para estudiar la función y regulación génica, testear estrategias terapéuticas o como modelo de enfermedades humanas. El Institut Pasteur produce ratones transgénicos como servicio para investigadores de la región. Las técnicas disponibles son la microinyección pronuclear de ADN (Tg clásica), inyección de células madre embrionarias (ESc) en blastocistos, y transgénesis mediada por lentivirus (LV). En este trabajo se reporta la eficiencia de estas técnicas utilizadas en la UATE. Se analizaron los datos obtenidos desde 2008 a 2011 sobre un total de 11920 embriones inyectados. Para la micromanipulación se empleó un microscopio invertido (TE 2000, Nikon, EEUU) unido a dos micromanipuladores (NK2, Eppendorf, Alemania). Los embriones microinyectados con ADN o ESc fueron transferidos a hembras receptoras, mientras que los microinyectados con LV fueron cultivados in vitro, evaluándose la expresión de GFP a las 24 hs. Los resultados de sobrevivencia embrionaria (embriones viables/total inyectados) fueron: 54.6%(5972/10941), 78.8%(655/831) y 87.8%(130/148) para Tg clásica, ESc y LV respectivamente. El nº de embriones GFP+/total inyectados (solo inyección LV) fue 42.6%(63/148). Los resultados siguientes corresponden a Tg clásica y ESc respectivamente: Receptoras preñadas/transferidas 54.8%(121/221) y 25.0%(11/44); Crías nacidas/embriones transferidos 21.3%(548/2572) y 24.0%(29/121); Transgénicos/ crías vivas al día siete 4.5%(21/463) y 24.1%(7/29); Transgénicos/total inyectados 0.2%(21/10941) y 0.8%(7/831). Fueron producidos un total de 21 fundadores mediante Tg clásica, 7 quimeras por inyección de ESc, y 63 embriones que expresaron GFP al ser infectados con LV, siendo las tres técnicas efectivas en la obtención de modelos transgénicos solicitados. En conclusión, el Institut Pasteur de Montevideo cuenta con la capacidad de generar ratones transgénicos por diferentes técnicas disponibles a investigadores de la región.

### 330. (388) ETOGRAMA Y EVALUACIÓN DEL BIENESTAR EN UNA COLONIA DE RATONES KNOCK OUT

Arévalo A.<sup>1</sup>; Crispo M.<sup>2</sup>

Institut Pasteur de Montevideo<sup>1 2</sup>

aparevalo@pasteur.edu.uy

El bienestar animal (BA) es el estado de salud física y mental en el cual los individuos están en armonía con el medio. La estimación del bienestar se deduce de la ausencia de indicadores de malestar, sufrimiento o enfermedad, así como en el conocimiento de las necesidades fisiológicas y etológicas de los animales. Los requisitos del bienestar físico están relacionados con un buen manejo, buen estado de salud e instalaciones apropiadas que no provoquen lesiones físicas ni disconfort. El bienestar



psicológico es medido por las necesidades conductuales que abarcan el miedo, la angustia y el estrés, así como el contacto con el hombre. El objetivo de estudio fue evaluar el estado de bienestar de una colonia de ratones KO IL 17. En base a las 5 libertades del BA (Hambre y sed; Incomodidad y molestias; Dolor, lesiones y enfermedades; Expresión del comportamiento normal; Miedo y sufrimiento) se definieron indicadores biológicos, de producción y comportamentales, que fueron evaluados en cada caja. A cada uno se le asignó un valor, siendo la escala de 1 a 4 (muy malo, malo, bueno y muy bueno respectivamente). Se realizó un etograma para la colonia con 30 min de observación/caja (n=26 individuos), tomándose las conductas como indicadores comportamentales. La valoración en base a las 5 libertades promedió 3,9 puntos para la colonia. Las conductas visibles con mayor frecuencia de aparición fueron: erguirse 16%, acercarse 17%, excavar 13% (comportamientos exploratorios 46%) y grooming 15% (comportamientos de mantenimiento 28%), las cuales son muy importantes en el repertorio natural de la especie y se encuentran bien representadas en estos ejemplares. Podemos concluir que estos animales presentan un muy buen grado de bienestar. Esto es determinante para obtener un individuo sano y con las condiciones necesarias para obtener resultados válidos y confiables en la investigación, realizando un manejo responsable y ético de los animales de experimentación.

### 331. (487) VARIACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN DE COMPONENTES GLICOSILADOS EN EL OVARIO DE RATAS CON ENFERMEDAD QUISTICA OVÁRICA INDUCIDA.

Salvetti N.<sup>1</sup>; Barbeito C.<sup>2</sup>; Panzani C.<sup>3</sup>; Gimeno E.<sup>4</sup>; Ortega H.<sup>5</sup>  
Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL, CONICET<sup>1,3,5</sup>; Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP. CONICET<sup>2,4</sup>  
salvetti@fcv.unl.edu.ar

Numerosos modelos experimentales en diferentes especies se han desarrollado para el estudio del síndrome ovárico poliquístico. En el presente estudio se utilizó un modelo de inducción de ovarios poliquísticos en ratas mediante la exposición a una luz constante. Para el estudio de la distribución y variaciones de los residuos glicosilados presentes en las distintas estructuras ováricas se utilizaron 7 lectinas biotiniladas (CON-A, WGA, DBA, SBA, PNA, RCA y UEA-I) sobre cortes histológicos y la detección se realizó mediante el método extravidina-peroxidasa/diaminobencidina. Pudo observarse un incremento en la afinidad por CON-A en la granulosa y teca interna de los folículos en crecimiento y quistes del grupo de animales con ovarios poliquísticos en relación al grupo control. Los quistes foliculares mostraron mayor afinidad por WGA y RCA-I que los folículos en crecimiento del mismo grupo y hubo una disminución en la afinidad por PNA en los quistes en relación a los folículos en crecimiento de ambos grupos. En todos los casos, los folículos atrésicos mostraron mayor marcación con las lectinas PNA, SBA y RCA-I en relación a los folículos sanos. Se determinó también que la zona pelúcida de los folículos quísticos perdió la afinidad por la lectina CON-A. No se observó marcación en los folículos de ninguna categoría con las lectinas DBA y UEA-I, aunque hubo marcación en el cuerpo lúteo (del grupo control), y en el mesotelio y las glándulas intersticiales de ambos grupos con DBA, presentándose afinidad por UEA-I solamente en el mesotelio. Estas observaciones probablemente reflejen alteraciones, asociadas con el desarrollo de quistes, en los glicosaminoglicanos presentes en los distintos compartimientos ováricos o en la glicosilación de componentes celulares imprescindibles para la correcta dinámica folicular.

### 332. (600) MODELOS EXPERIMENTALES PARA ESTUDIAR EFECTOS TÓXICOS DE HIDROCARBUROS POLIAROMÁTICOS SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA

Artilloromina R.<sup>1</sup>; Rubio N.<sup>2</sup>; Biagini-majorel A.<sup>3</sup>; Faletti A.<sup>4</sup>  
CEFYO CONICET; Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,3,4</sup>  
artilloromina@hotmail.com

Los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) producen efectos tóxicos en la salud reproductiva por actuar a través de los re-

ceptores de hidrocarburos aromáticos (AhR). El objetivo de este trabajo fue la elección de un modelo experimental para estudiar el efecto de una exposición diaria del 3-metilcolantreno (3MC), un contaminante ambiental PAH, sobre la maduración sexual de la rata. Para ello se utilizaron 2 modelos experimentales: 1) ratas inmaduras y estimuladas con eCG/hCG; y 2) ratas inmaduras sin estimulación. A ambos grupos se los trató diariamente, a partir del destete, con vehículo o con distintas dosis de 3MC (0.1-1 mg/kg por día) hasta su primera ovulación o ciclo espontáneo, respectivamente. Se determinaron distintos parámetros: peso corporal (Pc) diario, peso ovárico (Pov), apertura vaginal (Av) en el segundo modelo biológico y tasa ovulatoria (Tov) en ambos modelos y determinada por el número de oocitos presentes en oviductos y expresados por rata. En el modelo 1 no se observaron cambios en ninguno de los parámetros mencionados. Sin embargo en el modelo 2 se observó: i) disminución del Pc en las ratas tratadas con la mayor dosis (p<0.05) respecto a los controles; retraso en la Av en las ratas tratadas con 0.1 (día 43±2, p<0.01) y 1 mg/kg (día 42±1, p<0.05) respecto a las ratas controles (día 38±0.5) y una disminución en la Tov en todas las ratas tratadas con 3MC siendo significativo en bajas (1.4±0.7) y altas dosis (2.0±0.8) respecto a las ratas controles (8.7±0.7, ambas con p<0.05). Estos resultados preliminares nos indican que i) la exposición diaria con 3MC durante la pubertad retrasa la maduración sexual de la rata; ii) el tratamiento con gonadotrofinas parece proteger a la rata del efecto tóxico observado del 3MC sobre la maduración sexual, indicando un posible mecanismo de acción de este contaminante; y iii) el modelo experimental 1 no es adecuado para un estudio completo de los efectos del 3MC sobre la función ovárica.

### 333. (130) ESTUDIO COMPARATIVO DE ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL CON DIFERENTES MATERIALES PARA LA FORMACIÓN DE NIDOS EN REPRODUCTORES DE RATONES Y NÚMERO DE HEMBRAS POR CAJA: SU EFECTO EN LA PRODUCTIVIDAD

Maschi F.<sup>1</sup>; Principi G.<sup>2</sup>; Juárez M.<sup>3</sup>; Rogers E.<sup>4</sup>; Corva S.<sup>5</sup>; Carbone C.<sup>6</sup>

Cátedra de Animales de Laboratorio, Bioterio FCV UNLP<sup>1</sup>  
<sup>2,3,4,6</sup>; Departamento de Epizootiología - Curso de Bioestadística - FCV UNLP<sup>5</sup>  
fmaschi@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El uso de enriquecimiento ambiental (EA) en ratones de experimentación es una manera de contribuir con el bienestar de los mismos. Ésta temática presenta argumentos contradictorios acerca de su influencia sobre los resultados de las pruebas. Una manera de realizar EA en la etapa reproductiva, es colocando materiales como: papel, ovillos de hebras de madera entre otros, para la formación de nidos mejorando el bienestar. El objetivo de este trabajo fue estudiar en cuatro líneas de ratones la preferencia entre dos materiales para formar el nido (EA) y el efecto que tiene este factor en la productividad con distinta relación entre hembras y machos por caja. Se utilizaron 3 líneas de ratones (endocriadas): BALB/cJLP, BALB/cAnNLP y C57BL/6JLP; y una línea exocriada LPN:NIH(S)- Fox1nu, SPF, reproductores. Se mantuvieron en las salas acondicionadas, en cajas de acero inox. de 18 x 29 x 13 cm, lecho de viruta de madera, agua y alimento comercial (ad libitum), estériles; aire filtrado (HEPA), 15 renovaciones, temperatura de 22 +/- 2 °C, 30 - 70 % de humedad relativa, y fotoperíodo 14/10 hs. Se controló la productividad durante 6 meses: nacimientos, destetes, y mortalidad. Los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico Stata 11, utilizando un análisis de varianza anidado y con repeticiones para cada una de las variables en estudio. Para las tres variables evaluadas hubo diferencias significativas entre las cuatro líneas (p<0,05), no demostrándose similar situación para el resto de los efectos aleatorios (nido y forma de apareamiento), ni interacción entre los mismos. Se concluyó que ninguno de los materiales empleados tuvo influencia sobre los parámetros de productividad seleccionados, todos los grupos de animales utilizaron en distinta forma los materiales suministrados adaptándolos a sus necesidades. Este trabajo fue aprobado por el CICAL de la FCV UNLP.

## FARMACOLOGÍA 2

**334. (14) PROLONGACIÓN DEL INTERVALO QT INDUCIDA POR DEXTROPROPOXIFENO: ESTUDIO MULTICÉNTRICO PARA DETECTAR SU RELEVANCIA CLÍNICA.**

Keller G.<sup>1</sup>; Alvarez P.<sup>2</sup>; Ponte M.<sup>3</sup>; Sparanochia C.<sup>4</sup>; Di Girolamo G.<sup>5</sup>

Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina (UBA); Departamento de Emergencias, Hospital General de Agudos Donación Francisco J Santojanni<sup>1</sup>; División Cardiología, Hospital de Clínicas José de San Martín, Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina (UBA)<sup>2</sup>; Departamento de Medicina Interna, Hospital General de Agudos Dr Cosme Argerich, Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina (UBA)<sup>3</sup>; División Cardiología, Hospital Militar de Campo de Mayo<sup>4</sup>; Unidad de Farmacovigilancia, Segunda Cátedra de Farmacología, Facultad de Medicina (UBA)<sup>5</sup> guillermokeller@gmail.com

**INTRODUCCIÓN:** La prolongación del intervalo QT por dextropropoxifeno es un tema de debate actual. El propósito de este estudio fue determinar su prevalencia y relevancia en la práctica clínica cotidiana. **MÉTODOS:** Se incluyeron pacientes ingresados en forma consecutiva a 4 hospitales. Se realizó ECG basal, durante el tratamiento y luego del mismo de pacientes que recibieran dextropropoxifeno. El QT fue cuantificado en mseg y corregido por fórmula de Bazet. **RESULTADOS:** Se evaluaron 112 pacientes (60% hombres) con una media (rango) de edad de 50 años (19-90). Todos los pacientes recibieron una dosis diaria promedio de 162 mg de dextropropoxifeno (50-196 mg) durante 2.8 días (1-12 días). El ECG basal mostró valores medios (DS, Rango) de RR' 808 mseg (191, 320-1120), FC 77 lpm (18, 53-130), QT 383 mseg (46, 260-460), y QTc 429 (20, 60-509). En tratamiento: RR' 792 mseg (121, 500-1100), FC 76 lpm (11, 55-115), QT 388 mseg (30, 320-480), y QTc 437 mseg (24, 341-536). Luego de 72 horas del mismo: RR' 786 mseg (119, 600-1100), FC 78 lpm (11, 61-100), QT 376 mseg (30, 320-440), y QTc 425 mseg (16, 341-471). La comparación de los valores de QT basal e intratratamiento no mostró diferencias significativas, mientras que durante y post-tratamiento mostró una reducción ( $p < 0.001$ ) de 388 a 376 mseg. Los QTc basal versus intratratamiento mostraron aumento ( $p < 0.001$ ) de 429 a 437 mseg, mientras que los QTc post-tratamiento mostraron una reducción ( $p < 0.01$ ) respecto al período de tratamiento, de 437 a 425 mseg. 16 individuos presentaron QTc  $> 450$  mseg. El intervalo QTc durante el tratamiento se mostró  $+8$  mseg (25,  $-106$  to  $+123$ ) superior al basal. No se registraron eventos adversos. **DISCUSIÓN:** Estos resultados apoyan que si bien el dextropropoxifeno posee una leve tendencia a prolongar el QTc ( $+8 \pm 4$  mseg), este efecto no tiene relevancia clínica a las dosis utilizadas en la práctica clínica cotidiana en Argentina.

**335. (161) ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD VASORELAJANTE DEL EXTRACTO ACUOSO DE ARTEMISIA COPA PHIL. (COMPOSITAE) Y DE SUS COMPUESTOS AISLADOS**

Morucci F.<sup>1</sup>; Moscatelli V.<sup>2</sup>; Ferraro G.<sup>3</sup>; Gorzalczany S.<sup>4</sup>  
Cátedra de Farmacología<sup>1,4</sup>; Cátedra de Farmacognosia<sup>2,3</sup>  
sgorza@ffyub.uba.ar

Artemisia copa (AC) Phil. (Compositae), comúnmente conocida como "copa-copa", crece en el noroeste de la Argentina y norte de Chile. Es utilizada en medicina popular como antitusivo, analgésico, digestivo, febrífugo y para el tratamiento de enfermedades pulmonares e hipertensión. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los potenciales efectos vasodilatadores del extracto acuoso de AC y dos de sus compuestos (luteolina y criseriol). La infusión se preparó con las partes aéreas secadas, molidas y procesadas de acuerdo a la Farmacopea Argentina VI Ed. Se evaluó la actividad del extracto y los compuestos en anillos aislados de aorta torácica de rata, sumergidos en una solución nutritiva a 37 °C y burbujeada con carbógeno, registrándose los cambios de tensión inducidos por diferentes agentes vasoactivos. El extracto no modificó la tensión

basal de la aorta. En anillos precontraídos con fenilefrina 0.1 µM, el extracto (0.5- 3 mg/ml) produjo un efecto vasorelajante, obteniéndose una relajación máxima (90%) a una concentración de 2.5 mg/ml del extracto en el baño de órgano aislado. La incubación previa de los anillos con indometacina 10 µM, TEA 10 mM y glibenclamida 100 µM no alteraron la respuesta del extracto, sin embargo la presencia de I-NAME 20 µM modificó el efecto observado con AC. Tanto el extracto (0.3-3 mg/ml) como la luteolina y el criseriol (15 y 30 µg/ml) inhiben de manera no competitiva la curva concentración respuesta al CaCl<sub>2</sub> (100 µM – 0.3 M), reduciendo significativamente la respuesta máxima de manera concentración dependiente. La curva de noradrenalina en presencia y en ausencia del extracto en un medio libre de calcio permite observar el efecto inducido por el extracto en los canales de calcio del retículo endoplásmico. En conclusión, las propiedades vasorelajantes inducidas por AC podrían estar mediadas por el NO y por un bloqueo de los canales de calcio. Luteolina y criseriol podrían ser los responsables, al menos en parte, del efecto observado con el extracto.

**336. (201) SELECCIÓN DE GENES DE REFERENCIA (GR) PARA LA DETERMINACIÓN DE MICROARNs HEPÁTICOS POR REAL TIME PCR CUANTITATIVA EN MODELOS DE HEPATOTOXICIDAD EXPERIMENTAL EN LA RATA**

Lardizábal M.<sup>1</sup>; Nocito A.<sup>2</sup>; Daniele S.<sup>3</sup>; Omella L.<sup>4</sup>; Palatnik J.<sup>5</sup>; Veggi L.<sup>6</sup>

IFISE (UNR-CONICET)<sup>1</sup>; Fac Cs Med (UNR)<sup>2</sup>; Fac Cs Bioq y Farm (UNR)<sup>3</sup>; CIFASIS (CONICET)<sup>4</sup>; IBR (UNR-CONICET)<sup>5</sup>; IFISE (UNR-CONICET), Fac Cs Bioq y Farm (UNR)<sup>6</sup>  
mnlardizabal@yahoo.com.ar

La hepatotoxicidad es una patología que involucra un daño al hígado debido a la exposición a un xenobiótico. La respuesta a este daño se manifiesta en una importante alteración del patrón de expresión génica celular. Los microARNs (miRs) son moléculas de ARN pequeñas (21-23 nt) no codificantes que regulan negativamente la expresión génica a nivel post-transcripcional. La evaluación de la participación de los miRs en los fenómenos de hepatotoxicidad implica contar con una técnica adecuada de medición de la expresión génica. La técnica de referencia para la determinación de miRs es la Stem-Loop Real Time qPCR, la cual requiere normalizar los resultados respecto a un gen endógeno de expresión estable en los grupos en estudio. El objetivo del trabajo fue seleccionar, a partir de un conjunto de potenciales GR (5S, U6, miR-16, miR-Let7a y RNU48), aquellos que se expresan más establemente en modelos de hepatotoxicidad en la rata. Para ello, se estudió la expresión de los genes en hígados de ratas tratadas con tioacetamida (i.p.; 0, 10, 50, 150 mg/kg; n=8), tetracloruro de carbono (i.p.; 0, 0.1, 0.4, 0.7 ml/kg, n=8), acetaminofeno (i.p.; 0, 0.5, 0.75, 1, 2 g/kg, n=10) y D-galactosamina (i.p.; 0, 0.2, 0.5, 0.9 g/kg, n=8) y sacrificadas a las 24 hs. Se determinaron los niveles de marcadores séricos de daño hepático (ALT/AST) y se realizaron estudios anatomo-patológicos para corroborar los modelos experimentales establecidos. Se extrajo el ARN hepático total, sobre el cual se midieron los niveles de expresión de los GR candidatos mediante Stem Loop RT-qPCR. Se corroboró la no existencia de diferencias de expresión estadísticamente significativas entre grupos controles y tratados con los hepatotóxicos. Posteriormente, se emplearon las aplicaciones GeNorm y NormFinder para identificar los genes de expresión más estable, resultando los genes 5S y miR-16 como los más adecuados para la normalización de la expresión génica de miRs en los modelos de hepatotoxicidad establecidos.

**337. (231) POLIFENOLES PRESENTES EN ACEITE DE OLIVA PROMUEVEN LA MINERALIZACIÓN ÓSEA EN EL PEZ CEBRA (DANIO RERIO)**

Barrio D.<sup>1</sup>

Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente, UNRN<sup>1</sup>  
drbarrio@gmail.com

La osteoporosis es una enfermedad muy frecuente caracterizada por una disminución de la masa ósea. En algunas regiones se asocia la baja incidencia de esta enfermedad con el consumo de

vegetales, infusiones de hierbas y el uso de aceite de oliva en las comidas. El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial efecto anabólico de un extracto de aceite de oliva rico en polifenoles (EPF) sobre la mineralización ósea en un modelo de pez cebra (Danio rerio). El extracto se obtuvo utilizando una columna Sep-Pak-C18. La identificación y contenido de polifenoles se realizó por HPLC. Peces recién nacidos se trataron 2 días con 20 mM de dexametazona y posteriormente se transfirieron a diferentes posillos con concentraciones crecientes del EPF. Luego de 2 días de incubación con el EPF la mineralización ósea se cuantificó a través de imágenes utilizando la tinción de rojo de alizarina y el software IDL. Paralelamente, se realizó un control donde los peces fueron mantenidos en un medio basal para embriones (E2). La dexametazona inhibió parcialmente la mineralización de los huesos del pez cebra (43 % del control,  $p < 0,05$ ), mientras que la incubación con el EPF revirtió el efecto inhibitorio del glucocorticoide. La máxima estimulación de la mineralización ósea inducida por el EPF se observó a 0,5 mg / mL (162 % del control,  $p < 0,02$ ; N = 30). En conclusión los polifenoles de oliva promoverían la mineralización de los huesos del pez cebra. El aceite de oliva podría ser un potencial alimento funcional para contribuir a prevenir enfermedades óseas como la osteoporosis.

**338. (314) CAMBIOS COMPORTAMENTALES: "EFECTO DE LOS COMPLEJOS DENDRÍMERO-RISPERIDONA SOBRE LA EXPLORACIÓN Y LA ANSIEDAD DE RATONES SANOS"**

Del Rio Zabala N.<sup>1</sup>; Marotta H.<sup>2</sup>; Alonso S.<sup>3</sup>; Prieto M.<sup>4</sup>  
*Universidad Nacional de Quilmes, Laboratorio de Biomembranas<sup>1 2 3 4</sup>*  
*nahueldrz@gmail.com*

El autismo es un trastorno grave de la infancia que se caracteriza por alteraciones en la comunicación recíproca, socialización, conductas repetitivas, monótonas e intereses restringidos. La risperidona (RSP) es uno de los antipsicóticos más utilizados. Sin embargo, debido a la metabolización y entrega no dirigida a distintos tejidos y órganos presenta efectos colaterales. Los dendrímeros (D) son polímeros sintéticos ramificados presentan un rango controlado nanométrico y alta solubilidad en medio acuoso. El presente trabajo plantea el desarrollo de complejos Dendrimeros- Risperidona (D-RSP) como sistema de liberación controlada para mejorar el tratamiento convencional utilizado para autismo, disminuyendo la interacción con proteínas plasmáticas, con su consecuente metabolización y efectos colaterales. En particular se busca estudiar los cambios comportamentales de los complejos en comparación con la droga libre, utilizando ratones sanos como modelo animal. Se administró vía oral 4 lotes de ratones sanos con las siguientes formulaciones: i) Control PBS, ii) Control D, iii) RSP libre y iv) Complejos D-RSP. A los 60' de la administración se les realizó la secuencia de "tests" y se repitieron luego de un tratamiento crónico (8 días). Tests realizados: Ensayo de laberinto en cruz elevada (mide el conflicto entre la exploración y la tendencia a evitar un espacio abierto e iluminado); ensayo de retorno en laberinto en cruz elevada; ensayo de locomoción; ensayo de interacción social y formación de nido. Estos estudios permiten determinar la actividad locomotora, la ansiedad y la interacción social de los animales tratados. Se observó que los animales administrados con D-RSP mostraron menor exploración en campo abierto comparado con los tratados con RSP. En los ensayos de cruz elevada los animales administrados con D-RSP comparados con los RSP, ocupaban mayor tiempo en el brazo abierto indicando que se encuentran menos ansiosos, ya que presentan conducta exploratoria.

**339. (409) ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA DE COMPLEJOS DENDRÍMERO-RISPERIDONA COMO POSIBLE TRATAMIENTO PARA AUTISMO**

Marotta C.<sup>1</sup>; Del Rio Zabala N.<sup>2</sup>; Alonso S.<sup>3</sup>; Prieto M.<sup>4</sup>  
*Laboratorio de Biomembranas, UNQ<sup>1 2 3 4</sup>*  
*chmarotta@gmail.com*

El autismo es un trastorno de la infancia que comprende diversas manifestaciones, entre las que se encuentran la incontinencia

emocional, la agresividad y la violencia. La risperidona (Risp) es uno de los antipsicóticos más utilizados, sin embargo, debido a la metabolización y entrega no dirigida, presenta efectos colaterales. El principal metabolito, el 9-OH-risperidona, es farmacológicamente activo, pero produce muchos de los efectos adversos. Los dendrímeros (D) son polímeros sintéticos ramificados y presentan un rango controlado nanométrico y alta solubilidad en medio acuoso. De este modo, se parte de la hipótesis de que la incorporación de una droga poco soluble en medios acuosos (risperidona) a polímeros nanométricos (dendrimeros), podría incrementarse su llegada al sitio de acción y lograr un descenso en los efectos colaterales que se producen tanto por la hidrofobicidad de la droga como por su metabolización. En el presente trabajo se desarrollaron complejos Dendrimeros-Risperidona (D-Risp) y se estudió su biodistribución y farmacocinética en animales sanos en contraste con la droga libre luego de su administración oral. Para ello, se administraron los complejos D-Risp así como la Risp libre a ratones sanos, luego se les extrajeron muestras de sangre a diferentes tiempos y se cuantificó la Risp por HPLC. Se observó que la concentración en plasma, en todo momento post-administración, fue significativamente menor para la Risp dendrimerica. Asimismo se cuantificó la cantidad de Risp que llegó a cada órgano y los resultados obtenidos muestran que se encontró la misma cantidad de droga dendrimerica que droga libre (60' y 90'). Ello podría indicar que los dendrímeros funcionarían como "protectores", ya que si bien hay menos droga dendrimerica en circulación se encontró la misma cantidad de droga sin metabolizar en los órganos, pudiendo así, disminuir el 9-OH-Risp que causa varios de los efectos colaterales con la misma cantidad de droga administrada.

**340. (499) POSIBLE ROL DE ANGIOTENSINA II (ANG II) CEREBRAL EN CAMBIOS DURADEROS EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN VASCULAR INDUCIDOS POR EXPOSICIÓN REPETIDA A ANFETAMINA**

Marchese N.<sup>1</sup>; Casarsa B.<sup>2</sup>; Marinzalda M.<sup>3</sup>; Baiardi G.<sup>4</sup>; Bregonzio C.<sup>5</sup>  
*IFEC- CONICET- UNC<sup>1 5</sup>; Laboratorio de Neurofarmacología- Facultad de Ciencias Químicas- UCC<sup>2 3 4</sup>*  
*natimarchese@gmail.com*

El consumo de anfetamina (ANF) y de agentes similares desencadenan alteraciones en la vasculatura que abarcan desde anginitis, necrosis de la lámina media e íntima, infiltración y proliferación de leucocitos hasta daño directo de los vasos, con agregación plaquetaria y permeabilidad vascular aumentada. Ang II no sólo actúa como vasoconstrictor sino que también está involucrado en el evento clave que da inicio al proceso inflamatorio, el aumento de permeabilidad vascular, a través de la liberación de prostaglandinas y factor de crecimiento de endotelio vascular. Además contribuye al reclutamiento de células inflamatorias hacia el tejido conectivo a través de la modulación de la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas. Dado que todos los componentes del sistema renina-angiotensina han sido identificados a nivel cerebral, nos propusimos evaluar la expresión de ICAM-1 y receptores AT1 (R-AT1) en la vasculatura cerebral una semana después de la exposición repetida a ANF. Se usaron ratas Wistar macho (250-320g), en condiciones estándar de laboratorio. Se les administró ANF (2.5mg/kg i.p)/salina durante 5 días, una semana después fueron perfundidos luego de una inyección challenge de ANF (0.5mg/kg i.p) y los cerebros procesados para inmunohistoquímica contra ICAM-1 y R-AT1. A través de microscopía óptica se evaluó la expresión de estos marcadores en las arterias del Polígono de Willis y en vasos de menor calibre. Se observó un aumento en la expresión de ICAM-1 y R-AT1 en arteria cerebral anterior, media y posterior, así como también en la vasculatura cerebral de menor calibre. Nuestros resultados dan indicios de la participación de Ang II en cambios duraderos en el proceso de inflamación vascular por exposición repetida a ANF.

**341. (567) CÁLCULO DE LAS CONSTANTES FARMACOCINÉTICAS DE LEVODOPA APLICANDO UN MODELO FARMACOCINÉTICO PBLACIONAL A UN ESTUDIO FARMACOCINÉTICO INTENSIVO**

Niselman A.<sup>1</sup>; Vietri S.<sup>2</sup>; Porta A.<sup>3</sup>; Schaiquevich P.<sup>4</sup>  
FFyB, UBA<sup>1,2,3</sup>; CONICET HOSPITAL GARRAHAN<sup>4</sup>  
vniselman@ffyb.uba.ar

Los estudios farmacocinéticas (PK) se hacen en un entorno clínico controlado, con pocos voluntarios sanos, muestras de sangre frecuentes para obtener la curva de concentración-tiempo. Luego se ajusta por Regresión No Lineal (RNL) una curva para cada voluntario. El conjunto de curvas aporta una muestra de constantes cinéticas, constante de eliminación (Ke), constante de absorción (Ka), clearance (Cl) y se utiliza el promedio y desvío estándar de dicha muestra para estimar la media y desvío poblacionales. Los estudios de farmacocinética poblacionales (PPK) están diseñados para estudiar la droga bajo condiciones terapéuticas de rutina, tomar pocas muestras de sangre en cada paciente, las dosis son móviles y es posible incluir covariables. Luego se aplica el Modelo de Efectos Mixtos No lineal para estimar las constantes cinéticas poblacionales e individuales. Si bien los modelos PPK abarcan un espectro de situaciones más amplio, ajustamos un modelo poblacional a un estudio PK intensivo, a los fines de obtener mejores estimadores de las constantes cinéticas poblacionales. El objetivo ha sido mostrar las ventajas del modelo PPK sobre el PK en la evaluación de las constantes farmacocinéticas de Levodopa. En este estudio experimental se tomaron muestras de sangre a tiempos: 0, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 12 horas en cada uno de 12 voluntarios sanos que recibieron un comprimido de 200 mg de Levodopa y se determinó la concentración plasmática por el método de Wikberg T[a]. Con el enfoque PK obtuvimos: Ka = 8.09 6.33, Ke = 1.02 0.46, Cl = 553.75 111.7. SC. Res = 557500 (suma de cuadrados residual). Con el modelo PPK obtuvimos: Ke = 0.85, Ka = 2.59; Cl = 478.18 0.42 (los desvíos estándar de ka y ke se suponen despreciables) y SC. Res = 646.33. La suma de cuadrados residual del enfoque PPK es considerablemente inferior a la PK. Al considerar simultáneamente todos los datos, el método PPK disminuye el error residual contemplando la aleatoriedad de los parámetros cinéticos. [a] Wikberg T. J. Pharm. Biomed. Anal. (1991) 9:167-176.

#### 342. (576) PATRÓN DE PRESCRIPCIÓN DE PSICOFÁRMACOS EN UNA POBLACIÓN DE ANCIANOS INSTITUCIONALIZADOS

Marzi M.<sup>1</sup>; Diruscio V.<sup>2</sup>; Nuñez M.<sup>3</sup>; Pires M.<sup>4</sup>; Quaglia N.<sup>5</sup>  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR<sup>1</sup>  
<sup>2,4,5</sup>; Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>  
marzimarta58@gmail.com

Introducción: La polimedición y el uso de determinados psicofármacos (PF) aumentan el riesgo de eventos adversos. Objetivo: Describir los patrones de prescripción de psicofármacos en adultos mayores (AM) según edad, sexo y número total de fármacos por paciente (TFP) así como también el uso de medicamentos potencialmente inapropiados (MPI) en ancianos institucionalizados. Métodos: Estudio descriptivo observacional de corte transversal a partir de las prescripciones médicas realizadas entre enero y marzo de 2010, a los ancianos internos en el Hospital Geriátrico Provincial de Rosario. Se utilizaron los criterios de Beers para clasificar los MPI. Resultados: Número de residentes: 179; rango etario: 60-100 años; número promedio de fármacos diarios: 6.0 (SD=2.7). Proporción de pacientes con PF: 75.4% (135/179). No se encontró diferencia de uso según sexo. Los PF más utilizados fueron benzodiazepinas (BZD): 50.8% (91/179), antipsicóticos: 33.5% (60/179) y antiepilépticos 29.6% (53/179). Entre los usuarios de PF, el 67.4% (91/135) tenía prescrita una BZD. Entre los pacientes con un TFP menor a la media, los menores de 80 años presentaron una probabilidad casi 4 veces mayor de uso de BZD que sus pares mayores (OR: 3.75; IC95%: 1.29-10.92). Dentro de los PF utilizados, cinco fueron considerados MPI para uso en AM por estar incluidos en la lista de Beers: tioridazina, diazepam, dextropropoxifeno, fluoxetina y lorazepam a dosis mayores a 3 mg/día y fueron prescritos al 21.5% (29/135) de los pacientes con fármacos psicotrópicos. Conclusión: Como se ha reportado, la prevalencia de MPI se relaciona con el uso de PF mientras que el patrón de prescripción de estos últimos es

diferente, predominando en esta población la utilización de BZD. Se requieren estudios adicionales para evaluar los factores asociados a la prescripción de MPI y a la mayor utilización de BZD en la subpoblación más joven y con menor número de fármacos.

#### 343. (609) PRESCRIPCIÓN DE MEDICAMENTOS POTENCIALMENTE INAPROPIADOS EN ADULTOS MAYORES. APLICACIÓN DE UN MODELO MATEMÁTICO

Diruscio V.<sup>1</sup>; Marzi M.<sup>2</sup>; Nuñez M.<sup>3</sup>; Pires M.<sup>4</sup>; Quaglia N.<sup>5</sup>  
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR<sup>1</sup>  
<sup>2,4,5</sup>; Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>  
marzim@express.com.ar

Introducción: En trabajos previos describimos la utilización de fármacos en ancianos institucionalizados mediante la implementación de 5 indicadores de calidad para tal fin. Estos son: interacciones de tipo C y/o D, duplicación de drogas, benzodiazepinas de vida media larga, utilización de tres o más psicofármacos, drogas con acción anticolinérgica. La presencia de al menos uno de ellos constituye una prescripción de medicación potencialmente inapropiada (MPI). Objetivo: Evaluar la probabilidad de prescribir una MPI en adultos mayores (AM) considerando variables como edad, sexo y número total de fármacos usados por paciente (TFP) mediante la construcción de un modelo estadístico apropiado. Métodos: Estudio observacional de corte transversal a partir de las prescripciones médicas realizadas entre enero y marzo de 2010, a los AM internos en el Hospital Geriátrico Provincial de Rosario, de referencia en la provincia de Santa Fe. Se aplicaron los indicadores de calidad estudiados para MPI, se realizó análisis bivariado y se ajustó un modelo de regresión logística binaria. Software utilizado: SPSS 17.0. Resultados: Número de residentes: 179; edad media: 76.7 años (SEM=0.6); número promedio de fármacos diarios: 6.0 (SEM=0.2). El modelo de regresión logística obtenido fue:  $p(\text{indicador.MPI}) = 1 / (1 + \exp(0.028\text{edad} - 0.715\text{TFP}))$ . Se probó el ajuste global del modelo a través del test de Hosmer y Lemeshow:  $\chi^2$  cuadrado = 10.92;  $gl = 8$ ;  $p = 0.203$ ; como medida de resumen:  $R^2$  de Nagelkerke = 0.67. Conclusión: Se evidencia que al aumentar en una unidad la cantidad de fármacos la probabilidad de tener una prescripción de MPI respecto de no tenerla es aproximadamente el doble; contrariamente a lo esperado, por cada 10 años de incremento en la edad, dicha razón se reduce aproximadamente en un 25%. Este trabajo ofrece elementos adicionales para contribuir a mejorar el conocimiento de la problemática relacionada a la presencia de MPI en AM. Se requieren futuros estudios para profundizar su abordaje.

## NEUROCIENCIAS 4

#### 344 (276) ALTERACIONES RETINIANAS TEMPRANAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2 CARACTERIZADO POR HIPERGLUCEMIA POSTPRANDIAL.

Salido E.<sup>1</sup>; De Zavalía N.<sup>2</sup>; Silberman D.<sup>3</sup>; Schreier L.<sup>4</sup>; Arias P.<sup>5</sup>; Rosenstein R.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFYBO, CONICET<sup>1,2,3,4,5,6</sup>  
ezequielsalido@yahoo.com

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia crónica debida a una resistencia celular a los efectos de la insulina, combinada con la secreción deficiente de esta hormona. La retinopatía es una de las complicaciones microvasculares características de la diabetes. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de retinopatía diabética de tipo 2 en ratas adultas mediante la inducción de resistencia periférica a la insulina a través de la manipulación dietaria y una lesión pancreática moderada. Ratas Wistar macho adultas fueron divididas en los siguientes grupos: grupo 1: animales con dieta normal y sin STZ. grupo 2: animales con dieta rica en sacarosa (30% en el agua de bebida) y sin STZ. grupo 3: animales con dieta normal e inyección de STZ (25 mg/kg). grupo 4: animales con dieta rica en sacarosa e inyección de STZ. La inyección i.p.

de vehículo o STZ se realizó a las 3 semanas del inicio del experimento. A las 6 y 12 semanas de tratamiento, animales del grupo 4 mostraron alteraciones metabólicas significativas, particularmente un aumento significativo en los niveles de fructosamina, y en la hiperglucemia nocturna interprandial ( $p < 0.01$ ) respecto a los otros grupos. A 12 semanas, se observó una disminución significativa en las amplitudes de la onda a y b del electroretinograma ( $p < 0.05$ ) y de los potenciales oscilatorios ( $p < 0.01$ ) en el grupo 4. En este grupo se observó la presencia de un marcador de daño retiniano (la proteína glial fibrilar ácida en procesos de células de Müller) y un aumento en la inmunorreactividad para VEGF que no fue evidente en los otros grupos. La peroxidación lipídica y la actividad de NOS retiniana aumentaron significativamente sólo en el grupo 4 ( $p < 0.01$ ). Estos resultados indican que la combinación de una dieta rica en sacarosa y una lesión pancreática parcial reproduce alteraciones retinianas compatibles con etapas tempranas de la retinopatía diabética de tipo 2.

**345. (63) ENSAYO DE DIFERENTES DOSIS DE NORETINDRONA IN VIVO EN UN MODELO DE ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA (ELA), EL RATÓN WOBBLER (WR)**

Gargiulo Monachelli G.<sup>1</sup>; Meyer M.<sup>2</sup>; Lima A.<sup>3</sup>; Roig P.<sup>4</sup>; Sica R.<sup>5</sup>; De Nicola A.<sup>6</sup>; Gonzalez Deniselle M.<sup>7</sup>

IBYME, Servicio de Neurología, Hospital Ramos Mejía<sup>1</sup>; IBYME<sup>2,3,4</sup>; Secretaría de Ciencia y Técnica, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>; IBYME, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UBA<sup>6,7</sup>  
gisella.marianag@gmail.com

Progesterona (PROG) disminuye la patología neuronal y mejora la fuerza muscular en el ratón Wr. Actúa por: 1- receptor clásico PR, 2- de membrana mPR y 3- por metabolización a derivados reducidos. Noretindrona acetato (NOR) es una progestina sintética con acción sobre PR y estructuralmente relacionada a testosterona. Objetivo: establecer si NOR ejerce neuroprotección en el ratón Wr. Se utilizaron ratones control y Wr no tratados y Wr tratados con pellet s.c de PROG (20mg), NOR1 (1mg), y NOR4 (4mg) x 15 ó 60 días. Tratamiento con NOR4 se discontinuó por alta mortalidad. Se cuantificaron neuronas vacuoladas/área y, por inmunohistoquímica la expresión de colina-acetil transferasa (ChAT), marcador de neuronas colinérgicas, la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) y CC1, marcadores de astrocitos reactivos y oligodendrocitos respectivamente. Se evaluó semanalmente peso corporal, atrofia de manos y fuerza muscular a 60 días. Análisis estadístico: ANOVA/Newman-Keuls y ANOVA medidas repetitivas. A 15 días, NOR1 y PROG restauraron niveles de ChAT (336.4 neuronas/mm<sup>2</sup>±18.93; 322.7±26.7 vs Wr:224±20.82;  $p < 0.01$  respectivamente) y redujeron neuronas vacuoladas: 63% ( $p < 0.05$ ) y 39% ( $p < 0.05$ ) en Wr. GFAP, elevada en Wr, descendió x PROG y aún más x NOR1 (PROG:318±25.68 células/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ; NOR1:208±15,  $p < 0.001$  vs Wr:390±22.4); mientras que CC1, bajo en Wr, aumentó x tratamiento hormonal (haz corticoespinal:  $p < 0.05$  y asta anterior:  $p < 0.01$ ). Peso, atrofia y fuerza favorecieron a PROG; NOR1 empeoró marcadamente los 2 primeros (NOR1 vs Wr: peso  $p < 0.01$  y atrofia  $p < 0.001$ ). Conclusión: La mayor progresión de la enfermedad por NOR1 podría depender de su claro efecto depresor de astrocitos. PR podría mediar efectos neuronales y mPR y/o derivados reducidos mediar efectos gliales y funcionales. El deterioro clínico por NOR1 podría deberse a una acción colateral sobre receptor de andrógenos y/o glucocorticoides. Estudios futuros deberán dilucidar la efectividad de menores dosis de NOR.

**346. (489) MECANISMO DE ACCIÓN DE LA TRANSFERRINA EN LAS CÉLULAS OLIGODENDROGLIALES. TRADUCCIÓN DE SEÑALES Y MADURACIÓN OLIGODENDROGLIAL.**

Pérez M.<sup>1</sup>; Fernandez N.<sup>2</sup>; Pasquini J.<sup>3</sup>

IQUIFIB-CONICET, FFyB, UBA<sup>1,3</sup>; Cát de Química Medicinal, FFyB, UBA<sup>2</sup>  
mjperetz@ffybu.uba.ar

La transferrina (Tf) es una glicoproteína transportadora de hierro. En nuestro laboratorio se ha estudiado intensamente el

efecto de la aTf en el SNC en los procesos de mielinización, hipomielinización y remielinización. Es de interés describir el mecanismo celular por el cual actúa la aTf en las células oligodendrogliales. Hemos estudiado la activación de las vías de señalización de Fyn tirosina quinasa, seguido de la participación de Akt y ERK en el tratamiento con aTf en cultivos primarios de precursores oligodendrogliales (OPC). También hemos analizado la expresión del receptor de Tf (RcTf) en la ontogenia oligodendroglial, observando en OPC una intensa expresión que disminuye en oligodendrocitos maduros. Continuamos el trabajo estudiando la incorporación de aTf en diferentes condiciones. En presencia de inhibidores generales de endocitosis, citocalasina B y 4°C, disminuye la incorporación de aTf. Cuando se transfectaron OPC con pEGFP-C2-Eps15 EH29 un dominante negativo que interfiere con la endocitosis dependiente de clatrina, se observó una exacerbación en la activación de Fyn. En estudios en presencia de Filipin, un inhibidor farmacológico de la endocitosis dependiente de colesterol, se pierde por completo dicha activación. Describimos la participación del RcTf y caracterizamos si las vías de señalización que activa la Tf posterior a su internalización es mediada por el RcTf1 o RcTf2. El tratamiento con Tf evidencia un efecto madurativo de los OPC en cultivo, observado por el incremento de MBP, y el mismo se asocia con una activación las vías de señalización del PI3K y MAPK. La incorporación de Tf no depende de la participación de las señales intracelulares, ni de la endocitosis mediada por clatrina. La endocitosis de la Tf es dependiente del colesterol, acorde con la localización del RcTf2 en los microdominios ricos en dicho lípido.

**347. (552) ENTROPÍA APROXIMADA, MUESTRAL Y DIFUSA: TRES INDICADORES DE DINÁMICA NO LINEAL APLICADOS AL ANÁLISIS DE VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA RESPIRATORIA EN DISTINTOS ESTADOS EMOCIONALES**

Vigo D.<sup>1</sup>; Vleminx E.<sup>2</sup>; Van Diest I.<sup>3</sup>; Van Den Bergh O.<sup>4</sup>  
Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, Department of Psychology, University of Leuven, CONICET<sup>1</sup>; Department of Psychology, University of Leuven<sup>2,3,4</sup>  
dvigo1973@gmail.com

Introducción: distintos estados emocionales se asocian a modificaciones en la variabilidad de la frecuencia respiratoria (VFR). Sin embargo, la dinámica no lineal subyacente a la VFR ante cambios emocionales no ha sido estudiada. Objetivo: cuantificar cambios en la dinámica no lineal de la VFR en reposo, en una situación de preocupación y en una situación de relajación. Diseño del estudio: se analizó una muestra de 37 sujetos a quienes, luego de un periodo de reposo, se los indujo en forma contrabalanceada a adquirir un estado de "relajación" (concentrándose en su estado respiratorio actual) seguido de un estado de "preocupación" (reflexionando acerca de preocupaciones en seis dominios distintos), todos de ocho minutos de duración. Se determinaron parámetros respiratorios en forma continua mediante pletismografía. Se utilizaron los indicadores de Entropía Aproximada (ApEn), Muestral (SampEn) y Difusa (FuzzyEn) para cuantificar el grado de aleatoriedad de la VFR. Se evaluaron diferencias a través de un análisis ANOVA de medidas repetidas seguido de un test post hoc de Bonferroni. Resultados: el indicador SampEn reveló diferencias significativas globales entre los tres estados ( $F = 3.39$ ,  $p = 0.039$ ). En particular, el estado de "relajación" se asoció con un mayor valor de SampEn que el estado de "preocupación" ( $p = 0.034$ ). Conclusiones: el estado de "relajación" se asoció a un mayor grado de aleatoriedad de la VFR. Esto sugiere que, en este estado, perturbaciones transitorias de la función respiratoria están seguidas de cambios poco acotados, apuntando a que el controlador respiratorio no se basa en información pasada para determinar la duración del ciclo respiratorio en un momento dado.

**348. (580) PAPEL DE LOS ASTROCITOS EN LA EPILEPSIA: EFECTOS DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR DE TROMBOSPONDINA ALFA2DELTA-1 INVOLUCRADO EN LA SINAPTOGÉNESIS**

Rossi A.<sup>1</sup>; Angelo M.<sup>2</sup>; Villarreal A.<sup>3</sup>; Lukin J.<sup>4</sup>; Reines A.<sup>5</sup>; Ramos A.<sup>6</sup>  
*Instituto de Neuropatología Molecular, IBCN, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
*ivanhoe\_rowena@hotmail.com*

La epilepsia del lóbulo temporal (TLE) se caracteriza por una injuria inicial, un periodo de latencia (PL) y frecuente esclerosis del hipocampo con pérdida neuronal y gliosis reactiva. La base fisiológica de la TLE sería la aparición de conexiones sinápticas espurias. Se ha demostrado que los astrocitos inducen sinaptogénesis durante el desarrollo a través de la secreción de trombospondina (TSP). En este trabajo estudiamos los cambios que ocurren durante el PL y el papel de TSP bloqueando su receptor  $\alpha 2\delta 1$  con el antagonista Gabapentina (Gp). Utilizamos el modelo animal de Li-Pilocarpina que induce status epiléptico (SE) y reproduce las características de las TLE. Ratas Wistar recibieron 3 mEq/Kg de LiCl y 20h después 30mg/Kg de Pilo. A los 40 min de la administración, los animales presentaron SE que se abortó 15 min después con Diazepam. Luego los animales recibieron Gp 400 mg/Kg o solución salina por 15 días, y los cerebros se procesaron para inmunocitoquímica. En otra serie de experimentos se expusieron cultivos primarios de astrocitos a niveles excitotóxicos de glutamato (Glut) en presencia o ausencia de Gp (5, 25, 50 o 100  $\mu$ g/ml). Los animales SE mostraron alteraciones hipocámpales incluyendo gliosis reactiva, neuronas en degeneración, alteraciones en la marcación para Sinaptofisina (Syn) y aumento de la expresión de PSA-NCAM. La administración de Gp mejoró el patrón morfológico de Syn y PSA-NCAM pero aumentó la gliosis reactiva y no cambió significativamente la degeneración neuronal. La aplicación de Gp en cultivos primarios de glia potenció la gliosis reactiva en astrocitos expuestos a Glut pero no en astrocitos naive. Nuestros resultados muestran que la aplicación de Gp durante el PL disminuye las alteraciones sinápticas y la exacerbada plasticidad observada luego del SE probablemente por el bloqueo de los receptores neuronales  $\alpha 2\delta 1$ . Esto ocurre conjuntamente con un aumento de la gliosis reactiva, donde Gp parece potenciar la respuesta glial a la excitotoxicidad.

#### 349. (166) PLASTICIDAD DE RECEPTORES IONOTRÓPICOS DE GABA EN LINFOCITOS

Dionisio L.<sup>1</sup>; Bouzat C.<sup>2</sup>; Esandi M.<sup>3</sup>  
*INIBIBB<sup>1</sup>; Laboratorio de Neurofisiología y Farmacología Molecular - INIBIBB<sup>2 3</sup>*  
*ldionisio@criba.edu.ar*

La plasticidad de receptores neuronales se refiere al proceso por el cual los receptores modifican su composición y función en respuesta a diferentes estímulos. Nuestro grupo ha descrito la presencia de receptores ionotrópicos de GABA funcionales en linfocitos humanos de sangre periférica (Dionisio et al., 2011). En este trabajo evaluamos si el fenómeno de plasticidad ocurre también para los receptores presentes en células del sistema inmune. Utilizando RT-PCR se determinó la expresión de subunidades de receptores ionotrópicos de GABA en células Jurkat, derivadas de linfocitos T humanos. Se detectó ARNm correspondiente a las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 2$  y  $\rho 2$ . Para inducir plasticidad se incubó las células Jurkat con 100  $\mu$ M GABA y luego de 15 y 40 hs de exposición se realizó una cuantificación relativa del nivel de expresión de las subunidades mediante PCR en tiempo real. La expresión de  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$  y  $\rho 2$  aumentó significativamente luego de 15 hs de incubación con GABA mientras que disminuyó a las 40 hs (n=3). La expresión de  $\delta$  no se modificó. El aumento de ARNm de  $\alpha 1$  a las 15 hs de exposición se correlacionó con un aumento de la subunidad  $\alpha 1$  determinada por Western Blot. De la misma manera, se detectó AKT activada luego de 15 hs de exposición a GABA, sugiriendo que la vía de AKT participa de la fosforilación de subunidades, hecho involucrado en la plasticidad neuronal. Finalmente, utilizando la técnica de patch clamp se detectó un mayor porcentaje de células que responden a la aplicación de GABA. Así, de 50 células evaluadas por condición, el 6% exhibió corrientes macroscópicas antes de la incubación con GABA, y el 21% y 8% luego de 15 hs y 40 hs de incubación respectivamente.

Estos resultados indican que los cambios en ARNm se acompañan por cambios funcionales. Concluimos que los receptores de GABA presentes en linfocitos exhiben plasticidad similar a los receptores neuronales, y que esta propiedad podría ser importante en la modulación de la respuesta inmune.

#### 350. (333) EFECTO PROTECTOR DE LA HIPOTERMIA SOBRE LA ANGIOGÉNESIS Y GLIOSIS EN UN MODELO DE RETINOPATÍA DEL PREMATURO.

Rey-funes M.<sup>1</sup>; Dorfman V.<sup>2</sup>; Ibarra M.<sup>3</sup>; Peña E.<sup>4</sup>; Loidl C.<sup>5</sup>  
*Instituto de Biología Celular y Neurociencia Prof De Robertis, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 3 4 5</sup>; Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y Diagnóstico (CEBBAD), Universidad Maimónides<sup>2</sup>*  
*manuel.reyfunes@gmail.com*

La Retinopatía del Prematuro (ROP) es la principal causa de ceguera en niños. Animales expuestos a asfixia perinatal desarrollan lesiones en la retina consistentes con ROP. Objetivo: estudiar el impacto de hipoxia-isquemia sobre la vascularización y la astrogliosis en la retina y evaluar la hipotermia como tratamiento. Se utilizaron ratas macho (n=5/grupo) de 7, 15, 21 y 30 días de edad expuestas a asfixia perinatal (20 min, 37°C, AP). Se evaluó la neovascularización estudiando la expresión de adrenomedulina (AM) por inmunohistoquímica (IHQ) y Western-Blot (WB), y el número de vasos por histoquímica con lectina de tomate; la respuesta astrogliosis se estudió mediante la expresión de GFAP por IHQ y WB. Se aplicó hipotermia en animales sometidos a asfixia a 15°C (20 min, HIP). Como controles se utilizaron animales nacidos a término (CTL). Se inmunolocalizó AM en procesos internos de las células de Müller y en la retina interna. Mediante WB se observó aumento de la expresión de AM a partir de los 15 días en CTL. AP mostró aumento significativo (s.) de la expresión de AM vs CTL en todas las edades evaluadas (83±3% 7d, 38±6% 15d, 33±4% 21d, 35±6% 30d, p<0,05). El grupo HIP mostró un patrón de expresión de AM similar al CTL. La marcación para GFAP aumentó en el tiempo, siendo positiva en limitante interna y glía perivascular de animales AP de 21 días y extendiéndose hacia los procesos internos de Müller a los 60 días. Estas alteraciones no se evidenciaron en el grupo HIP. Por WB se observó aumento s. de la expresión de GFAP en AP vs CTL desde los 7 días en adelante, con aumento s. a los 15 días (235±8%, p<0,05). El número de vasos de la retina interna mostró aumento s. en AP vs CTL sin variaciones con la edad (AP: 10,5±1,3; CTL: 4,6±1,1 vasos/campo, p<0,01), mientras que HIP no varió respecto al CTL. La AP produce angiogénesis y astrogliosis en la retina interna y la hipotermia resulta protectora siendo capaz de disminuir el daño desencadenado por el efecto hipoxico-isquémico.

#### 351. (67) EL TRATAMIENTO CON 17ALFA-ESTRADIOL REVIerte ANORMALIDADES DEL HIPOCAMPO EN LA RATA ESPONTANEAMENTE HIPERTENSA (SHR)

Pietranera L.<sup>1</sup>; Brocca M.<sup>2</sup>; Roig P.<sup>3</sup>; De Nicola A.<sup>4</sup>  
*IBYME, CONICET, Depto de Bioquímica Humana, Fac de Medicina<sup>1 4</sup>; IBYME, CONICET<sup>2 3</sup>*  
*lucianapietranera@gmail.com*

En trabajos anteriores describimos en un modelo de hipertensión experimental, la rata SHR, cambios hipocámpales tales como disminución de la proliferación en el giro dentado, astrogliosis y menor número de células en el hilio. Estos cambios revierten luego del tratamiento con  $\beta$ -estradiol. El  $\alpha$ -estradiol es un isómero óptico del  $\beta$ -estradiol, pero que actúa con mucho menor potencia sobre los receptores ER (lo que eliminaría sus acciones feminizantes o cancerígenas). Sin embargo, se han descrito acciones neuroprotectoras del  $\alpha$ -estradiol sobre el SNC. Estas acciones estarían mediadas por su acción sobre receptores de membrana como el GABAA o el ERX. El objetivo del presente trabajo fue investigar las posibles acciones neuroprotectoras del  $\alpha$ -estradiol sobre la encefalopatía hipocámpal de la rata SHR. Se utilizaron ratas macho SHR (PA: 180 mmHg) y WKY de 16 semanas de vida los cuales fueron implantados con un pellet conteniendo 800 $\mu$ g  $\alpha$ -estradiol diluido con colesterol o solamente colesterol durante dos semanas. Los

animales se sacrificaron y en sus cerebros se estudiaron: la proliferación celular en el GD medida por la expresión de Ki67 y la reactividad astrocitaria GFAP positiva. El tratamiento con  $\alpha$ -estradiol fue capaz de revertir la disminución de la proliferación celular en el GD en las ratas SHR ( $p < 0.05$  SHR vs WKY y SHR $\alpha$ E2). Las ratas SHR presentan una elevada astrocitosis en todas las zonas del hipocampo. El tratamiento con  $\alpha$ -estradiol fue capaz de revertir de manera parcial la astrocitosis en el área CA1 del hipocampo ( $p < 0.01$ ) y no significativamente el GD del hipocampo. Los resultados muestran el que  $\alpha$ -estradiol es capaz de revertir la disminución en la proliferación celular y la astrocitosis hipocampal de la hipertensión arterial. La importancia del uso de un compuesto que no es feminizante pero que actúa como neuroprotector cerebral radica en que podría ser útil en animales machos, y para evitar los efectos secundarios de los estrógenos en ambos sexos.

## REPRODUCCIÓN 4

### 352. (71) EFECTO DEL ÁCIDO LISOFOSFÁTICO (LPA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (NOS) DURANTE LA IMPLANTACIÓN EN LA RATA. ROL DE LAS PROSTAGLANDINAS (PGS).

Beltrame J.<sup>1</sup>; Sordelli M.<sup>2</sup>; Cella M.<sup>3</sup>; Dmytrenko G.<sup>4</sup>; Franchi A.<sup>5</sup>; Ribeiro M.<sup>6</sup>

Laboratorio de Fisiología y Farmacología de la Reproducción, CEFYBO (CONICET – Fac de Medicina, UBA)<sup>1,2,6</sup>; Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto, CEFYBO (CONICET – Fac de Medicina, UBA)<sup>3,5</sup> CEFYBO (CONICET – Fac de Medicina, UBA)<sup>4</sup> *jimenabeltrame@gmail.com*

La implantación es un paso clave en el establecimiento de la preñez. En este proceso se establece un diálogo en el que participan el trofoblasto, el endometrio y mediadores inflamatorios como citoquinas, óxido nítrico (NO) y PGs. Las ciclooxigenasas (COX-1 y 2) y la PGE2 promueven la vascularización y la decidualización, mientras que la isoforma inducible de la NOS (iNOS) participa en la formación de nuevos vasos y en la regulación de la respuesta inmune. Además, se ha informado que el LPA, un fosfolípido biológicamente activo, juega un rol crítico en múltiples procesos reproductivos. Ratones knock out para los receptores LPA3, uno de los receptores de LPA, presentan serias deficiencias en el proceso de implantación. Nuestro objetivo fue investigar el efecto del LPA sobre la actividad de la NOS durante el proceso de implantación y estudiar si las PGs participan de esta modulación. Para ello, se utilizó como modelo experimental el útero proveniente de hembras Wistar en día 5 de preñez, el día en que ocurre la implantación bajo las condiciones de nuestro bioterio. En base a resultados previos, el útero se incubó con LPA 50  $\mu$ M por 6 hs. La actividad de la NOS se determinó por la técnica de Bredt y Snyder modificada y la producción de PGs por RIA. Observamos que el LPA aumentó la actividad de la NOS ( $p < 0,01$ ) y la producción de PGE2 ( $p < 0,01$ ) a través de los receptores LPA3. La pre-incubación con 1400W (un inhibidor selectivo de iNOS) o con L-NAME (un inhibidor no selectivo de las NOS) revirtió el efecto del LPA sobre la NOS. Por otro lado, la pre-incubación con indometacina (un inhibidor no selectivo de las COXs) o con NS-398 (un inhibidor selectivo de la COX-2) disminuyó la actividad de la NOS hasta niveles similares a los del control. Estos resultados sugieren que el LPA aumentaría la producción de NO a través de la estimulación de la actividad de iNOS y que las PGs producidas por la COX-2 median este efecto.

### 353. (466) LA ANANDAMIDA REGULA DIFERENCIALMENTE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN PLACENTA HUMANA

Aban C.<sup>1</sup>; Cella M.<sup>2</sup>; Damiano A.<sup>3</sup>; Vercelli C.<sup>4</sup>; Leguizamón G.<sup>5</sup>; Franchi A.<sup>6</sup>; Farina M.<sup>7</sup>

CEFYBO - CONICET-UBA<sup>1,2,4,6,7</sup>; Lab de Biol de la Reprod, FFyB-UBA<sup>3</sup>; CEMIC<sup>5</sup> *cyntia\_aban@yahoo.com.ar*

La anandamida (AEA), uno de los principales endocannabinoides, es sintetizada por diversos caminos y degradada por acción

de una hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH). Datos previos han demostrado que la placenta humana produce AEA y que los niveles plasmáticos de este endocannabinoide aumentan en mujeres con trabajo de parto a término. La AEA puede modular la síntesis de óxido nítrico (NO) en diversos tejidos. El NO es un mediador gaseoso sintetizado por la óxido nítrico sintasa (NOS) fundamental en la regulación del flujo sanguíneo feto-placentario. Nuestro objetivo fue evaluar la participación de la AEA en la regulación del sistema nitrérgico en placenta humana al término de la gestación. Para ello utilizamos explantos de vellosidades coriónicas obtenidas de mujeres con embarazos sin complicaciones, luego de cesáreas electivas (STP) o partos vaginales (CTP), a término (38-40 semanas de gestación). Investigamos la expresión proteica por western blot y la localización por inmunohistoquímica de los distintos componentes del sistema endocannabinoide (NAPE-PLD, FAAH, CBs, TRPV-1). Observamos que las placentas STP expresan mayores niveles proteicos y actividad ( $p < 0.05$ ) de la enzima FAAH que las placentas CTP. Luego analizamos el efecto de la AEA sobre la actividad de la NOS por la técnica de Bredt & Snyder. Observamos que un inhibidor de la FAAH (URB-597) estimuló la actividad de la NOS ( $p < 0,01$ ) en placentas STP, al igual que la incubación con AEA (10-7M,  $p < 0,001$ ). Este efecto fue revertido por la co-incubación con AM251 (un antagonista de CB1), así como por capzasepina (un antagonista del receptor TRPV-1). Contrariamente, en placentas CTP, AEA (10-7M) inhibió la actividad de la NOS ( $p < 0,01$ ). Los resultados obtenidos demuestran que el sistema endocannabinoide se expresa diferencialmente en placentas con y sin trabajo de parto y que la AEA sería uno de los factores involucrados en la regulación de la actividad de la NOS al término de la gestación.

### 354. (5) MEDIADORES TRANSCRIPCIONALES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN DE LEPTINA PLACENTARIA INDUCIDA POR ESTRADIOL

Gambino Y.<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>

Dpto Qca Biológica, FCEN, UBA<sup>1,5</sup>; Dpto de Bioqca Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla<sup>2,4</sup>; Dpto Qca Biológica, FCEN, UBA, IByME<sup>3</sup> *yesupao@yahoo.com.ar*

La leptina es una hormona placentaria que tiene un rol fundamental en la fisiología reproductiva. Sin embargo aún no se conoce completamente cómo se regula su expresión en placenta. Resultados previos indican que el estradiol (E2) regula a nivel transcripcional la expresión de leptina placentaria. Este efecto es dosis dependiente y se inhibe en presencia de ICI 182,780. El objetivo de este trabajo fue estudiar posibles mediadores transcripcionales involucrados en la expresión de leptina placentaria, empleando células BeWo como modelo experimental. Ensayos de delecciones seriadas mostraron que la región del promotor de leptina entre -1951 y -1847 pb es necesaria para la acción del E2. Un análisis in silico sugiere la presencia de elementos de unión a ER y Sp1 en esta región. Mediante centrifugación diferencial y Western blot se detectó el receptor ER $\alpha$  en el núcleo y también en la membrana plasmática de células BeWo. El receptor ER $\beta$  fue localizado en la fracción nuclear ( $n=5$ ). Estos resultados fueron corroborados mediante inmunofluorescencia. Ambos receptores son transcripcionalmente activos, ya que en presencia de E2 estimulan la actividad del vector reportero ERE-luc. La sobreexpresión de ER $\alpha$ , pero no la de ER $\beta$ , incrementa 3 veces la actividad del promotor de leptina en presencia de E2 ( $p < 0,01$ ). La disminución de ER $\alpha$  mediada por un siRNA específico disminuye los efectos del E2, indicando que ER $\alpha$  participaría en la expresión de leptina placentaria. Por otra parte, la sobreexpresión de Sp1 incrementa la actividad transcripcional del fragmento del promotor de leptina entre -1951 y -1847 pb. La mutación del posible sitio de unión a Sp1 impide los efectos del E2, sugiriendo la participación de este factor en la expresión de leptina placentaria. En conjunto, estos resultados proveen nuevas evidencias sobre los mecanismos transcripcionales por los cuales el E2 regula la expresión de la leptina en placenta y reafirman la importancia de la leptina en la fisiología placentaria.

### 355. (117) EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SNAP EN OVOCITO DE RATÓN

De Paola M.<sup>1</sup>; Gallo G.<sup>2</sup>; Mayorga L.<sup>3</sup>; Michaut M.<sup>4</sup>  
*Laboratorio de Biología Reproductiva, IHEM-CONICET, Fac Cs Médicas, UNCUYO<sup>1 2 3 4</sup>*  
*matildedp@hotmail.com*

La exocitosis de los gránulos corticales (EGC) constituye el bloqueo primario de la poliespermia. El mecanismo molecular de este proceso no ha sido dilucidado hasta el momento, y sólo se conocen 4 proteínas asociadas al mismo: Rab3A, sintaxina 4, Rabfilina 3 y SNAP-25. Muchas de las familias de proteínas involucradas en fusión vesicular presentan un alto grado de conservación de levaduras a mamíferos, hecho que puede ser interpretado como un indicativo de que la mayoría, sino todos los procesos de fusión de membranas usan la misma maquinaria molecular. Teniendo en cuenta esta premisa, formulamos como hipótesis de trabajo la presencia de las proteínas SNAPS en el ovocito de ratón. Las SNAPS son una familia de proteínas que desempeñan un rol clave en la fusión de membranas. En mamíferos se han descrito tres isoformas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . En ratones *hyh*, cepa que presenta una mutación puntual en el gen de  $\alpha$  SNAP (M105I), se ha verificado que, además de exhibir problemas neurológicos, son estériles. La infertilidad de los machos es debida a que la proteína  $\alpha$  SNAP mutada altera la exocitosis acrosomal. Sin embargo, se desconoce la causa de la infertilidad de las hembras *hyh* y, aún más, se desconoce si SNAP está presente en el ovocito. Con el objetivo de identificar la/s isoforma/s de SNAP presente/s en el ovocito de ratón se realizó RT-PCR. El estudio de la localización subcelular y el análisis de la expresión durante la maduración fueron realizados mediante IFI y WB, utilizando un anticuerpo que reconoce conjuntamente las isoformas  $\alpha/\beta$ . Los resultados muestran que  $\alpha$  y  $\gamma$  SNAP están presentes en ovocitos de ratón, validando nuestra hipótesis de trabajo. Además, la isoforma  $\alpha$  se localiza en la región cortical rica en GC, no presentando diferencias significativas en los niveles de expresión en los distintos estadios celulares analizados. La localización de  $\alpha$  SNAP en la región cortical sugiere que dicha proteína podría estar asociada a los GC, y posiblemente a la EGC.

### 356. (191) ÁCIDO URICO: SU UTILIDAD EN LA DIFERENCIACIÓN DE LAS PATOLOGÍAS HIPERTENSIVAS DEL EMBARAZO

Corominas A.<sup>1</sup>; Balconi S.<sup>2</sup>; Szpilbarg N.<sup>3</sup>; Dietrich V.<sup>4</sup>; Palermo M.<sup>5</sup>; Maskin B.<sup>6</sup>; Damiano A.<sup>7</sup>  
*Hospital Posadas<sup>1 2 5 6</sup>; Lab de Biología de la Reproducción, Cat Biología Celular, Dpto. Cs. Biológicas. FFyB, UBA<sup>3 4 7</sup>*  
*ana\_corominas@yahoo.com.ar*

Antecedentes: El rol del ácido úrico en la patogenia de las patologías hipertensivas del embarazo está actualmente en evaluación. Objetivo: evaluar la utilidad del ácido úrico como marcador de preeclampsia/eclampsia (PE/E) antes de que éstas se manifiesten clínicamente para diferenciar mujeres en riesgo de desarrollarla de aquéllas con hipertensión gestacional (HIE). Métodos: Estudio retrospectivo. A partir del registro de egresos del año 2009, se recabaron los datos de las mujeres que fueron atendidas con problemas de hipertensión en el embarazo, y de embarazos normales pareadas por día de parto. Aprobado por el Comité de Docencia del Hospital. Resultados: se registraron 140 casos de HIE (74 HIE, 56 PE, 5 E y 5 HELLP). En los recién nacidos de las PE/E hubo 25% de retrasos de crecimiento intrauterino y una edad gestacional significativamente menor a las gestas de las controles y de las HIE. El 63% de los nacidos de PE/E fueron pretérmino. Los niveles de ácido úrico antes de la semana 20 de gestación fueron similares ( $2.77 \pm 0.60$  mg/dl) (después de la semana 20 las mujeres con PE/E tuvieron niveles mayores ( $4.49 \pm 1.49$  mg/dl) / ( $4.86 \pm 1.98$  mg/dl) que las mujeres con hipertensión gestacional ( $3.79 \pm 1.08$  mg/dl) y controles ( $3.23 \pm 0.81$  mg/dl). Estos cambios en la uricemia preceden los signos y síntomas de la enfermedad y no pueden atribuirse a patología renal, dado que los niveles de urea y creatinina no presentaron diferencias y las proteinurias fueron negativas hasta que los síntomas clínicos de la PE/E se

manifestaban. Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que un aumento en los niveles de ácido úrico, documentado por dos dosajes secuenciales entre semanas 20 y 30 de gestación, pueden ser útiles para identificar a aquellas embarazadas que están en riesgo de desarrollar PE/E antes de la aparición de los síntomas. El diagnóstico temprano de este síndrome contribuirá a minimizar las complicaciones tanto maternas como fetales.

### 357. (596) EFECTO DEL TNF- $\alpha$ SOBRE LA EXPRESIÓN DE AQP9 EN PLACENTA HUMANA.

Castro Parodi M.<sup>1</sup>; Di Paola M.<sup>2</sup>; Valeria D.<sup>3</sup>; Szpilbarg N.<sup>4</sup>; Farina M.<sup>5</sup>; Damiano A.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular y Molecular, Depto de Ciencias Biológicas, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 6</sup>; CEFyBO - CONICET - UBA<sup>5</sup>*  
*mcastroparodi@gmail.com*

Previamente estudiamos que mujeres con preeclampsia presentaban resistencia a la insulina exagerada e hiperinsulinemia. Además el embarazo normal estimula una respuesta inflamatoria sistémica que se agrava en este síndrome. Citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), están aumentados en preeclampsia y también pueden estar implicados en la resistencia a la insulina de este desorden gestacional. Recientemente, se ha demostrado una regulación negativa a la señalización de la insulina en preeclampsia, asociada con el efecto inhibitor del sustrato receptor de insulina (IRS) -1 y -2 por medio de la fosforilación en residuos de serina. Se propuso que la inactivación del IRS en los tejidos de la placenta de las mujeres con preeclampsia puede ocurrir como consecuencia de la inflamación sistémica a través de TNF- $\alpha$ . Previamente demostramos que la insulina regula negativamente la expresión de AQP9, sin embargo en preeclampsia a pesar de la hiperinsulinemia existe una sobre expresión de esta proteína. Para evaluar si la incapacidad de AQP9 de responder a los estímulos de la insulina en placentas preeclámpticas se relaciona con el aumento de TNF- $\alpha$ , cultivamos explantos de placenta normal en presencia de 100 uUI / mL de insulina. Algunos explantos se incubaron con 5 pg / ml de TNF- $\alpha$  durante 2 horas anteriores al tratamiento de insulina. Para bloquear el efecto de TNF- $\alpha$ , se utilizó 1 mg / ml de etanercept (una proteína de fusión dimérica que imita los efectos inhibidores de los receptores solubles del TNF). Por estudios de Western Blot e Inmunohistoquímica se observó que en los explantos previamente tratados con TNF- $\alpha$ , la insulina fue incapaz de reducir la expresión de AQP9. En el caso de los explantos cultivados con etanercept se observó que el tratamiento con insulina reduce la expresión de AQP9. Nuestros resultados sugieren un papel del TNF- $\alpha$  en el bloqueo de la señalización por insulina en placentas preeclámpticas.

### 358. (631) ROL DE LAS ACUAPORINAS PLACENTARIAS DURANTE LA APOPTOSIS Y SU POSIBLE IMPLICANCIA EN LA PREECLAMPSIA

Valeria D.<sup>1</sup>; Szpilbarg N.<sup>2</sup>; Castro-parodi M.<sup>3</sup>; Maskin B.<sup>4</sup>; Zotta E.<sup>5</sup>; Damiano A.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular y Molecular, Depto de Ciencias Biológicas, FFyB, UBA<sup>1 2 3 6</sup>; Hospital Nacional "Dr. Prof. Alejandro Posadas"<sup>4</sup>; Lab de Fisiopatología, Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>5</sup>*  
*vale\_dietrich@hotmail.com*

La preeclampsia (PE) se caracteriza por una migración limitada del trofoblasto y una invasión reducida de las arterias espiraladas uterinas con periodos de hipoxia/reoxigenación (H/R) que alteran la diferenciación y sincialización del trofoblasto, e incrementan la apoptosis. Si bien la tasa de apoptosis fluctúa fisiológicamente durante la gestación, se desconoce cómo se gatilla este mecanismo durante la PE. Se sabe que la disminución del volumen celular que desencadena la cascada apoptótica estaría mediada por acuaporinas (AQPs). Previamente, informamos la expresión y localización de AQP3, 4 y 9 en membrana apical del sincio-trofoblasto de placenta humana y observamos que en placentas preeclámpticas la expresión de AQP3 y 4 disminuye mientras



que la de AQP9 aumenta aunque esto no se correlacionó con un aumento en la funcionalidad. OBJETIVO: Estudiar la expresión de AQP3, 4 y 9 en distintas condiciones de oxigenación y evaluar su rol en la apoptosis. METODOLOGÍA: Se cultivaron explantos de placenta humana normal en normoxia, hipoxia e H/R, en ausencia y en presencia de inhibidores de AQPs (HgCl<sub>2</sub> y fletina). Se evaluaron los índices apoptóticos (Bax, Bcl-2, y degradación del ADN) y la expresión de las AQPs por inmunohistoquímica y Western Blot. RESULTADOS: Observamos que en explantos cultivados en hipoxia e H/R aumentaron los índices apoptóticos. Además, la expresión de AQP9 aumentó significativamente en H/R mientras que la de AQP3 y 4 disminuyó (n=5, p<0,05), patrón similar al observado en placentas preeclámpicas. El tratamiento con HgCl<sub>2</sub> (inhibidor de AQP3 y 9) produjo una inhibición en la degradación del ADN mientras que en el tratamiento con fletina (inhibidor de AQP9) esto no se observó. CONCLUSIONES: Estos resultados sugieren que cambios en la tensión de oxígeno producirían alteraciones tanto en la expresión de las AQPs placentarias como en los índices apoptóticos. Además, demuestran que las AQPs 4 y 9 no tendrían un rol activo durante este proceso.

- 359. (697) REGULACION DIFERENCIAL DE LA EXPRESION DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENO Y PROGESTERONA POR EL HIPERTIROIDISMO AL FINAL DE LA GESTACION**  
Pennacchio G.<sup>1</sup>; Ayala C.<sup>2</sup>; Soaje M.<sup>3</sup>; Carreño N.<sup>4</sup>; Jahn G.<sup>5</sup>; Valdez S.<sup>6</sup>  
IMBECU CCT-CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>; IMBECU CCT-CONICET, Instituto de Ciencias Básicas, UNCuyo<sup>6</sup>  
gpennacchio@mendoza-conicet.gob.ar

En datos previos demostramos que en la rata, el Hipertiroidismo (HiperT) induce un patrón de expresión diferencial de los ARNm de receptores (R) de hormonas tiroideas (HTs), progesterona (P) y estradiol (E) en las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (principales reguladoras de la secreción de PRL), adelanta la caída de progesterona (P) y la secreción de PRL sérica al final de la gestación ocasionando un parto precoz, y lactancia deficiente por bloqueo parcial de la liberación de PRL. Las HTs podrían afectar la regulación neuroendocrina de PRL modificando la expresión proteica de los RP y RE en hipotálamo. Se determinó la expresión proteica del RTβ1, RPA y REalfa en HMB de ratas controles e HiperT al final de la gestación por Western blot. Los resultados se correlacionaron con PRL y P4 séricas medidas por RIA. Se trataron ratas Wistar con T4 0.25 mg/kg/día s.c. (HiperT) o vehículo (Co) hasta el sacrificio en días 19, 20, 21 de gestación (G19, G20 y G21) a las 12hs (n=8). En las Co, el RPA cayó en G21 (p < 0.05 vs G19 Co) mientras que en las HiperT la caída se adelantó a G20 (p < 0.05 vs G19 HiperT) y fue seguida por un aumento en G21. La expresión del REa fue constante en ratas Co, y el HiperT indujo un aumento en G19 (p < 0.05) seguido de una caída en G20 y G21. No hubo cambios en la expresión del RTβ1. En ratas HiperT, la disminución de la expresión del RPA y del REa en G20 fue paralela a la caída de P sérica detectada el mismo día. Esto sería indicativo de una disminución de la activación dopaminérgica hipotalámica inducida por P que estaría contribuyendo a la secreción adelantada de PRL sérica inducida por HiperT. El aumento del RPA en G21, a la inversa, induciría el tono dopaminérgico alto y PRL baja observada durante la lactancia. La falta de cambios en la expresión del RTβ1 indicaría que en esta población de neuronas sería otro receptor el involucrado en los efectos del HiperT sobre la regulación de la secreción de PRL al final de la gestación.

## ONCOLOGÍA 5

- 360. (181) HO-1 MODULA LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA POR MEDIO DE LA REGULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE STAT3.**  
Elguero M.<sup>1</sup>; Gueron G.<sup>2</sup>; Meiss R.<sup>3</sup>; Colluccio-leskow F.<sup>4</sup>; De Servi A.<sup>5</sup>; Vazquez E.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Depto de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 5 6</sup>; Academia Nacional de Medicina<sup>3</sup>;

Laboratorio de Biofísica Molecular, Centro Multidisciplinario 1, FCEN, UBA<sup>4</sup>  
belguero@qb.fcen.uba.ar

La inflamación crónica es un agente etiológico importante en el desarrollo del cáncer de próstata (PCa). La hemo oxigenasa-1 (HO-1), una proteína citoprotectora y antiinflamatoria, está involucrada en la carcinogénesis prostática. Previamente demostramos que HO-1 interactúa con STAT3, un factor de transcripción constitutivamente activo en tumores de próstata. El objetivo de este trabajo fue identificar el efecto de la interacción de STAT3 con HO-1 sobre la expresión de genes relevantes en PCa. Para ello transfectamos células de la línea LNCaP, sensibles a andrógenos, con un plásmido de expresión de STAT3 constitutivamente activo y su plásmido control, y evaluamos la expresión de PSA (principal blanco transcripcional de AR) y Bcl XL (blanco de STAT3) bajo tratamiento con hemina (inductor específico de HO-1, 80µM, 24h) y/o testosterona (10µM, 24h). La activación de STAT3 indujo la expresión de PSA (3,79 veces; p<0,05) y de Bcl XL (3,8 veces; p<0,05), en presencia de testosterona. Sin embargo, el tratamiento combinado de testosterona y hemina produjo una significativa represión (0,6 veces en PSA, p<0,01 y 0,4 veces en Bcl XL, p<0,01) en los niveles del ARNm. Mediante inmunofluorescencia se comprobó una localización celular diferencial cuando las células LNCaP fueron tratadas con hemina e IL-6 (inductor de la vía de STAT3) respecto a los controles tratados solo con IL-6. El análisis por inmunohistoquímica de muestras de tumores derivados de la línea PC3 transfectada establemente con HO-1 (PC3HO-1) crecidos como xenotransplantes en ratones nude, evidenció la localización citoplasmática y nuclear de STAT3 en los tumores PC3HO-1 respecto a la localización predominantemente nuclear en los tumores controles. Estos resultados muestran que HO-1 juega un rol en la co-regulación junto a STAT3 de la expresión génica en PCa. La comprensión de estos mecanismos podría permitir el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra esta enfermedad.

- 361. (671) EL AGREGADO DE UNA FORMA SOLUBLE NOVEL DE CADHERINA EPITELIAL A CULTIVOS DE CELULAS MCF-7 ALTERA LA MORFOLOGIA CELULAR Y LA EXPRESION DE LA MOLECULA DE ADHESION Y OTRAS PROTEINAS RELACIONADAS A LA PROGRESION TUMORAL**  
Rosso M.<sup>1</sup>; Matos M.<sup>2</sup>; Lapyckyj L.<sup>3</sup>; Vazquez-levin M.<sup>4</sup>  
IBYME<sup>1 2 3 4</sup>  
rossomarina@hotmail.com

Introducción: Cadherina epitelial (cadE) es una proteína transmembrana involucrada en la adhesión celular. Alteraciones en su expresión, localización y/o funciones se asocian a la progresión tumoral, con expresión de marcadores de invasión, entre ellos disadherina. Nuestro grupo identificó un transcripto novel de cadE humana generado por "splicing" alternativo (cadEvar) que codifica para un producto secretorio. La transfección estable de células tumorales MCF-7 con cadEvar condujo a alteraciones en la morfología celular y al aumento de sus características invasivas, a una disminución del transcripto salvaje de cadE (cadEwt) y a la expresión de marcadores moleculares de invasión. Objetivo: Evaluar el efecto del agregado de medio condicionado (MC) conteniendo cadEvar sobre la expresión de cadEwt y proteínas relacionadas en cultivos de células MCF-7. Metodología: 1) Se eligieron células HEK293 que no expresan cadE, se transfectaron con el plásmido pcDNA3-cadEvar (HEK-var) y control sin inserto (HEK-pc) y se determinaron los niveles de ARNm y formas proteicas de cadE en extractos celulares y MC de las transfectantes. 2) Se suplementaron cultivos celulares de MCF-7 con MC de HEK-var, HEK-pc y medio no condicionado control durante 7 días. Se monitoreó periódicamente la morfología celular y se cuantificaron los ARNm de cadEwt y disadherina una vez transcurrido el cultivo. Resultados: Se confirmó la expresión de cadEvar en células HEK-var (ARNm y proteína en los MC). Las células MCF-7 incubadas con el medio HEK-var presentaron 1) cambios en la morfología celular, que tomó características de tipo fibroblástica, 2) una dismi-

nución (85%) de los niveles del ARNm de cadEwt y 3) un aumento (100%) de los niveles del ARNm de disadherina. Conclusión: El agregado de MC de células que expresan cadEvar se asoció a la pérdida de morfología celular epitelial, a una disminución del transcrito cadEwt y a un aumento de disadherina, eventos que se relacionan con la progresión tumoral.

**362. (467) RESISTENCIA A LA TERAPIA ENDÓCRINA MEDIADA POR EL MICROAMBIENTE TUMORAL: LA BETA 1 INTEGRINA ESTÁ ASOCIADA AL RECEPTOR DE ESTRÓGENO**

Sampayo R.<sup>1</sup>; Raffo D.<sup>2</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>3</sup>; Simian M.<sup>4</sup>  
*Instituto de Oncología Angel Roffo, Área de Investigación*<sup>1 2 3 4</sup>  
*ro.sampayo@gmail.com*

El cáncer de mama es la neoplasia más común en mujeres y la segunda en términos de mortalidad. Aproximadamente el 75% de los tumores de mama son positivos para receptores de estrógeno y progesterona. El tamoxifeno (TAM), un modulador selectivo del receptor de estrógeno (ER), ha sido la terapia de elección para estas pacientes durante las últimas tres décadas. Demostramos previamente que en la línea tumoral derivada de un adenocarcinoma mamario murino, LM05-E, y en las células de adenocarcinoma humano MCF-7, componentes de matriz extracelular como fibronectina (FN) y laminina (LN) confieren resistencia al TAM. Describimos, también, que la resistencia inducida por FN es mediada por su molécula receptora de membrana, beta 1 integrina, y que los pulsos cortos de FN inducen la fosforilación del ER- $\alpha$ . Teniendo en cuenta, a su vez, que la resistencia mediada por FN involucra activación de las vías de Akt y Erk, las cuales son también activadas por la kinasa ligada a integrinas (ILK) y que se ha descrito recientemente que ILK interactúa con ER- $\alpha$ , nuestra nueva hipótesis de trabajo fue la posible existencia de interacción física entre ER- $\alpha$  y la integrina beta 1. Abordamos esta problemática por ensayos de co-inmunoprecipitación y demostramos que, efectivamente, beta 1 integrina precipita asociada a ER- $\alpha$  (n=3). A su vez, en este presumible complejo proteico de membrana, también demostramos que co-inmunoprecipita cadherina-e asociada al mismo. Esto sería consistente con el modelo que nuestro grupo ha descrito en el que la FN induciría resistencia al TAM como consecuencia de un cross-talk directo entre la integrina beta 1 y el ER- $\alpha$ , lo que llevaría a la activación de vías de señalización de supervivencia, típicamente inducidas por el microambiente tumoral. Esto indicaría que la presencia de componentes de matriz, como FN o LN, podría contribuir a la resistencia de novo o adquirida al tratamiento con TAM, desarrollada por pacientes tratadas con esta terapia.

**363. (657) EL PÉPTIDO 1-DEAMINO-4-VALINA-5-GLUTAMINA-8-D-ARGININA VASOPRESINA (VQ) MODULA LA PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER MAMARIO HUMANO MDA-MB-231.**

Garona J.<sup>1</sup>; Segatori V.<sup>2</sup>; Iannucci N.<sup>3</sup>; Cascone O.<sup>4</sup>; Gomez D.<sup>5</sup>; Alonso D.<sup>6</sup>; Ripoll G.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ*<sup>1 2 5 6 7</sup>; *FFyB, UBA*<sup>3 4</sup>  
*juan\_garona@hotmail.com*

Se desarrolló un nuevo compuesto sintético derivado de la molécula de desmopresina denominado VQ (1-deamino-4-valina-5-glutamina-8-D-arginina vasopresina), que ha mostrado previamente actividad antitumoral en modelos murinos singénicos de carcinoma mamario. En este trabajo se investigó la acción antitumoral in vitro e in vivo del análogo VQ utilizando un modelo de carcinoma mamario humano hormono-independiente (MDA-MB-231). En primera instancia se evaluó el efecto antiproliferativo de VQ sobre monocapas en crecimiento exponencial de células MDA-MB-231. La incubación del nuevo análogo (500-1500 nM) durante 72 h redujo significativamente la proliferación celular ( $p < 0.01$ ) mostrando un mejor desempeño que su análogo parental desmopresina a una concentración de 1500 nM. El análisis por citometría de flujo, mostró que VQ indujo arresto celular de MDA-

MB-231 en la fase G0/G1 del ciclo luego de 24 h de tratamiento con 1000 nM del péptido ( $p < 0.05$ ). También se estudió el efecto del péptido VQ sobre la capacidad migratoria de células tumorales por medio del ensayo de herida en monocapa y transwell. Tras una incubación de 16 h con VQ en una concentración de 100 y 1000 nM se logró inhibir la migración celular en un rango de 30-60 % ( $p < 0.01$ ). Asimismo, se exploró el efecto in vivo del análogo VQ sobre la progresión tumoral de MDA-MB-231 en ratones atímicos Nude. Los animales fueron inoculados con 5x10<sup>6</sup> células con Matrigel<sup>TM</sup> en el espacio subcutáneo del flanco y, luego del prendimiento tumoral, se administraron 3 dosis semanales del compuesto VQ (0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , i.v.) durante 4 semanas. El tratamiento con VQ redujo un 45% el volumen tumoral (Control= 264 $\pm$ 140; VQ= 140 $\pm$ 32 mm<sup>3</sup>;  $p < 0,05$ ). Los datos muestran que el nuevo análogo peptídico VQ derivado de la desmopresina despliega una interesante acción antitumoral en un modelo preclínico de cáncer de mama humano modulando su capacidad proliferativa y migratoria.

**364. (468) ROL DE HEMOXIGENASA-1 EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER COLORRECTAL (CCR).**

Andrés N.<sup>1</sup>; Gandini N.<sup>2</sup>; Fermento M.<sup>3</sup>; Gonzalez Donna L.<sup>4</sup>; Ferro A.<sup>5</sup>; Curino A.<sup>6</sup>; Facchinetti M.<sup>7</sup>  
*INIBIB, CCT BAHÍABLANCA, CONICET*<sup>1</sup>; *Laboratorio de Biología Básica del Cáncer-Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca-Centro Científico Tecnológico*<sup>2 3 6 7</sup>; *Hospital Italiano Regional Bahía Blanca*<sup>4 5</sup>  
*ncandres@criba.edu.ar*

Varios estudios han demostrado la participación de la hemoxigenasa-1 (HO-1) en el desarrollo y progresión tumoral, aunque muy pocos describen su expresión y rol en CCR humanos. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la expresión de HO-1 en biopsias de CCR metastásico correlacionándola con datos clínico-patológicos y comenzar a investigar su importancia en esta patología. Se emplearon 90 biopsias humanas de CCR (estadio IV) a las cuales se les realizó inmunohistoquímica para HO-1. El 64,4% de los tumores mostró expresión de HO-1. La zona adyacente no maligna mostró marcación a nivel del epitelio apical y ésta fue mucho menor que la expresión en el epitelio tumoral ( $p = 0,003$ ). Además, la expresión positiva de la proteína en los tumores se asoció con una mayor supervivencia global de los pacientes ( $p = 0,005$ ). Con el fin de comenzar a investigar el rol de HO-1 en CCR, se moduló la expresión de HO-1 con hemoína en las líneas HCT116 p53+/+, HCT116 p53-/- y HT29 observándose disminución en la supervivencia celular solamente en las HCT116 p53+/+ ( $p < 0,001$ ) mientras que las HCT116 p53-/- y las HT29 no respondieron. El análisis de expresión de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular mostró que la modulación de HO-1 produce aumento de p53, p21, p27, y disminución de los niveles de ciclina D. En cambio, no se observa variación en la expresión de estas proteínas en las líneas HT29 y HCT116 p53-/- . Dado que la vía PI3K/Akt se encuentra sobreactivada en el CCR también analizamos si la activación de HO-1 podía interferir con la misma, observando un retardo en la fosforilación de AKT en la línea HCT116 p53+/+. Los resultados muestran que HO-1 se encuentra sobreexpresada en CCR, que está asociada a una mayor supervivencia global de los pacientes y sugieren que la proteína podría frenar el desarrollo tumoral del CCR a través de la participación de p53 y de la modulación de proteínas reguladoras del ciclo celular.

**365. (724) ROL DE AHR EN EL EFECTO ANTITUMORAL DIFERENCIAL DEL 5F 203 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE OVARIO HUMANO IGROV-1 Y SKOV-3.**

Callero M.<sup>1</sup>; Luzzani G.<sup>2</sup>; Bradshaw T.<sup>3</sup>; Loaiza Perez A.<sup>4</sup>  
*Instituto de Oncología Angel H Roffo*<sup>1 2 4</sup>; *School of Biology, University of Nottingham, University Park, Nottingham NG72RD, UK*<sup>3</sup>  
*mcallero33@gmail.com*

Los tumores de ovario tienen pronóstico pobre ya que se detectan en estadio avanzado y presentan resistencia intrínseca o adquirida a drogas citotóxicas clásicas. Nuestro grupo se ha

dedicado desde hace tiempo a estudiar si el receptor de hidrocarburos arílicos (AhR) puede ser utilizado como blanco molecular de nuevas drogas antitumorales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rol de AhR en la acción del benzotiazol 5F203 en dos líneas celulares cáncer de ovario humano: la IGROV-1, sensible a esta droga y la SKOV-3 resistente a la misma. Observamos por MTS, una inhibición del crecimiento del 31.9±12.2% de las células IGROV-1 por el tratamiento con 5F 203 0.01 mM e inhibición casi total (91.9±3.4%) con 5F 203 1 mM respecto del control; la pre-incubación con el inhibidor de AhR,  $\alpha$ NF (1 $\mu$ M), revirtió parcialmente el efecto de 5F 203 (21.6±4.7% de inhibición y 27.7±5.3% respectivamente). Sin embargo, las células SKOV-3 no presentaron inhibición del crecimiento por el tratamiento con 5F 203. Se observó solo en las células IGROV- un aumento de la tasa de apoptosis, evaluada por tinción de cuerpos apoptóticos con DAPI, clivaje de las proteínas PARP y caspasa-3, inducido por la droga y como también del arresto celular en la fase G1 del mismo, evaluado por citometría de flujo y aumento en la fosforilación de P53 y en la expresión de p21. Este proceso no fue observado al someter a las células SKOV-3 al mismo tratamiento. Por otro lado, 5F 203 (1  $\mu$ M) indujo la translocación nuclear de AhR evaluada por western blot del receptor en fracciones citosólica y nuclear, solo en las células IGROV-1, indicando activación de este camino de señalización. Finalmente, mediante la transfección de un plásmido conteniendo el gen reportero luciferasa acoplado a la secuencia promotora de unión a AhR, XRE, demostramos que 5F 203 (0.1 $\mu$ M), indujo un aumento en la actividad luciferasa de 3.75 veces respecto del control únicamente en las células IGROV-1. Se concluye que el 5F 203, tiene efecto antitumoral/ pro-apoptótico solamente sobre las células IGROV-1 y que el mismo es mediado por AhR, por lo que sugerimos que la activación de esta vía podría potencialmente ser utilizado como un marcador de sensibilidad a esta droga.

**366. (652) EL BLOQUEO DE LA INTERACCIÓN ENTRE GALECTINA-1 (GAL1) Y SUS GLICANOS, A TRAVÉS DE ANTICUERPOS MONOCLONALES (MABS) NEUTRALIZANTES, PROMUEVE NORMALIZACIÓN DE LA VASCLATURA Y POTENCIA LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL**

Croci D.<sup>1</sup>; Cerliani J.<sup>2</sup>; Mascanfroni I.<sup>3</sup>; Salatino M.<sup>4</sup>; Ouyang J.<sup>5</sup>; Dergan-dylon S.<sup>6</sup>; D'alotto Moreno T.<sup>7</sup>; Shipp M.<sup>8</sup>; Rabinovich G.<sup>9</sup>  
*IBYME*<sup>1 2 3 4 6 7 9</sup>; *Department of Medical Oncology, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, United States*<sup>5 8</sup>  
*dcrocirusso@yahoo.com.ar*

Previamente demostramos que la interacción entre Gal1 y N-glicanos presentes en células endoteliales (CE) vincula fenómenos de hipoxia y neovascularización. El objetivo del presente estudio fue caracterizar un panel de mAbs bloqueantes de Gal1 como potencial terapia antiangiogénica. El bloqueo de Gal1 mediante el uso del mAb F8.G7 fue capaz de inhibir la proliferación ( $p < 0,01$ ), migración ( $p < 0,01$ ) y morfogénesis ( $p < 0,01$ ) de CE in vitro. Por el contrario, no observamos efecto alguno al utilizar los clones B1.H8, E6H9 y 2E12. En estudios in vivo, observamos que el tratamiento con F8.G7 inhibe el crecimiento de los tumores murinos B16, LLC1 ( $p < 0,01$ ), EL-4 y TIB-42 ( $p < 0,05$ ). La administración de F8.G7 indujo un marcado remodelado de la vasculatura tumoral caracterizado por un menor diámetro vascular medio ( $p < 0,01$ ) y menor desorganización vascular. Los tumores tratados con F8.G7 presentaron un mayor número pericitos maduros ( $\alpha$ SMA+; Desmina+; RGS5low; PDGFR- $\beta$ low) adheridos a la pared de los endotelios ( $p < 0,01$ ) y una disminución de la hipoxia tumoral ( $p < 0,05$ ). Utilizando perlas fluorescentes y células T marcadas con CFSE, demostramos que la vasculatura "normalizada" luego del tratamiento con F8.G7 es más permeable a células del sistema inmune ( $p < 0,05$ ), las cuales, en ausencia de Gal1 son más potentes para montar una respuesta anti-tumoral. En tal sentido en animales tratados con F8.G7 observamos mayor flujo de células T CD8 en el parénquima tumoral, un incremento de células T CD4 productoras de IFN- $\gamma$  e IL-17 y niveles inferiores de IL-10 ( $p < 0,01$  F8.G7 vs. Isotipo). En conjunto, estos datos sugirieron

una conexión causal entre los fenómenos de remodelado vascular y respuesta inmune y confirman el papel crucial de Gal1 en neovascularización y escape tumoral. Por otro lado, nos permiten postular al mAb F8.G7 como el primer agente terapéutico capaz de atenuar la angiogénesis patológica y mejorar la respuesta inmune simultáneamente con el fin de limitar el crecimiento tumoral.

**367. (497) APOPTOSIS INDUCIDA POR INTERFERÓN-ALFA2B (IFN) EN UN MODELO DE PRENEOPLASIA HEPÁTICA: PARTICIPACIÓN DE AKT, FOXO3A Y LA VÍA WNT/BETA-CATENINA**

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 - CONICET*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
*parody@ifise-conicet.gov.ar*

En trabajos previos demostramos que el tratamiento in vivo con IFN produce la atenuación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en un modelo de preneoplasia hepática en rata. Además, observamos disminución de los focos preneoplásicos por un proceso apoptótico mediado por especies reactivas del oxígeno (ROS) inducidas por IFN. FoxO3a es un factor de transcripción regulado en múltiples niveles que transcribe genes pro-apoptóticos tales como Bim, PUMA, p27Kip1 y bNIP3. Decidimos estudiar la participación de FoxO3a en los eventos descritos anteriormente. Grupos experimentales: IP, animales con preneoplasia hepática; IP+IFN, animales IP con tratamiento de IFN e IP+IFN+A, animales IP+IFN que recibieron ácido ascórbico (A) durante el tratamiento. Por inmunoblotting en fracción citosólica encontramos disminución de pAkt (forma activa de Akt. IP+IFN: -82%; IP+IFN+A: -92%) y de pFoxO3a (forma inhibida de FoxO3a. IP+IFN: -68%; IP+IFN+A: -79%\*) respecto a IP. No hubo cambios en los niveles de Akt total. En fracción nuclear observamos aumento de Foxo3a en el grupo IP+IFN (+210%\*) respecto a IP. Mediante estudios de coimmunoprecipitación demostramos mayor asociación de  $\beta$ -catenina a TCF en IP e IP+IFN+A y de  $\beta$ -catenina a Foxo3a en IP+IFN. Por sqRT-PCR encontramos expresión de genes pro-apoptóticos blancos de FoxO3a (Bim, PUMA, p27Kip1 y bNIP3) en los grupos IP+IFN e IP+IFN+A y ausencia en IP. El tratamiento con A disminuyó la expresión de PUMA (-35%\*) y bNIP3 (-89%\*) respecto a IP+IFN. Los datos sugieren que el tratamiento in vivo con IFN regula negativamente la activación de Akt por un mecanismo no mediado por ROS. Por otro lado, tras la presencia de ROS y el menor índice de fosforilación de FoxO3a mediado por Akt, este factor se transloca al núcleo donde transcribe genes relacionados con la apoptosis celular. La presencia de ROS estimula la unión de  $\beta$ -catenina a FoxO3a resultando en una actividad transcripcional mayor para algunos de estos genes y atenuando la actividad de TCF. \* $p < 0,05$

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 3**

**368. (23) ACCIÓN DE RSUME EN LA REGULACIÓN DE UN GEN INVOLUCRADO EN CRECIMIENTO CELULAR Y TUMORIGÉNESIS DE LA HIPÓFISIS ANTERIOR**

Fuertes M.<sup>1</sup>; Gerez J.<sup>2</sup>; Haedo M.<sup>3</sup>; Tedesco L.<sup>4</sup>; Sapochnik M.<sup>5</sup>; Arzt E.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
*marianafuertes@fbmc.fcen.uba.ar*

Pituitary tumor transforming gene (PTTG) fue clonado de una línea tumoral de hipófisis de rata y actúa como securina, regulando la correcta separación de las cromátidas hermanas en metafase. Por tratarse de un regulador del ciclo celular, el desbalance de sus niveles de expresión conduce a inestabilidad genética, aneuploidía, apoptosis, daño al ADN, entre otros, y conlleva al desarrollo de tumores. Se desconoce la causa que provoca la desregulación de PTTG durante el proceso tumorigénico de hipófisis, pero hipotetizamos que el aumento de RWD-containing

sumoylation enhancer (RSUME) al momento inicial del proceso tumoral por efecto de la hipoxia, induciría un aumento de la expresión de PTTG al contribuir a su estabilidad, y desencadenaría su acción como oncogen. Anteriormente mostramos que PTTG se sumoila y que RSUME modula positivamente dicha sumoilación, conduciendo a un aumento de la estabilidad proteica. Por ensayos de transfección transiente y purificación por 6xHis en células COS-7, demostramos que RSUME disminuye los niveles de PTTG ubiquitinado, reduciendo su degradación vía proteasoma. Al cotransfectar Gam1 (proteína viral que inhibe el pathway de SUMO), aumentan los niveles de PTTG ubiquitinado, siendo este efecto revertido por un dominante negativo de Gam1. En el mismo sistema, determinamos por western blot que la E3 ligasa de SUMO específica de PTTG es Topors y que RSUME potencia su efecto. En células GH3 y GH4, mediante ensayos con genes reporteros con la zona promotora de los genes c-myc, ciclina D3 o p21, targets transcripcionales de PTTG, seguida de luciferasa, vimos que RSUME aumenta la actividad transcripcional de PTTG sobre c-myc y ciclina D3, y la disminuye sobre p21, de manera dependiente con la masa ( $p < 0.05$ ). En estos experimentos, detectamos por western blot un consecuente aumento de los niveles proteicos de PTTG inducido por RSUME. Concluimos que la estabilidad proteica de PTTG es regulada por RSUME, teniendo consecuencias funcionales que conllevan al desarrollo tumoral.

### 369. (25) MECANISMOS MOLECULARES DE LOS EFECTOS DE RSUME SOBRE HIF-1

Tedesco L.<sup>1</sup>; Gerez J.<sup>2</sup>; Fuertes M.<sup>3</sup>; Druker J.<sup>4</sup>; Sevelev G.<sup>5</sup>; Barontini M.<sup>6</sup>; Silberstein S.<sup>7</sup>; Shan B.<sup>8</sup>; Renner U.<sup>9</sup>; Stalla G.<sup>10</sup>; Páez-pereda M.<sup>11</sup>; Holsboer F.<sup>12</sup>; Arzt E.<sup>13</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 3 4 7 13</sup>; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia (FLENI)<sup>5</sup>; CEDIE, Hospital de Niños R. Gutierrez<sup>2</sup>; Max Planck Institute of Psychiatry, 80804 Munich, Germany<sup>8 9 10 11 12</sup>*  
*ltedesco@fbmc.fcen.uba.ar*

HIF-1, factor de transcripción principal en la respuesta adaptativa a hipoxia, está compuesto por HIF-1beta, de expresión constitutiva y HIF-1alfa, subunidad que en normoxia es reconocida por la E3 ligasa de ubiquitina VHL y enviada a degradación vía proteasoma. En hipoxia, así como en patologías asociadas a deficiencia de VHL, este reconocimiento no ocurre, HIF-1alfa se estabiliza y ejerce su actividad transcripcional. En trabajos previos demostramos que RSUME, una proteína clonada en nuestro laboratorio, aumenta la expresión de HIF-1alfa y consecuentemente su actividad transcripcional. En este trabajo estudiamos los mecanismos moleculares por los que RSUME aumenta la expresión de HIF-1alfa, focalizándonos en la función de VHL. Utilizando el gen reportero ODD-luc, demostramos que RSUME aumenta un 200% los niveles de HIF-1alfa incluso cuando se sobreexpresa VHL ( $p < 0.05$ ). Estos resultados fueron reconfirmados por ensayos de western blot. Por ensayos de co-inmuno precipitación demostramos que RSUME y VHL interactúan físicamente, y que dicha interacción no depende de HIF-1alfa. Consecuentemente demostramos que RSUME inhibe la ubiquitinación de HIF-1alfa mediada por VHL. En el mismo sistema, demostramos que RSUME reduce la formación del complejo de ubiquitinación de HIF-1alfa (VCB-VHL/Cul2/ElonginaC/B). Para estudiar el mecanismo de inducción de RSUME en hipoxia, se transfectaron células deficientes de VHL con el gen reportero RSUME-LUC y vectores de expresión de VHL, y observamos que VHL inhibe en un 60% la expresión de RSUME ( $p < 0.05$ ). Utilizando muestras de hemangioblastomas y feocromocitomas humanos, así como en células RCC, demostramos altos niveles de expresión de RSUME en tumores deficientes de VHL. Concluimos que RSUME interacciona físicamente con VHL inhibiendo su función sobre HIF-1alfa, aumentando consecuentemente su estabilidad proteica y su actividad transcripcional, cumpliendo así un rol muy importante en la respuesta adaptativa en condiciones de hipoxia.

### 370. (27) LA ACTIVACIÓN DE ERK1/2 POR LA HORMONA CRH EN NEURONAS HIPOCAMPALES ES BIFÁSICA E INVOLUCRA A B-RAF

Bonfiglio J.<sup>1</sup>; Inda C.<sup>2</sup>; Senin S.<sup>3</sup>; Maccarrone G.<sup>4</sup>; Refojo D.<sup>5</sup>; Turck C.<sup>6</sup>; Holsboer F.<sup>7</sup>; Arzt E.<sup>8</sup>; Silberstein S.<sup>9</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 3 8 9</sup>; Max-Planck Institute of Psychiatry, Munich<sup>4 5 6 7</sup>*  
*jjbonfiglio@fbmc.fcen.uba.ar*

La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) está involucrada en la respuesta neuroendócrina, autonómica y comportamental frente al estrés. La desregulación del sistema CRH/CRHR1 en estructuras límbicas se encuentra asociada a la iniciación de estadios patológicos como ansiedad y depresión. Estudios in vivo de nuestro laboratorio demostraron que CRH activa, vía CRHR1, la quinasa ERK1/2 en zonas específicas del hipocampo y amígdala relacionadas con el procesamiento de la información externa y con aspectos comportamentales del estrés. El objetivo de nuestro trabajo es dilucidar los mecanismos moleculares de esta activación mediante el uso de una línea celular murina de origen hipocampal (HT22). Observamos que CRH produce una activación bifásica de ERK1/2 en clones HT22 sobreexpresores de CRHR1. La primer fase es rápida (3-6 min) y transitoria (hasta los 12 min) y está mediada por la proteína B-Raf como componente principal. La segunda fase, de menor intensidad, es persistente (20 min a 3hs) y es inhibida por agentes bloqueantes de la endocitosis ( $p < 0.05$ ). Utilizando herramientas moleculares, farmacológicas y resultados de análisis proteómicos, identificamos distintos componentes moleculares que median selectivamente cada una de las fases de activación de ERK1/2 gatilladas por CRH (vimentina, PKA,  $\beta$ -arrestinas). Mediante estudios en microscopía confocal observamos una rápida internalización del CRHR1 (12 min) y una distribución de pERK1/2 en forma de acúmulos granulares discretos que son, a diferencia de lo observado con otros estímulos activadores de ERK1/2 tales como PDGF, retenidos persistentemente en el citoplasma sin translocación significativa al núcleo. Nuestros resultados aportan a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la activación de ERK1/2 por CRH y contribuyen a la identificación de nuevos caminos de señalización, lo que podría conducir al descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos para patologías asociadas al sistema CRH/CRHR1.

### 371. (361) PARTICIPACIÓN DE LA VÍA GPR30/ADENILATO CICLASA (AC)/PKA EN LA COLESTASIS INDUCIDA POR ESTRADIOL 17 $\beta$ -D-GLUCURONIDO (E17G) EN DUPLAS AISLADAS DE HEPATOCITOS DE RATA (DAHR).

Zucchetti A.<sup>1</sup>; Barosso I.<sup>2</sup>; Davio C.<sup>3</sup>; Crocenzi F.<sup>4</sup>; Sanchez Pozzi E.<sup>5</sup>  
*Instituto de Fisiología Experimental, CONICET-UNR<sup>1 2 4 5</sup>; Cátedra de Química Medicinal, Departamento de Farmacología, FFyB, UBA<sup>3</sup>*  
*zucchetti@ifise-conicet.gov.ar*

Previamente observamos que algunas vías de señalización activadas por estradiol en diferentes tejidos son activadas también por E17G en hígado, conduciendo a alteraciones de localización y función de los transportadores canaliculares Bsep y Mrp2. Además, se demostró que estradiol a través del receptor GPR30, aumenta AMPc en distintas células, incluso hepatocitos. Por ello evaluamos el rol de la vía GPR30/AC/PKA en las alteraciones colestásicas por E17G en DAHR. Se obtuvieron DAHR de ratas Wistar hembras adultas por perfusión con colagenasa y elutriación. Luego de 5h de cultivo se realizaron las siguientes incubaciones: 1) 10 min con E17G (50  $\mu$ M), DMSO (C), forskolina (FK 2,5  $\mu$ M, control positivo) en presencia de IBMX (0,8 mM, inhibe fosfodiesterasa). Se midió AMPc por competición de [3H]AMPc por PKA inmovilizada en carbono-dextran. 2) 15 min con los inhibidores G15 10nM (GPR30), SQ22536 10 $\mu$ M y MDL12330 20 $\mu$ M (AC) KT5720 0,25 $\mu$ M, H89 1 $\mu$ M y Rp-cAMPS 10 $\mu$ M (PKA), previo a 20 min con E17G. Finalmente 15 min de

exposición a colil-lisilfluoresceína (CLF 2µM, sustrato de Bsep) o clorometil fluoresceína diacetato (2,5µM, precursor de GMF, sustrato de Mrp2). Por microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de DAHR que acumularon CLF (%cvaCLF) o GMF (%cvaGMF). Resultados (%C, media±ES): 1) E17G aumentó los niveles de AMPc intrahepatocitarios (C=100±0, E17G=226±29a, FK=6867±1976a). C=0,8 pmol/105 DAHR. 2) E17G redujo el %cvaCLF y %cvaGMF. La inhibición de la vía GPR30/AC/PKA previno la reducción causada por E17G [C (100±0) E17G (55±4a, 57±3a); E17G+G15 (92±4b, 91±5b); E17G+SQ22536 (98±6b, 92±2b); E17G+MDL12330 (92±5b, 83±3c); E17G+KT5720 (87±2c, 88±6c), E17G+H89 (79±3c, 87±3c), E17G+Rp-cAMPS (83±3c, 82±2c) %cvaCLF y GMF, respectivamente]. ap<0,05 vs C, bp<0,05 vs E17G, cp<0,05 vs C y E17G (n=3). E17G aumenta AMPc intrahepatocitario posiblemente vía GPR30/AC. Este segundo mensajero, vía PKA, sería clave en las alteraciones del transporte canalicular inducidas por E17G.

### 372. (365) EL ÓXIDO NÍTRICO MODULA LA EXPRESIÓN DE CICLOXIGENASA-2 INDUCIDA POR LIPOPOLISACÁRIDO BACTERIANO EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES MURINAS

Mercau M.<sup>1</sup>; Sanchez R.<sup>2</sup>; Astort F.<sup>3</sup>; Martinez Calejman C.<sup>4</sup>; Arias P.<sup>5</sup>; Cymeryng C.<sup>6</sup>

UBA, Facultad de Medicina, Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, CEFYBO, CONICET<sup>1 2 3 4 6</sup>; UBA, Facultad de Medicina, Depto de Fisiología<sup>5</sup> mercaum@yahoo.com.ar

Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que el tratamiento de células adrenocorticales murinas de la línea Y1 con lipopolisacárido bacteriano (LPS) estimula la producción de glucocorticoides. Asimismo demostramos que el LPS incrementa los niveles de expresión de COX-2, vía activación del factor de transcripción NFκB, y por consiguiente la síntesis de prostaglandinas, y que este aumento está implicado en la modulación de la esteroidogénesis. También demostramos que tanto la expresión como la actividad del sistema de generación de óxido nítrico, otro modulador local de la esteroidogénesis, se incrementó por el tratamiento in vivo con LPS en la zona fasciculata de la corteza adrenal. Los presentes experimentos fueron diseñados para evaluar la posible interacción entre estos dos sistemas, y estudiar las vías de transducción de señales involucradas. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con LPS (10µg/ml) induce la expresión de COX-2, a nivel del ARNm y de proteínas, de manera tiempo-dependiente, observándose un máximo a las 24hs (p<0.001 vs. 0h LPS, ANOVA). Demostramos también que la sobreexpresión de la subunidad p65 de la vía de NFκB induce un aumento en los niveles proteicos de COX-2 en estas células (p<0.05 vs. Control, Test t de Student). Por otro lado, el tratamiento con un dador de óxido nítrico (DETA/NO 500µM) previno parcialmente la estimulación por LPS de un plásmido reportero de la activación del factor de transcripción NFκB (kB-LUC), y también la expresión proteica de COX-2. Concluimos entonces que el óxido nítrico modula negativamente la expresión de COX-2 en células adrenocorticales murinas estimuladas con LPS y que el mecanismo de acción involucra la inhibición de la estimulación por LPS, del factor de transcripción NFκB, etapa necesaria en la inducción de COX-2 en estas condiciones experimentales.

### 373. (373) EL OXIDO NÍTRICO INDUCE LA HEMO OXIGENASA-1 EN CÉLULAS ADRENOCORTICALES MURINAS DE LA LÍNEA Y1

Astort F.<sup>1</sup>; Mercau M.<sup>2</sup>; Cymeryng C.<sup>3</sup>

Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, CEFYBO, CONICET<sup>1 2 3</sup> f\_astort\_lem@hotmail.com

Trabajos previos de nuestro laboratorio sugirieron la regulación recíproca de dos sistemas moduladores locales de la esteroidogénesis, los de las Oxido Nítrico Sintetas y las Hemo Oxigenasas (HO). En ese sentido demostramos que la expresión de HO-1 es positivamente regulada por el NO generado endógenamente en

la corteza adrenal de rata. Los presentes experimentos fueron diseñados para analizar el mecanismo involucrado en la inducción de HO-1 por NO en células adrenales. En células adrenocorticales murinas Y1, el tratamiento con el dador de óxido nítrico, DETA/NO, produjo un aumento en los niveles de ARNm y proteínas de HO-1. Esto fue prevenido totalmente por el pretratamiento con el inhibidor de la transcripción, actinomicina D. No se observaron cambios en la vida media del ARNm de HO-1 por DETA/NO. El tratamiento incrementó los niveles del factor de transcripción Nrf2 medidos por western blot. En otra serie de experimentos, el tratamiento con el inhibidor de PKC, staurosporina, previno el aumento en los niveles proteicos de HO-1 por DETA/NO y, el inhibidor de guanilato ciclasa soluble, ODC, no tuvo efecto sobre el aumento en los niveles de ARNm, mientras que previno el aumento de los niveles proteicos de HO-1. Por último, el tratamiento de células Y1 con 8-Br-GMPc provocó aumento en los niveles de ARNm y proteínas de HO-1. Los resultados demuestran que el tratamiento con un generador de NO resulta en la inducción del gen de HO-1 en células Y1. Esta inducción depende de la síntesis de novo de ARNm y proteínas y se descarta un mecanismo de estabilización del ARNm. A su vez, el NO produciría la activación/estabilización del factor Nrf2 lo que llevaría a la inducción de HO-1. La vía de transducción de señales involucraría por un lado a la familia de las PKCs y, por otro lado a la vía GCs/PKG en un mecanismo postraduccional.

### 374. (424) ROL DE PROTEÍNAS TPR EN LA LOCALIZACIÓN SUBCELULAR Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE RECEPTORES ESTEROIDALES

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</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, IBYME/CONICET<sup>4</sup> gmazaira@qb.fcen.uba.ar

Los dominios TPR (tetratricopeptide repeat) están formados por secuencias de 34 aa repetidos en tándem y median interacciones proteicas. A pesar de que las proteínas TPR intervienen en numerosos procesos celulares, es poco lo que se sabe acerca de su función biológica. Las más estudiadas son aquellas que interactúan con los receptores de esteroides a través de la chaperona hsp90, regulando su actividad transcripcional y su transporte al núcleo. Dentro de ellas se cuentan las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52, cuyo balance de expresión determina la localización subcelular del receptor de glucocorticoides (GR) y del de mineralocorticoides (MR). Nuestro objetivo fue estudiar los efectos de otras proteínas TPR tales como PP5, 14-3-3σ y SGT1α sobre el retrotransporte de ambos receptores y sobre su actividad transcripcional. Tanto la proteína fosfatasa 5 (PP5) como 14-3-3σ, las que comparten semejanza conformacional en sus dominios TPR, estimularon la actividad transcripcional de GR, mientras que la proteína SGT1α fue eficiente en estimular la actividad del receptor de andrógenos (AR). Mientras que 14-3-3σ retrasó la importación nuclear de GR y aceleró su exportación en ausencia de hormona, PP5 aumentó su localización nuclear en ausencia de hormona. Esto podría deberse a que al unir dineína PP5 es funcionalmente redundante con FKBP52. En resumen, la expresión selectiva de proteínas TPR en diferentes tejidos y tipos celulares podría ser un punto de regulación de la actividad transcripcional y de la localización subcelular de los receptores esteroidales.

## CARDIOVASCULAR 3

### 375. (121) EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON PÉPTIDO NATRIURÉTICO ATRIAL SOBRE LA LESIÓN VASCULAR EN RATAS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSAS.

Mac Laughlin M.<sup>1</sup>; Romero M.<sup>2</sup>; Bouchet G.<sup>3</sup>; Savignano L.<sup>4</sup>; Radionovas V.<sup>5</sup>; Caniffi C.<sup>6</sup>; Eslegaray R.<sup>7</sup>; Arranz C.<sup>8</sup>; Costa M.<sup>9</sup>

Depto Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1</sup>; Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA, IQUIMEFA-CONICET<sup>2 3 4 5 6 7 8 9</sup> mcosta@Ffyb.Uba.Ar

En nuestro laboratorio demostramos que uno de los mecanismos involucrados en los efectos vasculares del péptido natriurético atrial (ANP) en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) es la activación de la óxido nítrico sintetasa (NOS). Objetivos: Estudiar el efecto de una infusión crónica con ANP en machos (M) y hembras (H) SHR sobre: presión arterial sistólica (PAS), excreción de nitratos y nitritos (NOx) en orina de 24 horas, actividad de NOS en aorta y remodelado vascular. Métodos: Ratas SHR, de 10 semanas de edad, fueron infundidas mediante bombas subcutáneas con ANP (100 ng/hr/rata) o solución fisiológica (SF) por 14 días, finalizado este periodo se midieron: PAS (mmHg-tail cuff) y NOx (nmol/min.100g). Luego del sacrificio se extrajeron: arteria aorta torácica, corazón y riñón. En la arteria aorta se midieron: relación media/lumen ( $\mu\text{m}/\text{mm}$ ) y actividad de NOS (pmol 14C L-citrulina/gtejido.min) y se evaluaron: fibrosis en aorta y fibrosis perivascular en corazón y riñón (técnicas Sirius Red y Tricrómico de Masson). Resultados: La PAS fue menor en las H, el ANP disminuyó este parámetro en ambos sexos. Las H presentaron mayor NOx y el ANP incrementó la NOx tanto en M y H.

	AORTA NOS	Media/lumen	TM (Score)	SR (Score)
M SF	264±8	74.1±2.3	3.76±0.14	3.52±0.21
M ANP	353±6*	65.7±1.9*	3.26±0.19	3.05±0.13*
H SF	301±4*	65.6±2.5*	2.47±0.14*	2.75±0.38*
H ANP	410±3#	62.9±3.6	2.55±0.28	1.50±0.35#

n=8/grupo \*p<0.01vs M SF, #p<0.01 vs H SF (ANOVA dos factores, test posteriori de Bonferroni). El colágeno perivascular en arterias coronarias fue mayor en M que en hembras. El ANP disminuyó la fibrosis perivascular en coronarias de M y en las arterias renales de ambos sexos. Conclusión: Las hembras SHR presentan menor daño vascular que los machos y una mayor actividad basal del sistema del NO que los machos. En ambos sexos, el tratamiento con ANP, disminuyó la PAS y mejoró las propiedades de las paredes arteriales, acciones que estarían mediadas, al menos en parte, por la activación del sistema del NO.

### 376. (193) ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DE CATALASA C262T Y SOD-MN ALA9VAL EN PACIENTES CHAGÁSICOS

Gerrard G.<sup>1</sup>; Lioi S.<sup>2</sup>; Zumoffen C.<sup>3</sup>; Turco M.<sup>4</sup>; Beloscar J.<sup>5</sup>; D'arrigo M.<sup>6</sup>

Área de Química Analítica, FBIOYF - UNR<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
gabionyca@yahoo.com.ar

Existen pocos estudios sobre los mecanismos que hacen que un paciente chagásico evolucione hacia un cuadro severo irreversible o permanezca en fase indeterminada durante toda su vida. Considerando que la variabilidad de la expresión fenotípica de la cardiomiopatía chagásica podría deberse a componentes genéticos del paciente, nos propusimos analizar en individuos chagásicos con (CconC n:24) y sin miocardiopatía (CsinC n:12), el polimorfismo Ala9Val, presente en el gen de la superóxido dismutasa dependiente de Mn (SOD MnAl9Val) y el C262T de catalasa (CATC272T) y comparar su frecuencia en individuos sanos (CS n:25). Así como determinar las actividades enzimáticas, por técnicas espectrofotométricas, de superóxido dismutasa (SOD); glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa. La caracterización molecular se realizó por PCR-RFLP. Se realizó el ensayo de hipótesis de una proporción bajo teoría normal y se aplicó Kruskal Wallis. Las FG para SODMn (IC 95%) fueron CS: (AlaAla 0.54, AlaVal 0.33, ValVal 0.13); CsinC (AlaAla 0.36, AlaVal 0.46, ValVal 0.18); CconC (AlaAla 0.35, AlaVal 0.30, ValVal 0.35). Las FG para CAT (IC 95%) fueron CS: (CC 0.64, CT 0.36); CsinC (CC 0.83, CT 0.17); CconC (CC 0.58, CT 0.42). Las actividades obtenidas de catalasa(K/gHb) CconC 316±68, CsinC 332±41, CS 185±28; GPx(U/gHb) CconC 98±17, CsinC 102±20, CS 61±11; SOD (USOD/gHb) CconC 3270±833, CsinC 2590±188, CS 895±314. En relación al estudio de la FG de SOD-Mn entre chagásicos y CS se observaron diferencias (p<0.01). Las actividades de catalasa, SOD y GPx mostraron diferencias (p< 0.01) entre los pacientes chagásicos respecto de los CS.

Los datos obtenidos reflejarían que polimorfismos involucrados en el stress oxidativo podrían tener implicancias en la patogenia de la miocardiopatía chagásica.

### 377. (265) COMPORTAMIENTO OSMOMETRICO DE FIBROCI-TOS CARDIACOS

Fischbarg J.<sup>1</sup>; Gomez K.<sup>2</sup>; Tasso L.<sup>3</sup>; Kusnier C.<sup>4</sup>; Cacace V.<sup>5</sup>  
ININCA-UBA-CONICET<sup>1 4 5</sup>; INGBEP<sup>3</sup>  
jif20@columbia.edu

Introducción: Los fibrocitos cardíacos conforman aproximadamente un 20% del volumen cardíaco, donde cumplen una función estructural, y de reparación tisular y fibrosis. No se conoce su respuesta a cambios inducidos de volumen. Objetivo: determinar si los fibrocitos son capaces de responder osmóticamente y regular su volumen al ser expuestos a desafíos anisotónicos. Material y métodos: Se utilizaron cultivos primarios de fibrocitos cardíacos de ratón neonato (de 3 días) sembrados sobre cubreobjetos de vidrio, que fueron colocados en una cámara de vidrio (37 C) y perfundidos con una solución de Ringer. Las células fueron expuestas a soluciones hipotónicas (por disminución de [NaCl]) e hipertónicas (por agregado de sacarosa). Para determinar volumen, se utilizó la refracción de un haz de luz láser al atravesar una capa celular. La luz difractada a ángulos pequeños contiene información sobre el volumen celular. Este método sido utilizado en varios tipos de células; detecta volumen en tiempo real, y con muy alta sensibilidad. Las células se iluminan con un láser ( $\lambda = 670 \text{ nm}$ ) y la intensidad de la luz dispersada se mide con un fotomultiplicador. Como controles se realizaron mediciones repitiendo el procedimiento en ausencia de células. Resultados: Los fibrocitos cardíacos de ratón aumentan su volumen al exponerlos a solución hipotónica, y disminuyen de volumen en soluciones hipertónicas. No se observó regulación de volumen salvo en unos pocos casos (las células tendieron a regresar parcialmente al volumen inicial). Conclusiones: los fibrocitos cardíacos presentan respuestas osmóticas frente a cambios en la osmolaridad del medio. Dada la rapidez del cambio transiente de volumen, es posible que dichas células posean acuaporinas. Apparently poseen mecanismos de regulación que se inactivarían fácilmente in vitro.

### 378. (355) POLIMORFISMOS 677CT Y 1298AC DE LA ENZIMA METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA Y LA HOMOCISTEINEMIA EN UNA POBLACIÓN DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES.

Turk Noceto P.<sup>1</sup>; Morales A.<sup>2</sup>; Gariglio L.<sup>3</sup>; Potenzi M.<sup>4</sup>; Porcile R.<sup>5</sup>; Fridman O.<sup>6</sup>

Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, UAI<sup>1 2</sup>; Hospital Universitario, UAI<sup>3 4 5</sup>; Centro de Altos Estudios en Ciencias Humanas y de la Salud, UAI, CONICET<sup>6</sup>  
paulita\_turk@hotmail.com

Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima clave en el metabolismo de la homocisteína. Investigamos la relación de los polimorfismos MTHFR C677T y A1298C con la homocisteinemia (tHcy) en una población de la Ciudad de Buenos Aires. Métodos. Criterio de exclusión: Ingesta de vitaminas. Los polimorfismos se estudiaron por PCR-RFLP y tHcy por quimioluminiscencia. Estadística por ANOVA y test LSD para paramétricos y Chi cuadrado y análisis de regresión logística para no paramétricos. Resultados. Población: 169 varones y mujeres entre 18 y 79 años. Si se consideran los polimorfismos por separado 40,2% presentó el genotipo 677CC (CC), 47,9% 677CT (CT) y 11,8% 677TT (TT) y las tHcy (en  $\mu\text{M}$ ) fueron CC 9,3±0,4 (68); CT 9,1±0,4 (81) y TT 9,6±0,6 (20) (p>0,05). El 50,9% presentó el genotipo 1298AA (aa), 45,0% 1298AC (ac) y 4,1% 1298CC (cc) y las tHcy: aa 9,2±0,3 (86), ac 9,4±0,4 (76) y cc 7,4±0,4 (7) (p>0,05). Ambas mutaciones son consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg (p>0,05). Considerando ambos polimorfismos, se obtuvieron las tHcy de la tabla (asteriscos indican diferencias significativas: p<0,05 respecto de CC/aa).

	677CC	677CT	677TT	677CT+TT
1298aa	8,2 ± 0,4 (33)	9,7 ± 0,6 (39) *	10,2±0,8 (14)*	9,8 ±0,5 (53)*
1298ac	10,4±0,7 (33)*	8,7 ± 0,5 (37)	8,3 ± 0,5 (6)	8,7± 0,4 (43)
1298cc	8,9 ± 0,8 (2)	6,9 ± 0,2 (5)		6,9± 0,2 (5)
1298ac+cc	10,3 ± 0,5 (35)*	8,5 ± 0,4 (42)	8,3 ± 0,5 (6)	

Discusión. Si se consideran los polimorfismos independientemente, no hay diferencias en las tHcy entre los distintos genotipos y con la población total, pero si los sujetos son agrupados considerando la concurrencia de ambos polimorfismos, se ven aumentos significativos en la tHcy aunque paradójicamente en los que presentan solo uno de los dos polimorfismos. La presencia de ambos polimorfismos (CT/ac, TT/ac y CT/cc) no se traduce en aumento de la tHcy. El bajo número de individuos dificultó la agrupación por sexo y edad. PIP CONICET 5716

### 379. (449) CAMKII MEDIA LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR "MARCAPASEO" RÁPIDO

Sepúlveda M.<sup>1</sup>; Gonano L.<sup>2</sup>; Vila Petroff M.<sup>3</sup>  
*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, La Plata<sup>1,2,3</sup>*  
*bijoumase@hotmail.com*

La taquicardia ventricular promueve muerte celular y conduce a un remodelamiento cardíaco que culmina con el desarrollo de insuficiencia cardíaca congestiva (IC). Actualmente es reconocido que la pérdida de miocitos es uno de los mecanismos que determinan la progresión hacia la IC y que la taquicardia induce la activación de diversas moléculas proapoptóticas. Entre ellas, la CaMKII y los radicales libres (ROS). Sin embargo, si estas moléculas participan en la muerte celular inducida por taquicardia crónica no ha sido aún examinado. El objetivo de este estudio fue determinar si el "marcapaseo" rápido promueve la muerte celular y examinar los mecanismos subcelulares involucrados. Para ello, cultivamos cardiomiocitos ventriculares de rata, manteniéndolos estimulados durante 1 h a baja (0.5 Hz) o alta (5 Hz) frecuencia. El marcapaseo rápido disminuyó la viabilidad celular un 25 ± 3% (n=16) con respecto a la de las células mantenidas a 0.5 Hz. El cultivo en presencia del barredor de ROS, MPG no redujo la muerte celular inducida por marcapaseo rápido. En cambio, la disminución de la viabilidad celular fue completamente prevenida cuando los cultivos se realizaron en condiciones de bajo Ca<sup>2+</sup> más nifedipina o en presencia del inhibidor de la CaMKII, KN-93 (n=6). Cuando el marcapaseo rápido se mantuvo durante 24 hs hubo una mayor mortalidad celular que se previno con MPG y KN93. Concluimos que el marcapaseo rápido promueve la muerte celular al activar a la quinasa proapoptótica, CaMKII. Especulamos que el Ca<sup>2+</sup> es el activador de CaMKII en la taquicardia aguda en tanto que los ROS son los activadores primarios de la quinasa en la taquicardia crónica.

### 380. (509) ALTERACIONES EN PROTEÍNAS ASOCIADAS AL MANEJO DEL CALCIO INTRACELULAR EN CORAZÓN DEL MODELO MURINO DE ENFERMEDAD DE FABRY

De Francesco P.<sup>1</sup>; Mucci J.<sup>2</sup>; Milillo A.<sup>3</sup>; Valverde C.<sup>4</sup>; Rozenfeld P.<sup>5</sup>; Mattiazzi A.<sup>6</sup>; Rinaldi G.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP<sup>1,2,3,5</sup>; Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>4,6,7</sup>*  
*nicolasdefrancesco@gmail.com*

La Enfermedad de Fabry es una patología de almacenamiento lisosomal genética que entre varios órganos, afecta también al tejido cardíaco. Resultados previos de nuestro grupo revelaron menor contractilidad del ventrículo izquierdo, de músculos papilares y de miocitos aislados, asociado a menor amplitud del transitorio de calcio (Ca<sup>2+</sup>) en el modelo murino de Enfermedad de Fabry (knockout para el gen de alfa-galactosidasa A) (RF) en comparación con los de la cepa salvaje (RWT). El objetivo del presente trabajo es analizar el estado de las proteínas asociadas a la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> miocárdico en corazones de ratones RF y RWT. Los corazones de ratones de 25 semanas de edad (5 RF y 5 RWT) se homogeneizaron en buffer apropiado, y los

extractos proteicos se sometieron a electroforesis SDS-PAGE y luego se transfirieron a membranas de PVDF. Los western blotting se revelaron con anticuerpos específicos para: canal de Ca<sup>2+</sup> receptor de rianodina (RyR) y sus formas fosforiladas en Ser-2815 (P-Ser2815RyR) y Ser-2809 (P-Ser2809RyR), fosfolamban (PLN) y formas fosforiladas PThr17PLN y P-Ser16PLN, quinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina II (CaMKII), Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) y Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA2a). El revelado mostró un aumento significativo (p<0,05) en los niveles de P-Ser2815RyR, P-Ser2809RyR y PLN en RF en comparación con RWT. Por otro lado se detectó una disminución significativa (p<0,05) en los niveles de PThr17PLN y SERCA2a. Estas alteraciones en los niveles de proteínas asociadas al manejo del calcio podrían estar asociadas a una disminución en la recaptación de calcio hacia el RS y una pérdida de calcio por parte de RyR, conllevando a una menor velocidad de relajación y disminución del contenido de calcio a nivel del retículo sarcoplasmático. Estos resultados explicarían a nivel molecular la menor contractilidad cardíaca observada en la Enfermedad de Fabry.

### 381. (544) LOS EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE LA PROTEÍNA FIJADORA DE AMPc (EPAC) DEPENDEN DEL NIVEL DE CA<sup>2+</sup> INTRACELULAR EN EL MIOCITO CARDIACO

Lucotti I.<sup>1</sup>; Lezcano N.<sup>2</sup>; Said M.<sup>3</sup>; Vittone L.<sup>4</sup>; Mundiña-weilenmann C.<sup>5</sup>  
*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Fac Cs Médicas, UNLP<sup>1,2,3,4,5</sup>*  
*ignaciolucotti@hotmail.com*

Estudios de nuestro y otros laboratorios han descrito que la activación de la proteína fijadora de AMPc, Epac, cursa en miocitos cardíacos, tanto con efectos inotrópicos positivos como negativos y aún con ausencia de alteraciones contractiles. Con el objeto de aclarar esta controversia estudiamos los efectos de un activador selectivo de Epac, 8-(4-clorofenilo)-2'-O-metiladenosina-3'-5'-monofosfato cíclico (8-CPT) en miocitos aislados de rata cargados con el indicador fluorescente Fura-2-AM, a distintas concentraciones de Ca<sup>2+</sup> extracelular ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>). A 0,5 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>, el agregado de 10 μM 8-CPT aumentó el transitorio Ca<sup>2+</sup> (CaT) y el acortamiento y disminuyó los t<sub>1/2</sub> del CaT y del acortamiento significativamente, sin modificar el Ca<sup>2+</sup> diastólico y la longitud basal. A 1 mM [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> o 8-CPT no afectó la contractilidad ni el CaT pero aumentó el Ca<sup>2+</sup> diastólico (de 1,195±0,012 a 1,261±0,024, n=8-12, p<0,05), efecto que se asoció con un aumento de la frecuencia de liberaciones espontáneas de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmático (RS) a través de los receptores de rianodina (RyR2) (de 3,979±0,629 a 6,911±0,928, n=9), medidas en miocitos cargados con Fluo-4-AM. 8-CPT aumentó la fosforilación de Ser2815-RyR2, sitio de la CaMKII (123,70±4,21% del control, n=7) y del regulador de la captación de Ca<sup>2+</sup> por RS, fosfolamban (PLN) en su sitio CaMKII, Thr17 (145,05±13,88% del control, n=6). En el corazón aislado y perfundido a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub> 1 mM, el 8-CPT provocó un aumento de la presión diastólica final de 11,40±3,30 mmHg y un efecto relajante. Los resultados sugieren que los efectos de la activación de Epac, dependen del aporte de Ca<sup>2+</sup> a la célula ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>o</sub>) y del balance entre la retoma y liberación de Ca<sup>2+</sup> por el RS. El aumento del Ca<sup>2+</sup> diastólico y la ausencia de efecto inotrópico positivo a 1 mM Ca<sup>2+</sup> indicarían un predominio de la pérdida de Ca<sup>2+</sup> desde el RS.

### 382. (587) ALDOSTERONA ESTIMULA LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN MIOCITOS CARDÍACOS: EFECTO SOBRE EL NHE-1.

Yeves A.<sup>1</sup>; De Giusti V.<sup>2</sup>; Nolly M.<sup>3</sup>; Villa-abrille M.<sup>4</sup>; Chiappe De Cingolani G.<sup>5</sup>; Cingolani H.<sup>6</sup>; Aiello A.<sup>7</sup>; Ennis I.<sup>8</sup>  
*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Fac Cs Médicas, UNLP<sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup>*  
*alemy21@yahoo.com.ar*

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el NHE-1 son mediadores críticos en el desarrollo de hipertrofia e insuficiencia cardíaca. Además, los antagonistas de receptores de mineralocorticoides (MR) resultan beneficiosos en el tratamiento de pacientes con estas patologías. Dado que es conocido que aldosterona

terona (aldo) induce la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), nuestro objetivo fue evaluar en cardiomiocitos de rata, si dicha transactivación aumenta la producción de O<sub>2</sub>- y activa al NHE-1. Se determinó la producción de O<sub>2</sub>- por el método de lucigenina y fue expresada como porcentaje del control. La actividad del NHE-1 (eflujo de H<sup>+</sup>, JH<sup>+</sup> en mM/min) se midió como recuperación de una carga ácida. Los resultados se expresaron como diferencia respecto al control ( $\Delta$ JH<sup>+</sup>) a pH 6.8. \* indica  $p < 0.05$ . Aldo aumentó la producción de O<sub>2</sub>- (148 $\pm$ 8%,  $n=20$ ,\*) que se abolió al inhibir el MR con eplerenona (eple, 104 $\pm$ 6%,  $n=7$ ), o espironolactona (espiro, 109 $\pm$ 15%,  $n=6$ ), y con el inhibidor de la quinasa del EGFR, AG1478 (110 $\pm$ 17%,  $n=5$ ). El EGF exógeno produjo un aumento similar a aldo (139 $\pm$ 11%,  $n=8$ ,\*), cancelado con AG1478 (106 $\pm$ 8%,  $n=5$ ). El aumento de la actividad del NHE-1 inducido por aldo (0.88 $\pm$ 0.2\*,  $n=5$ ), se previno con espiro (-0.21 $\pm$ 0.33,  $n=5$ ), con eple (-0.25 $\pm$ 0.32,  $n=6$ ) y con AG1478 (-0.29 $\pm$ 0.08,  $n=4$ ). Aldo aumentó la fosforilación de la quinasa redox sensible p90RSK (154 $\pm$ 13.9%,  $n=4$ ,\*) y del sitio Ser703 del NHE-1 (160 $\pm$ 17%,  $n=4$ ,\*), ambas prevenidas con eple (P-p90RSK: 84 $\pm$ 10.5%,  $n=4$  y P-NHE-1: 97 $\pm$ 15%,  $n=4$ ) y AG1478 (P-p90RSK: 104 $\pm$ 13.9%,  $n=4$  y P-NHE-1: 88.7 $\pm$ 6.2%,  $n=4$ ). El  $\Delta$ JH<sup>+</sup> con EGF (0.95 $\pm$ 0.34\*,  $n=5$ ) fue similar al producido por aldo. El secuestrador de ROS (MPG) bloqueó el efecto de aldo y EGF sobre el NHE-1 ( $\Delta$ JH<sup>+</sup> -0.42 $\pm$ 0.14,  $n=4$  y -0.082 $\pm$ 0.726,  $n=4$  respectivamente). Conclusión: el aumento de la producción de O<sub>2</sub>- producido por transactivación del EGFR inducida por aldo conduciría a la activación de p90RSK y fosforilación del NHE-1.

### 383. (666) ROL DEL DERMATÁN SULFATO SOBRE LOS EVENTOS TEMPRANOS DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL ENDOTELIO VASCULAR

Rasente R.<sup>1</sup>; Egitto P.<sup>2</sup>; Calabrese G.<sup>3</sup>

Cátedra de Biología Celular y Molecular, FFyB, UBA<sup>1,2,3</sup>  
yani0010@hotmail.com

La injuria del endotelio vascular induce el remodelado de la matriz extracelular (MEX), favorecida por la degradación de las metaloproteasas (MMP). Esta actividad enzimática genera fragmentos proteicos de decorina y libera las cadenas de dermatán sulfato (DS). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el rol del DS en la angiogénesis, durante la proliferación y migración. Células de endotelio cardíaco murino (H5V) fueron cultivadas durante 24 hs, frente a concentraciones crecientes (1-100  $\mu$ g/ml) de DS. La participación directa o indirecta del DS sobre la proliferación fue estudiada por el método de MTS, en presencia y ausencia de suero fetal bovino (SFB). El estudio de la producción de TNF $\alpha$  y de la distribución de NF $\kappa$ B fue realizado por Western-Blot, sobre las fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. La producción de MMP fue evaluada por zimografía; y la migración celular mediante el ensayo de quimiotaxis. Los estudios revelaron un incremento de la proliferación frente a 10  $\mu$ g/ml de DS; y un descenso significativo a partir de 75  $\mu$ g/ml ( $P < 0.001$ ), en ambos casos con respecto al control e independiente de la presencia de SFB. La producción de TNF $\alpha$  y la distribución núcleo/citosol de NF $\kappa$ B no mostró diferencias significativas entre las células control y las tratadas. La producción de MMP 2 y 9 registró un incremento significativo de la isoforma 2 en presencia de 10  $\mu$ g/ml con respecto al control (7.03  $\pm$  0.93 vs 3.15  $\pm$  0.28 DO/ $\mu$ g prot.;  $P < 0.001$ ). La migración de las células tratadas con 10  $\mu$ g/ml de DS frente al quimioattractante fue 2.3 veces superior a las células no tratadas. El DS empleado como quimioattractante no modificó la migración. Los resultados obtenidos sugieren que la incorporación de 10  $\mu$ g/ml de DS al medio de cultivo: 1) estimula directamente la proliferación endotelial a través de un mecanismo independiente de TNF $\alpha$  y NF $\kappa$ B; 2) favorece el remodelado de la MEX vascular a través de la producción de MMP2 y 3) estimula la migración celular.

## FISIOLOGÍA 2 Y RESPIRATORIO 1

### 384a. (689) ANÁLISIS DE LA ESTACIONARIEDAD DEL PATRÓN RESPIRATORIO Y SUS COMPONENTES EN SUJETOS NORMALES

D'Negri CE.<sup>1</sup>; Migueles M.<sup>2</sup>; De Vito E.<sup>3</sup>

Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari<sup>1</sup>; Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA, CONICET<sup>2,3</sup>  
cdnegri@lanari.fmed.uba.ar

Introducción. Se desconoce dónde y cómo se genera el ritmo respiratorio. La ventilación normal tiene una frecuencia respiratoria (FR) y volumen corriente (Vt) relativamente constantes, esto constituye el patrón respiratorio (PR), con Ventilación Pulmonar (VE) = FR \* Vt. Se han propuesto diversos modelos que lo explican (marcapasos, red neural, osciladores bioestables, etc). El análisis de estacionariedad (EST) de cada uno de sus componentes: Ti, Te, Ttot, Ti/Ttot, Vt, Vt/Ti (Medicina (B Aires) 2009, 69: 311-317) puede aportar datos sobre los mecanismos involucrados. Material y método. Prospectivo de intervención en 12 voluntarios normales (40  $\pm$  13 años). Flujo en la boca durante 60 min de respiración tranquila (Biopac y Medical Graphics). Se analizaron las variables derivadas de la señal de flujo y la PCO<sub>2</sub> (Datex). Para el análisis de la señal (criterio de inclusión) se consideraron 3 umbrales de EST para la VE (VE de la 1er vs 2da mitad de su variación relativa de la media < 10 %, de la varianza < 50 %, de la autocorrelación (AU) < 25 %). Se definieron 2 criterios de EST de VE: 1) media y varianza, 2) media, varianza y AU (más estricto). Resultados. Se eliminaron 2 sujetos según el criterio 1, y 5 sujetos más según el criterio 2, de manera que se analizaron 10 y 5 PR respectivamente. Análisis de las variables: Criterio 1) 3 sujetos mostraron EST de todas las variables, la falta de la misma fue en Ti 1, Te 2, Ttot 3, Ti/Ttot 1, Vt 4, Vt/Ti 1 sujetos (ch2 NS). Criterio 2: ningún sujeto mostró EST de todas sus variables, la falta de la misma fue en Ti 3, Te 3, Ttot 3, Ti/Ttot 2, Vt 4, Vt/Ti 4 sujetos (ch2 NS). Relación no EST / EST: criterio 1: 12/48, criterio 2: 19/11 (z test < 0.001). Conclusiones. La coexistencia de no EST y EST de los componentes del PR, en presencia de una VE estacionaria sugiere que la VE emergente puede ser generada desde una red neural o de osciladores múltiples acoplados. Este tipo de análisis no sugiere la existencia de células marcapasos.

### 384b. (155) HÁBITOS DE SUEÑO, SOMNOLENCIA DIURNA Y RIESGO DE APNEAS DEL SUEÑO EN CONDUCTORES PROFESIONALES DE TRANSPORTE DE PASAJEROS DE CORTA DISTANCIA

Díez J.<sup>1</sup>; Vigo D.<sup>2</sup>; Cardinali D.<sup>3</sup>; Pérez Chada D.<sup>4</sup>

Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral, CONICET<sup>1</sup>; Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, CONICET<sup>2,3</sup>; Departamento de Neumonología, Hospital Universitario Austral<sup>4</sup>  
diezjoaquinjose@gmail.com

Introducción: La conducción de vehículos de transporte de pasajeros requiere un alto nivel de atención. El descanso representa el factor más importante para mantener una vigilia adecuada. Existe una creciente prevalencia del síndrome de apneas del sueño, sobre todo en poblaciones sedentarias, que condiciona en forma adversa la calidad de sueño. Objetivo: determinar el grado de asociación de características antropométricas, hábitos de sueño y somnolencia diurna con la presencia de riesgo elevado de apneas del sueño en conductores profesionales de transporte de pasajeros de corta distancia. Diseño del estudio: Se analizaron 870 cuestionarios de conductores varones de transporte urbano del Área Metropolitana de la Ciudad de Buenos Aires. Se registraron datos antropométricos, calidad de sueño (Índice de Calidad de Sueño de Pittsburgh, ICSP; mayor puntaje representa menor calidad), presencia de somnolencia diurna (Escala de Somnolencia diurna) y factores de riesgo para trastornos respiratorios durante el sueño (Índice Multivariado Predictor de Apnea, MAP; mayor puntaje representa mayor riesgo de apneas). Se dividió la muestra por la mediana del MAP y se analizaron diferencias mediante el test de t para muestras independientes. Los valores se expresan en



media  $\pm$  error estándar. Resultados: Respecto de los conductores con MAP bajo, los conductores con MAP elevado tienen mayor edad ( $43 \pm 0,70$  años vs.  $39 \pm 0,68$  años;  $p < 0,001$ ), mayor Índice de Masa Corporal (IMC) ( $31,71 \pm 0,45$  kg/m<sup>2</sup> vs.  $26,17 \pm 0,13$  kg/m<sup>2</sup>;  $p < 0,001$ ), peor calidad de sueño en el ICSP ( $7,58 \pm 0,54$  vs.  $5,55 \pm 0,49$ ;  $p < 0,001$ ) y mayor somnolencia diurna en la ESE ( $11 \pm 0,52$  vs.  $8 \pm 0,47$ ;  $p < 0,001$ ). Conclusiones: El riesgo de apnea del sueño se asoció a mayor IMC, mayor somnolencia diurna, menor cantidad de sueño y peor calidad de sueño. Esto marca la importancia del monitoreo de apnea del sueño en esta población.

### 385a. (574) REGULACIÓN DE VOLUMEN EN CÉLULAS RETINALES DE MÜLLER HUMANAS: ROL DE LOS GRADIENTES ELECTROQUÍMICOS

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

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 4 5 6</sup>; Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Consultorio de Neuroinmunología, Centro Universitario de Neurología Dr. J.M. Ramos Mejía, Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup>  
jmfbur@gmail.com

Las células de Müller de la retina son sometidas frecuentemente a hinchamiento (swelling) celular dado que se producen cambios inducidos por la luz en la composición del medio extracelular que dan lugar a hiposmolaridad. Este swelling es seguido de una respuesta reguladora de volumen (RVD, regulatory volume decrease) que es parcialmente mediada por flujos iónicos asociados a flujo de agua. Sin embargo, estos mecanismos de regulación son poco comprendidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de RVD en una línea de células de Müller (MIO-M1) e interpretar los resultados experimentales teniendo en cuenta, no solo variaciones en las permeabilidades iónicas, sino también variaciones en los gradientes electroquímicos. El RVD fue evaluado usando videomicroscopía de fluorescencia y se desarrolló un modelo matemático considerando el potencial transmembrana, potenciales de equilibrio, flujos iónicos, masa intracelular de los distintos iones, flujo de agua y volumen celular. La hiposmolaridad externa se generó variando o manteniendo constante la composición iónica externa. Nuestros resultados muestran que la magnitud del RVD depende del potencial transmembrana y los potenciales de equilibrio que, a su vez, dependen de la composición del medio extracelular. Mostramos que en la línea MIO-M1, canales de K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> están involucrados en el RVD. El aumento en la permeabilidad al K<sup>+</sup> da lugar a hiperpolarización, que solo es posible en presencia de un gradiente electroquímico para el K<sup>+</sup>. Esta hiperpolarización crea un gradiente electroquímico para el Cl<sup>-</sup>, que es un elemento clave para sobrellevar una regulación de volumen efectiva. La tasa e disipación del gradiente electroquímico para Cl<sup>-</sup>, y por lo tanto la tasa de RVD, serían dependientes de la permeabilidad al Cl<sup>-</sup>. Proponemos que la eficiencia del proceso de regulación de volumen depende no solo de la activación de canales iónicos, sino, del comportamiento de los gradientes electroquímicos para estos iones.

### 385b. (494) HOMEOSTASIS DE ATP EXTRACELULAR EN ERITROCITOS HUMANOS

Leal Denis M.<sup>1</sup>; Espelt M.<sup>2</sup>; Montalbetti N.<sup>3</sup>; Pablo Julio S.<sup>4</sup>  
IQUIFIB-UBA/CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
mflidenis@ffy.uba.ar

Varios estímulos fisiológicos promueven la liberación de ATP al medio extracelular. En eritrocitos humanos el AMPc induce la salida de ATP al participar en una vía de señalización que involucra a las proteínas Gi y Gs y a adenilato ciclasas (AC). El ATP extracelular (ATPe) resultante y sus productos de hidrólisis pueden activar receptores P (purinérgicos), mientras que su concentración es regulada por actividad ecto-ATPasa de ENTP-Dasas. El objetivo de este trabajo es estudiar la homeostasis del ATPe de eritrocitos humanos. Para ello se procederá a analizar la cinética de acumulación de ATPe teniendo en cuenta las vías

de liberación de ATP mediadas por proteína Gi, la activación de receptores P y la actividad ecto-ATPasa. La concentración de ATPe ([ATPe]) fue medida por luminometría utilizando la reacción de la luciferina-luciferasa. La liberación de ATP fue inducida por mastoparín-7 (Mas-7), activador de Gi, y cuantificada mediante el monitoreo de la cinética de acumulación de ATPe. La actividad ecto-ATPasa de eritrocitos fue estimada midiendo la producción de 32Pi a partir de 1  $\mu$ M [g-32P]ATP. En presencia de 10  $\mu$ M Mas-7 la [ATPe] mostró un fuerte aumento en el tiempo, alcanzándose un valor 9 veces mayor que el basal a los 20 min. El pretratamiento con toxina pertussis (bloqueante de Gi), 2-metil-tio-ADP (inhibidor de AC) o carbenoxolona (inhibidor de la salida de ATP por panexina 1) produjo una reducción en la salida de ATP de 67%, 65% y 57%, respectivamente. En síntesis, la salida de ATP activada por Mas-7 es bloqueada parcialmente por la toxina pertussis, indicando un mecanismo dependiente de la activación de Gi asociado a aumentos en el AMPc. El 2-metil-tio-ADP, un agonista del receptor P2Y13 que inhibe la adenilato ciclasa, generó una disminución en [ATPe]. Además, la disminución en [ATPe] por carbenoxolona indicaría una salida de ATP mediada por panexina 1. Con subsidios de UBACYT (20020100100090), CONICET (PIP1187) y ANPCyT (0151).

### 386a. (508) ROL DEL CANAL DE AGUA ACUAPORINA 2 (AQP2) EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS RENALES.

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

Laboratorio de Biomembranas, Departamento de Fisiología y Biofísica, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
giseladg@hotmail.com

Es sabido que los cambios transitorios de volumen que ocurren durante el ciclo celular, junto con la activación de mecanismos de transporte iónico sensibles a volumen, son necesarios para una adecuada proliferación celular. Nuestros estudios previos, en células renales, mostraron que en presencia de AQP2 aumenta la tasa de proliferación por un incremento en el tránsito por las fases S y G2/M del ciclo celular, asociado a la activación de canales de K<sup>+</sup> reguladores de volumen. Nuestra hipótesis plantea la activación sincronizada de un complejo funcional "AQP2-canales iónicos" que sería crucial para el ajuste fino del volumen celular y el consiguiente tránsito por las fases del ciclo. El objetivo del trabajo consistió en estudiar si el aumento temprano de volumen que ocurre durante la progresión desde la fase G1 a la S se correlaciona con cambios en la función y/o expresión de AQP2. Se utilizaron dos líneas celulares de túbulo colector cortical: WT-RCCD1 que no expresa AQP2 y AQP2-RCCD1 que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical. Las células fueron sincronizadas en el límite G1/S mediante un doble bloqueo con timidina. Se realizaron estudios a nivel funcional y molecular. Los experimentos de inmunoblotting no mostraron cambios en los niveles de expresión de AQP2 durante la sincronización. Los resultados funcionales mostraron que tanto la permeabilidad al agua como la actividad de los canales reguladores de volumen (%RVD, regulatory volume decrease) se encontraron disminuidos en las células AQP2-RCCD1 sincronizadas respecto a las no-sincronizadas, mientras que no se observaron diferencias significativas en las células WT-RCCD1. Podemos concluir que la proliferación aumentada en presencia de AQP2 podría deberse a que durante el pasaje por el punto de restricción desde la fase G1 a la fase S existe una inhibición en los mecanismos de RVD que permitiría a las células aumentar rápidamente su volumen y continuar su progresión por el ciclo celular.

### 386b. (593) RITMO CIRCADIANO DE TEMPERATURA Y SUEÑO / VIGILIA EN CONDUCTORES PROFESIONALES DE PASAJEROS DE LARGA DISTANCIA: RESULTADOS PRELIMINARES

Diez J.<sup>1</sup>; Vigo D.<sup>2</sup>; Perez Lloret S.<sup>3</sup>; Perez Chada L.<sup>4</sup>; Brangold M.<sup>5</sup>; Diego G.<sup>6</sup>; Perez Chada D.<sup>7</sup>; Cardinali D.<sup>8</sup>

Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Biomédicas, Uni-

versidad Austral, CONICET<sup>1</sup>; Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, CONICET<sup>2,3,4,8</sup>; Facultad de Medicina, UBA, Universidad Favaloro<sup>5</sup>; Laboratorio de Cronobiología, Depto. de Ciencia y Tecnología, UNQ, CONICET<sup>6</sup>; Departamento de Neumonología, Hospital Universitario Austral<sup>7</sup> diezjoaquinjose@gmail.com

**Introducción:** La seguridad vial en Argentina ha cobrado especial relevancia en los últimos años debido al creciente número de accidentes. A diferencia de otros lugares del mundo con extensiones geográficas amplias, nuestro país no cuenta con un sistema generalizado de postas de conductores, por lo que son comunes las jornadas de trabajo prolongadas donde se alternan en el manejo conductor y acompañante. El impacto de este sistema en diversas variables fisiológicas no ha sido estudiado. **Objetivo:** caracterizar el ritmo sueño vigilia y el ritmo circadiano de temperatura periférica en conductores profesionales de larga distancia en dos recorridos de distinta longitud. **Diseño del estudio:** se estudió en 56 conductores varones durante 6 días, los ritmos sueño-vigilia (mediante actigrafía) y de temperatura periférica corporal (mediante un sensor cutáneo de temperatura). Se evaluaron diferencias entre los recorridos Buenos Aires - Tucumán (BT, 1240 km) y Buenos Aires - Córdoba (BC, 700 km), mediante el test T de Student. Los valores son expresados como media  $\pm$  error estándar. **Resultados:** Los conductores del tramo Tucumán durmieron más que los del tramo Córdoba (BT:  $320 \pm 10$  min, BC:  $273 \pm 12$  min;  $p=0.008$ ), y éstos últimos tuvieron mayor amplitud de temperatura corporal que los del primer grupo (BC:  $0.63 \pm 0.06$  C<sup>o</sup>, BT:  $0.38 \pm 0.04$  C<sup>o</sup>;  $p=0.004$ ). **Conclusiones:** el tiempo de sueño efectivo en ambos grupos es escaso. Si bien los del tramo Córdoba duermen una hora menos que los del tramo Tucumán, éstos tienen menor amplitud del ritmo circadiano de temperatura. Esto puede deberse a una mayor variabilidad en los patrones de sueño propia del grupo del tramo Tucumán. **Financiamiento** Superintendencia de Riesgos del Trabajo (Ministerio de Trabajo, Empleo y Seguridad Social) en convenio con CONICET.

### 387. (611) LA ANGIOTENSINA II INCREMENTA LA LIBERACIÓN ENDOTELIAL DE PGI2 EN CONEJOS HIPERCOLESTEROLÉMICOS CON DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Medina M.<sup>1</sup>; Alberto M.<sup>2</sup>; Bernacki R.<sup>3</sup>; Sierra L.<sup>4</sup>; Saad S.<sup>5</sup>; Isla M.<sup>6</sup>; Jerez S.<sup>7</sup>

Facultad de Ciencias Naturales e IML de la Universidad Nacional de Tucumán<sup>1,3,4,5</sup>; Facultad de Ciencias Naturales e IML, INQUINOA (CONICET-UNT)<sup>2,6</sup>; Facultad de Ciencias Naturales e IML, INSIBIO (CONICET-UNT)<sup>7</sup> medmirta@yahoo.com.ar

En trabajos previos demostramos que una dieta rica en colesterol (DH) produce un incremento de la respuesta contráctil a angiotensina II (Ang II) dependiente de endotelio y de productos de la ciclooxigenasa. **Objetivo:** estudiar el efecto de una DH en variables metabólicas, función endotelial y producción de prostanoïdes (PR) en aorta de conejo. **Métodos:** Se utilizaron 2 grupos de conejos: DC (n=6), dieta normal y DH (n=6), suplementada con colesterol al 1%. A las 5-6 semanas se pesaron, se realizó test de tolerancia a la glucosa, se extrajo sangre para perfil lipídico e insulinemia y se midió presión arterial. Las aortas torácicas fueron disecadas y se analizó % de relajación a Ach y liberación de nitritos. Luego, las arterias con (CE) y sin endotelio (SE) de conejos HC se estimularon (T) o no (C) con Ang II. Los PR liberados se midieron por HPLC. **Resultados:** Una DH incrementó los niveles de colesterol (g/l,  $6.41 \pm 2.2$  vs. DC:  $0.49 \pm 0.1$ ;  $p < 0.001$ ) y de LDL-colesterol (g/l,  $0.35 \pm 0.9$  vs. DC:  $0.18 \pm 0.04$ ;  $p < 0.05$ ) pero no modificó el peso, la tolerancia a la glucosa, la insulinemia ni la presión arterial. Se observó disminución de la relajación a Ach (%),  $54.5 \pm 5.8$  vs. DH:  $33.3 \pm 3.4$ ;  $p < 0.01$ ) y de la liberación de nitritos (pmol/mg,  $512 \pm 105$  vs  $157.6 \pm 24$  en DH). En arterias CE se detectaron prostaglandinas PG 6-cetoF1 $\alpha$  y tromboxano (TX) B2, metabolitos de prostaciclina (PGI2) y TXA2. La Ang II incrementó los niveles de PG 6-ceto F1 $\alpha$  (ng PR/mg tejido, C:  $6.6 \pm 1.8$  vs. T:  $12.2 \pm 1.9$ ,  $p < 0.05$ ). En arterias SE no se detectaron los PR ana-

lizados. **Conclusión:** el tratamiento con DH genera un modelo de conejo hipercolesterolémico con disfunción endotelial sin factores de riesgo asociados e incrementa los niveles de PGI2 liberada por Ang II desde el endotelio. Considerando que en ciertas situaciones fisiopatológicas la PGI2 es vasoconstrictora esta PG puede ser la responsable del aumento en la respuesta contráctil a Ang II, o bien el incremento de la PGI2 puede ser un mecanismo compensador.

### 388. (634) EL TRANSPORTE DE BICARBONATO ACOPLADO AL SODIO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS ES MEDIADO POR EL COTRANSPORTADOR NA+/HCO3- ELECTRO-NEUTRO NBCN1

Ciancio M.<sup>1</sup>; Giambelluca M.<sup>2</sup>; Orłowski A.<sup>3</sup>; Gende O.<sup>4</sup>; Aiello E.<sup>5</sup>

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP<sup>1,2,3,4,5</sup> carocian@hotmail.com

Recientemente describimos la presencia en neutrófilos humanos de un transportador de bicarbonato alcalinizante que, conjuntamente con el conocido intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE), contribuye con el control del pH intracelular (pHi). El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar este transportador. Se utilizaron neutrófilos humanos cargados con el indicador fluorescente BCECF para medir los cambios del pHi. El pHi basal ( $7.19 \pm 0.07$ , n=4) no se modificó significativamente cuando se adicionó EIPA, bloqueante del NHE o S0859, bloqueante selectivo del cotransportador Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NBC). Sin embargo, cuando en la presencia continua de EIPA, se adicionó S0859 el pHi basal disminuyó significativamente ( $7.12 \pm 0.06$ , n=4,  $p < 0.05$ ), indicando que ambos transportadores, el NHE y el NBC, son necesarios para mantener el pH basal en éstas células. Se han descrito al menos tres isoformas de los NBC humanos, dos electrogénicas, NBCe1 y NBCe2 (1 Na<sup>+</sup>:2 ó 3 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y uno electroneutra, NBCn1 (1 Na<sup>+</sup>:1HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Con el objetivo de identificar la isoforma del NBC involucrada en el mantenimiento del pHi de éstas células, se despolarizó el potencial de membrana aumentando la concentración potasio extracelular desde 5 a 45 mM, y se comparó la recuperación de la acidosis inducida por un pulso de amonio en la constante presencia de EIPA. La despolarización no modificó la recuperación de la acidosis mediada por el NBC ( $\Delta pHi/5$  min =  $0.077 \pm 0.006$ , n=6, en [K<sup>+</sup>]=5 mM vs.  $0.093 \pm 0.016$ , n=6, en [K<sup>+</sup>]=45mM), sugiriendo que el transporte no es electrogénico. Con el objetivo de confirmar esta hipótesis se trataron neutrófilos con anticuerpos contra las tres isoformas en experimentos de microscopía confocal, observándose señal únicamente con el anticuerpo contra el transportador electroneuro. Los resultados del presente trabajo nos permiten concluir la isoforma que regula el pHi de los neutrófilos humanos es NBCn1.

### 389. (641) THE ULTRA-ENDURANCE EXERCISE-INDUCED MUSCLE DAMAGE IS ACCOMPANIED BY INCREASED SYSTEMIC OXIDATIVE METABOLISM, PROTEIN OXIDATION AND NEOPTERIN LEVELS

Scheffer D.<sup>1</sup>; De Lucas R.<sup>2</sup>; Caputo F.<sup>3</sup>; Souza K.<sup>4</sup>; Sigwalt A.<sup>5</sup>; Ghisoni K.<sup>6</sup>; Remor A.<sup>7</sup>; Roos A.<sup>8</sup>; Guglielmo L.<sup>9</sup>; Latini A.<sup>10</sup>

Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil<sup>1,6,7,10</sup>; Laboratório de Esforço Físico, Centro de Desportos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil<sup>2,4,8,9</sup>; Laboratório de Pesquisa em Desempenho Humano, Centro de Ciências da Saúde e Do Esporte, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil<sup>3</sup> deborascheffer@hotmail.com

Exercise increases the production of reactive oxygen and nitrogen species, which could induce adaptive mechanisms involving antioxidant and repairing systems. Ultra-endurance competition represents an extreme challenge to human metabolism, since it imposes strenuous physical load with high energy demands, thermal stress and dehydration, severe muscle damage and fatigue, and oxidative stress. The present study investigated

some systemic biochemical markers, including parameters of muscle damage, oxidative stress and inflammatory response in athletes before and after an ultra-endurance exercise. Thirteen subjects, who completed the Multisport Brazil Race, participated in this study. The Multisport Brazil Race involves different sports modalities, including 28.5 km of downhill trail running, 42.5 km of mountain biking, and 17.5 km of kayaking activities. Blood samples were collected pre- and post-race for performing the biochemical measurements. Increased oxidative protein (increased carbonyl formation, up to 653%) and lipid damage (increased formation of malondialdehyde, up to 127%) were found in post-race samples. Additionally, oxidative metabolism was increased as shown by increased complex II activity (up to 189%) and FADH<sub>2</sub>-linked oxygen consumption (up to 263%) by platelet-rich plasma. The levels of the sensitive inflammatory marker, neopterin, were significantly increased (up to 169%) and as expected, lactate dehydrogenase (up to 122%) and creatine kinase (up to 1413%) activities were markedly augmented in post-race blood samples. On the other hand, complex I, IV and catalase activity, were not altered after race. The results brought here, reveals that exhaustive aerobic exercise causes oxidative stress and inflammation, probably as a result of increased oxidative metabolism. We propose that the measurement of these systemic parameters might serve as a non-invasive diagnostic tool for exercise performance and physiology.

**390. (642) EL TRANSPORTE DE BICARBONATO ENDÓGENO DE LAS CÉLULAS DE RIÑÓN EMBRIONARIAS HEK293 ES MEDIADO POR EL COTRANSPORTE NA<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ELECTRONEUTRO (NBCN1) Y ES MODULADO POR LA CONCENTRACIÓN DE CO<sub>2</sub>**

Orlowski A.<sup>1</sup>; Álvarez B.<sup>2</sup>; Aiello E.<sup>3</sup>

Centro de Investigaciones Cardiovasculares<sup>1,2,3</sup>  
a.orlowski@conicet.gov.ar

La línea celular HEK293 es utilizada como un sistema de expresión para el estudio de transportadores de membrana. Cuando no son transectadas, se encuentra una actividad alcalinizante endógena atribuida a la presencia del intercambiador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHE). Sin embargo, en presencia de bloqueo del NHE persiste un mecanismo alcalinizante mediado por bicarbonato. El cotransporte Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (NBC) regula el pH en una amplia variedad de tejidos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el transporte dependiente de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> y su regulación por CO<sub>2</sub>. Células HEK293 cultivadas al 5% CO<sub>2</sub> fueron cargadas con el indicador sensible a pH, BCECF-AM. Las células se acidificaron con un prepuiso de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y se calculó la velocidad máxima de recuperación del pH luego de bloquear al NHE con EIPA (Vi, [DpH/s]). Se halló una recuperación insensible a EIPA (Control= 0.20±0.01, n=21; EIPA= 0.083±0.008, n=14), que fue totalmente abolida en presencia de S0589, un inhibidor selectivo del NBC, (EIPA+S0589= -0.0014±0.003, n=4), como así también cuando se utilizó un medio con EIPA y sin Na<sup>+</sup> o sin HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (s/Na<sup>+</sup>= 0.009±0.005, n=4; HEPES= -0.023±0.02), indicando la existencia de un mecanismo alcalinizante dependiente de Na<sup>+</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Se identificó a que isoforma de NBC corresponde mediante Western-Blot utilizando anticuerpos específicos para las isoformas NBCe1, NBCe2 y NBCn1, hallándose únicamente una banda correspondiente a NBCn1. Se estudió la regulación por CO<sub>2</sub> cultivando las células en una atmósfera al 10% de CO<sub>2</sub> por 24 horas, luego se midió la expresión y la actividad del NBCn1. Se obtuvo un incremento significativo en la expresión (5%= 0.11±0.02, n=4; 10%= 0.34±0.03, n=4) correlacionado con el aumento de la actividad en presencia de EIPA (5%= 0.08±0.01, n=4; 10%= 0.22±0.01, n=4). Concluimos que en las células embrionarias de riñón humano existe el cotransporte NBCn1 encargado de controlar el pH y se encuentra regulado positivamente por la concentración de CO<sub>2</sub> del medio.

**391. (688) ACCIÓN CITOTÓXICA DE E.COLI O113:H21 QUE EXPRESA TOXINA SHIGA 2 Y SUBTILASA EN COLON HUMANO IN-VITRO. COMPARACIÓN DE CEPAS SALVAJES Y MUTADAS.**

Gerhardt E.<sup>1</sup>; Massó M.<sup>2</sup>; Moreira A.<sup>3</sup>; Zotta E.<sup>4</sup>; Ibarra C.<sup>5</sup>  
Lab Fisiopatogenia, Depto Fisiología, Facultad de Medicina,

UBA<sup>1,2,4,5</sup>; Div de Cirugía Gastroenterológica - Hospital de Clínicas - UBA<sup>3</sup>  
elizabeth.fmed@gmail.com

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es una causa importante de enfermedad gastrointestinal en humanos. Estas infecciones pueden resultar en complicaciones sistémicas conocidas como Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) causadas por las toxinas Shiga (Stx1, Stx2 y sus variantes) producidas por cepas STEC O157 y no O157. El 70% de los casos de SUH son producidos por cepas STEC O157:H7 y el resto por otros serotipos como el O113:H21 que produce Stx2 y Subtilasa (SubAB). Se evaluó la acción citotóxica de cepas de STEC O113:H21 aislada de casos de SUH en Argentina (370/02, Marta Rivas, AN-LIS- Malbrán) y en Australia (98NK2, James Paton, Universidad de Adelaida, Australia) y se comparó con los efectos obtenidos con STEC 98NK2 mutada en Stx2 (98NK2Δstx2) o en SubAB (98NK2ΔsubAB). La mucosa colónica se montó en una cámara de Ussing y el flujo neto absorbivo de agua (Jw) y la corriente de cortocircuito (Isc) se registraron simultáneamente. Al final del experimento, los tejidos se procesaron para microscopía óptica. La incubación del lado mucoso del tejido con 200 μl de STEC 370/02 o 98NK2 inhibió significativamente el Jw y produjo un aumento de Isc. La inhibición del Jw es consecuencia de la acción de ambas toxinas ya que las cepas mutadas 98NK2Δstx2 y 98NK2ΔsubAB inhibieron el Jw en aprox un 40% y 90% respectivamente. Los cambios en Isc fueron consecuencia de la presencia de la bacteria más que de las toxinas ya que Stx2 y SubAB pura inhiben el Jw y no alteran la Isc. La observación microscópica mostró que SubAB pura y la cepa 98NK2Δstx2 producen destrucción del epitelio superficial mientras que la cepa 98NK2ΔsubAB produce necrosis del tercio superior de las criptas y focos hemorrágicos. Las cepas salvajes STEC 370/02 y 98NK2 presentan una severa necrosis de superficie y criptas. Este es el primer trabajo que demuestra la contribución de SubAB a la alteración en la funcionalidad e integridad del colon humano que produce la infección por STEC O113:H21.

**392. (692) ACCIÓN CITOTÓXICA DE LA TOXINA SHIGA 2 EN RATAS EN ESTADIO TEMPRANO DE PREÑEZ**

Sacerdoti F.<sup>1</sup>; Zotta E.<sup>2</sup>; Franchi A.<sup>3</sup>; Ibarra C.<sup>4</sup>

Lab Fisiopatogenia, Depto Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,4</sup>; CEFYBO-CONICET- UBA<sup>3</sup>  
fiasacerdoti@gmail.com

Introducción: Escherichia coli enterohemorrágica (STEC) causa diarrea acuosa, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Las infecciones asociadas con STEC podrían ser una de las causas de morbilidad fetal en mujeres embarazadas. El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga (Stx1, Stx2 y sus variantes) que produce necrosis y apoptosis en los órganos blanco. Estudios previos del laboratorio demuestran que la administración a ratas en estadio tardío de preñez (15gd) de sobrenadante de cultivo de E. coli recombinante que expresa Stx2 y contiene LPS (sStx2) induce parto prematuro de fetos muertos. En el presente trabajo se analizó los efectos de sStx2 sobre la preñez en ratas durante la gestación temprana (7 gd). Materiales y Métodos: Ratas SD fueron inyectadas i.p. con 0.5 ml de sStx2 que contiene aproximadamente 0.2 ng Stx2/g de peso corporal y 75 ng LPS / μg Stx. Las ratas controles fueron tratadas con el mismo volumen de sobrenadante de E. coli que sólo contiene LPS (sControl). En el Grupo 1 se estudió la progresión de la preñez y en el Grupo 2, las ratas se sacrificaron 8 días post-inyección y se extrajeron muestras de tejido de la unidad materno-feto-placentario para realizar estudios histológicos. Resultados: En el Grupo 1, la preñez no llegó a término en el 75% de las ratas tratadas con sStx2 mientras que las ratas controles (100%) tuvieron crías normales y a término. En el Grupo 2, las ratas tratadas con sStx2 presentaron placentas congestivas y fetos friables. En cambio las ratas tratadas con sControl tuvieron placentas y fetos normales. El estudio histológico mostró áreas de necrosis y edemas en tejido placentario y fetal de ratas tratadas con sStx2 mientras que el útero mantuvo una histoarquitectura conservada. Conclusión:

Estos resultados sugieren que la acción citotóxica de Stx2 en la unidad feto-materno-placentaria podría ser causa de aborto en estadio temprano de preñez.

**393. (716) EFECTO DE LA ACIDOSIS EN LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS RENALES: PAPEL DE LOS INTERCAMBIADORES  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Y LA EXPRESIÓN DE LA AQP2**

Dvorkin J.<sup>1</sup>; Di Giusto G.<sup>2</sup>; Fernandez J.<sup>3</sup>; Ford P.<sup>4</sup>; Capurro C.<sup>5</sup>; Rivarola V.<sup>6</sup>

Lab Biomembranas, Dpto Cs Fisiológicas, Fac Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
vrivarola@yahoo.com

El control del pH intracelular (pHi), regulado en parte por los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (NHE) es necesario para una correcta modulación de los procesos de proliferación. De la asociación entre los mecanismos de proliferación y el pHi surge la posibilidad que una alteración crónica del pH los modifique. 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. El objetivo de este trabajo fue investigar los posibles mecanismos implicados en la regulación de la proliferación celular e indagar si la acidosis los modificaba. Para ello se utilizaron dos líneas celulares de túbulo colector cortical con características bien definidas: WT-RCCD1, la cual no expresa AQPs, y AQP2-RCCD1 que expresa constitutivamente AQP2 en la membrana apical, y se realizaron estudios a nivel funcional (tasa de proliferación y medición de pHi) ante una exposición o no a una acidosis. Los resultados muestran que a pH 7.4 las células que expresan AQP2 poseen aumentada la actividad de la isoforma NHE2 ( $p < 0.05$ ,  $n=7$ ) pero no de la NHE1. Paralelamente los estudios de proliferación utilizando el inhibidor específico HOE 694 mostraron que mientras que la NHE1 inhibe la proliferación de las células AQP2 estimula las WT. Por otra parte la isoforma NHE2 aumentaría la proliferación de ambas líneas, siendo este efecto mayor en las células AQP2 ( $p < 0.05$ ,  $n=30$ ). Finalmente, la exposición a medios ácidos aumentó la proliferación solo en las células que expresan AQP2 ( $p < 0.05$ ,  $n=30$ ), siendo este efecto asociado a un aumento de la proliferación mediada por una desinhibición de NHE1. En conjunto estos resultados sugieren que en presencia de AQP2 existe una modulación diferencial de la isoformas NHE1 y NHE2 lo que sería relevante en la activación de la proliferación.

## HEMATOLOGÍA 1

**394. (41) EFECTO DE GAL-1 EN PLAQUETAS HUMANAS EN REPOSO Y ACTIVADAS CON TROMBINA SOBRE LA CAPTACIÓN – LIBERACIÓN DE MEPACRINA POR GRÁNULOS DENSOS**

González M.<sup>1</sup>; Tapia Cadena M.<sup>2</sup>; Fink N.<sup>3</sup>

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP<sup>1 2 3</sup>  
mmgs5@yahoo.com.ar

Las galectinas son una familia filogenéticamente conservada de lectinas, que tienen homología de secuencias aminoácidas y dominios de reconocimiento a carbohidratos (CRD), unen lactosa y otros oligosacáridos  $\beta$ -galactosídicos y ejercen múltiples funciones. Se sabe que las plaquetas incorporan selectivamente varios compuestos derivados de la acridina, tal como la mepacrina (Mp), en los gránulos densos (GDs). Con el objetivo de extender nuestros estudios, investigamos el efecto de Gal-1 (0,1  $\mu\text{M}$ ) sobre la descarga de GD en Plths en reposo o activadas con trombina (Tr, 0,2UI/ml, durante 15 a 120 s), realizando un procedimiento de marcado con Mp (0,2 mM) para medir el contenido de GDs, en diferentes condiciones experimentales. Se evaluó mediante microscopía de fluorescencia ya que la Mp se excita con luz de longitud de onda de 488nm. Se llevaron a cabo 6 experimentos (por triplicado) con Plths obtenidas de donadores voluntarios sanos con consentimiento informado y sin ingesta de medicación previa

durante 10 días. Se obtuvo una media de  $5,61 \pm 0,5$  gránulos para Plths control, similar al de Plths tratadas con Gal-1 inhibida con lactosa 100mM ( $6,37 \pm 0,5$ ). En Plth activadas con diferentes concentraciones de Tr y de Gal-1, en forma aislada o simultánea, se observaron cambios significantes en la cantidad ( $p < 0.05$ ) y en la intensidad de la fluorescencia de GDs. Mediante esta prueba de captación/liberación de Mp se tiene una evidencia más de que Gal-1 tiene un efecto sobre la fisiología plaquetaria influyendo en la degranulación y que es un potencial agonista - algo más débil que Tr,- que podría tener un uso potencial como reactivo en enfermedades de pool de depósito y otros desórdenes plaquetarios.

**395. (134) LA PRESENCIA DE QUERCETINA PREVIENE EL DAÑO PRODUCIDO POR EL ARSÉNICO (V) EN LA MEMBRANA DE LOS GLÓBULOS ROJOS HUMANOS**

Huarte M.<sup>1</sup>; Piehl L.<sup>2</sup>; Bollini A.<sup>3</sup>; Hernández G.<sup>4</sup>; Rasia M.<sup>5</sup>; Mengarelli G.<sup>6</sup>; Casco C.<sup>7</sup>; Ruiz M.<sup>8</sup>; Visconti M.<sup>9</sup>; Bazzoni G.<sup>10</sup>; Rubín De Celis E.<sup>11</sup>

Cátedra de Física, FFyB, UBA<sup>1 2 11</sup>; Cátedra de Física Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>3 4 5 6 7 8 9 10</sup>  
monicahuarte@hotmail.com

Está demostrado que el arsénico produce alteración de los parámetros reológicos de la microcirculación. En trabajos previos, observamos cambios en la fluidez de membrana (FM), la deformabilidad eritrocitaria (DE), modificación de la forma celular y la capacidad agregante de los glóbulos rojos humanos (GRh) en presencia de As (V), así como producción de TBARS. En este trabajo, se propone que la quercetina (QC), un compuesto polifenólico antioxidante, podría prevenir los cambios producidos por el As (V). Se incubaron GRh a 37 °C en presencia de: I. PBS 40'; II. QC 3  $\mu\text{M}$  10', PBS 30'; III. PBS 10', As(V) 0,32  $\mu\text{M}$  30'; IV. QC 3  $\mu\text{M}$  10', As(V) 0,32  $\mu\text{M}$  30'. Se analizó fluidez de membrana y deformabilidad eritrocitaria. La FM se determinó a través del parámetro de orden (S) del ácido 5-doxil esteárico, utilizando Resonancia de Espín Electrónico. La DE se evaluó mediante el índice de rigidez (IR) por filtración con membrana micropore (5 microm). Los resultados (media  $\pm$  SEM) fueron: i) S I:  $0.671 \pm 0.001$ ; II:  $0.674 \pm 0.002$ ; III:  $0.684 \pm 0.003$ ; IV:  $0.674 \pm 0.003$  y ii) IR I:  $8.30 \pm 0.55$ ; II:  $7.97 \pm 0.59$ ; III:  $10.79 \pm 0.75$ ; IV:  $8.52 \pm 0.50$ . Se observó que el tratamiento con QC previo al agregado de As (V) inhibió el aumento producido por éste en los parámetros S e IR (ANOVA, \*  $p < 0.05$ ,  $N=11$ ), mientras que la QC por sí sola no produjo modificaciones significativas de los mismos con respecto al control. Dado que a mayor S menor FM (mayor rigidez) y a mayor IR menor DE, se concluye que la QC inhibe la disminución de fluidez de membrana (al menos en la zona polar de la bicapa lipídica, lugar donde se ubica el marcador utilizado) y la pérdida de deformabilidad producida por el As (V) sobre la membrana celular eritrocitaria. Podríamos inferir que la QC ejercería una acción protectora de la membrana celular evitando la lipoperoxidación debido a su capacidad antioxidante. Dicha protección mantendría la integridad de la membrana eritrocitaria, manteniendo su elasticidad y la forma celular.

**396 (177) EFECTO IN VITRO DEL METROTEXATO SOBRE LA AGREGACIÓN ERITROCITARIA**

Martino M.<sup>1</sup>; Svetaz M.<sup>2</sup>; Urli L.<sup>3</sup>; Volpintesta R.<sup>4</sup>; Rasia M.<sup>5</sup>; Luquita A.<sup>6</sup>

Cátedra de Biofísica, Fac de Cs Médicas, UNR<sup>1 3 5 6</sup>; Fac Cs Bioq y Farm, UNR<sup>2</sup>; Área reumatología, Fac Cs Médicas<sup>4</sup>  
matote81@hotmail.com

El metotrexato ( Mtx) es un fármaco antimetabolito usado en el tratamiento de la artritis reumatoidea (concentraciones séricas máximas de 0,1 a 2  $\mu\text{M}$ ). La anemia es un efecto adverso, por lo que decidimos estudiar la acción directa del Mtx sobre la reología eritrocitaria. En primera instancia demostramos que el Mtx -a dosis menores de 1  $\mu\text{M}$ - causa el deterioro de la deformabilidad y la forma eritrocitaria. Estos resultados sugieren que dichas alteraciones modificarían la capacidad de agregarse de los eritrocitos, por lo que nos propusimos como objetivo: estudiar la agregabilidad eritrocitaria en presencia de Mtx. Metodología: Se utilizó sangre

de dadores normales, previo consentimiento por escrito. Cada muestra se fraccionó en 5 partes, una se usó como control (C, n=24) y a las restantes se le agregó concentraciones crecientes de Mtx (0,5, 0,75, 1 y 5  $\mu$ M (n=24 para cada concentración). Todas las alícuotas se incubaron 120 minutos a 37°C y en ellas se determinó la agregación eritrocitaria por densitometría óptica, obteniéndose dos parámetros: T que estima el tamaño promedio de los agregados y V que estima la velocidad inicial del proceso. Datos presentados como mediana y rango y analizados con test de Kruskal-Wallis para datos apareados. Resultados. Tamaño de los agregados (T): C: 1,925 (1,74-1,99); Mtx 0,5  $\mu$ M: 1,94 (1,40-1,99); Mtx 0,75  $\mu$ M: 1,945 (1,88-2,0); Mtx 1  $\mu$ M: 1,94 (1,88-1,98); Mtx 5  $\mu$ M: 1,92 (1,88-1,99)(p = 0,304). Velocidad (V): C: 0,725 (0,42-1,66); Mtx 0,5  $\mu$ M: 0,50 (0,16-1,04)\*; Mtx 0,75  $\mu$ M: 0,53 (0,15-1,09)\*; Mtx 1  $\mu$ M: 0,715 (0,200-1,12)ns; Mtx 5  $\mu$ M: 0,62 (0,20-1,94)ns (\*p<0,05 respecto de C, ns no significativo). Conclusiones: El Mtx no altera significativamente el tamaño de los agregados. A concentraciones menores de 1  $\mu$ M, el Mtx disminuye la velocidad de agregación así como rigidiza los eritrocitos (resultado anterior), sin embargo, a esa o a mayor concentración, la velocidad no se modifica en concordancia con una deformabilidad no alterada.

### 397. (212) INTERACCIÓN MONOCITOS-PLAQUETAS-ENDOTELIO: REGULACIÓN POR ESTEROIDES OVÁRICOS

Sandoval M.<sup>1</sup>; Cutini P.<sup>2</sup>; Campelo A.<sup>3</sup>; Rauschemberger M.<sup>4</sup>; Massheimer V.<sup>5</sup>

*Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Unidad Básica Química, Dpto Ciencias Básicas, UTN, Facultad Regional Bahía Blanca<sup>1</sup>; Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, CONICET<sup>2,3,4,5</sup> massheim@uns.edu.ar*

En este trabajo investigamos la acción de los esteroides ováricos progesterona (Pg), testosterona (T) y estrona (E1) en la interacción de monocitos-plaquetas-endotelio. Estudiamos la adhesión de monocitos (Am) y de plaquetas (Ap) al endotelio vascular en condiciones basales o frente a estímulos inflamatorios. Empleamos células endoteliales (CE) obtenidas por cultivo primario a partir de aorta de ratas Wistar. Para la Am, las CE fueron tratadas con los esteroides (24 hs) en presencia o ausencia de LPS, y luego incubadas con una suspensión de monocitos. En condiciones basales, E1 inhibió la Am (31% s/c, p<0.01), en cambio los restantes esteroides no mostraron diferencias respecto al control. Como la Am o la Ap dependen de la expresión de moléculas de adhesión (CAMs), empleando RT-PCR evaluamos el efecto de los esteroides sobre la expresión de CAMs endoteliales. En concordancia con los resultados de Am, los esteroides redujeron los niveles de ARNm de ICAM-1. Empleando citometría de flujo demostramos que en monocitos, el tratamiento con E1 inhibió un 38% (p<0.01) la expresión de CD11b (integrina  $\alpha$ IIb que une con ICAM-1). En CE tratadas con LPS, E1 y Pg revirtieron la Am inducida por LPS (24 $\pm$ 2.8; 23 $\pm$ 2.9 vs 38 $\pm$ 3.1 monoc./cpo, Pg; E1 vs LPS, p<0.01). En los estudios de Ap, las plaquetas se adicionaron sobre CE en monocapa e incubadas 24 hs con las hormonas, en presencia o ausencia de trombina. En condiciones basales, Pg disminuyó un 20% la Ap (p<0.05), T no indujo cambios significativos y E1 la incrementó en un 38% (p<0.05). Los niveles de ARNm de P-selectina (CAM endotelial que media la Ap) aumentaron en el grupo tratado con E1 respecto al control. La Ap inducida por trombina fue significativamente inhibida por el pretratamiento con las hormonas (p<0.05). Estos resultados sugieren que los esteroides gonadales modulan la interacción de los elementos formes sanguíneos con el endotelio vascular, con una marcada tendencia a atenuar la disfunción endotelial inducida por la inflamación.

### 398. (248) SINERGISMO ENTRE ASNAO2 Y EL INHIBIDOR DE PROTEOSOMA MG132 SOBRE LA INDUCCIÓN DE MUERTE EN CÉLULAS U937 (LEUCEMIA PROMONOCÍTICA) Y PRODUCCIÓN DE BAJOS NIVELES DE ANIÓN SUPERÓXIDO

Lombardo T.<sup>1</sup>; Cavaliere V.<sup>2</sup>; Papademetrio D.<sup>3</sup>; Costantino S.<sup>4</sup>; Blanco G.<sup>5</sup>; Alvarez E.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Immunotoxicología (LaITO), IDEHU-CONICET, Hospital de Clínicas, José de San Martín, UBA<sup>1,5</sup>; IDEHU-CONICET-Cátedra de Inmunología-FFyB, UBA<sup>2,3,4,6</sup> tlombardo@ffy.uba.ar*

El incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno ha sido citado usualmente como mecanismo determinante de sinergismo en la inducción de muerte celular por drogas combinadas con arsenito. Sin embargo, el efecto resultante de la combinación de drogas anti-leucémicas raramente puede ser anticipado sólo sobre la base de mecanismos moleculares conocidos. Evaluamos la asociación entre citotoxicidad individual y combinada de arsenito de sodio (AsNa) con MG132 y CAPE y los niveles de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) intracelular en las líneas U937 (leucemia aguda promonocítica) y Raji (linfoma de Burkitt). La citotoxicidad se evaluó por citometría de flujo con iodo de propidio y fluoresceína diacetato, el coeficiente de interacción (CI) entre drogas se calculó por el método de Chou-Talalay, los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se determinaron por citometría de flujo con dihidroetidina y las diferencias en las medianas de los tratamientos se analizaron con el test de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn determinando diferencias en las sumas de rangos. La combinación AsNa+MG132 en U937 produjo niveles bajos de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a 6 hs y 24 hs post-tratamiento (diferencias en las sumas de rangos con respecto al basal: 13230 y -3837 respectivamente; p<0.001), y fue sinérgica en todo el rango de efecto citotóxico (CI<1). En la línea Raji AsNa+MG132 produjo niveles bajos de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a los mismos tiempos (8229 y 23640 respectivamente; p<0.001) pero resultó en antagonismo (CI>1). La combinación AsNa+CAPE produjo niveles elevados de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a los mismos tiempos (43110 y 17790 para U937, 58680 y 46340 para Raji) pero resultó en antagonismo en ambas líneas (CI>1). Al tratar las células U937 con AsNa+MG132 junto con una concentración subcitotóxica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80  $\mu$ M), se incrementó la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el sinergismo trocó en antagonismo. A partir de estos datos podemos concluir que el sinergismo entre AsNa y MG132 en células U937 depende de la producción temprana de bajos niveles bajos de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

### 399. (320) ROL DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS Y ACCIÓN DE LA ERITROPOYETINA EN LA MUERTE PROGRAMADA DEL ERITROCITO.

Vota D.<sup>1</sup>; Maltaner R.<sup>2</sup>; Nesse A.<sup>3</sup>; Vittori D.<sup>4</sup>

*Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, CONICET<sup>1,2,3,4</sup>*

*dalana\_vota@qb.fcen.uba.a*

Previamente demostramos diferencias entre los mecanismos de eritropoiesis inducida por estrés oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub>) o aumento de calcio por ionóforo A23187 (ICa) en glóbulos rojos (GR). La observación de banda 3 fosforilada, sólo en el primer modelo, indujo a estudiar el rol de quinasas y fosfatasa (citometría de flujo y Western blotting). Un aumento de la actividad de la fosfatasa asociada a banda 3, PTP1B en presencia de ICa (C 63 $\pm$ 4; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 55 $\pm$ 4; ICa 96 $\pm$ 2 UA; P<0,05, n=3), explica la ausencia de fosforilación de banda 3 en GR incubados con A23187/Ca<sup>2+</sup>. La actividad aumentada de PTP1B sería inducida por calpaína, a su vez activada por el incremento de calcio celular, ya que, la inhibición de calpaína por calpastatina previno el aumento de actividad de la fosfatasa. En ambos modelos, la traslocación de fosfatidilserina (PS) disminuyó por inhibición de PI3K y aumentó por inhibición de fosfatasa en forma significativa. Entre éstos, se demostró la participación de PTP1B por aumento de exposición de PS en ensayos de inhibición específica (CinnGel) (C 3 $\pm$ 0,6; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 19 $\pm$ 2,0; Cin-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 32 $\pm$ 4,0; ICa 29 $\pm$ 0,3 Cin-ICa 41 $\pm$ 5,0%; P<0,05, n=3). Se ha reportado que la eritropoyetina (Epo) podría tener un efecto directo sobre GR en ciertas patologías. La presencia de Epo previno completamente el aumento de ROS (C 266 $\pm$ 43; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 535 $\pm$ 561; Epo-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NaNO<sub>2</sub> 263 $\pm$ 55 UA; P<0,05, n=6) y, parcialmente, el de lipoperoxidación, inducidos por agentes oxidantes. En los dos modelos, Epo indujo aumento del calcio intracelular y no implicó la traslocación de PS. En conclusión, se destaca el rol del desbalance de fosforilación de proteínas en la señalización de eritropoiesis y la

ausencia de fosforilación de banda 3 en el modelo ICa, asociada al aumento de actividad de PTP1B. El incremento de calcio celular en presencia de Epo explicaría la incapacidad para prevenir la traslocación de PS, aunque, su acción antioxidante podría disminuir el estrés oxidativo generado en diferentes patologías.

**400. (546) INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR CON MODULACIÓN DE BNIP3 Y AUTOFAGIA POR ASNAO2 Y EL INHIBIDOR DEL PROTEOSOMA MG132 EN CÉLULAS LEUCÉMICAS MIELOIDES Y LINFOIDES**

Cavaliere V.<sup>1</sup>; Lombardo T.<sup>2</sup>; Costantino S.<sup>3</sup>; Papademetrio D.<sup>4</sup>; Anaya L.<sup>5</sup>; Blanco G.<sup>6</sup>; Alvarez E.<sup>7</sup>

Laboratorio de Inmunotoxicología (LaITO), IDEHU-CO-NICET-Cátedra de Inmunología-FFyB, UBA<sup>1 3 4 7</sup>; IDEHU-CO-NICET, Hospital de Clínicas, José de San Martín, UBA<sup>2 5 6</sup>; Laboratorio de Immunotoxicología (LaITO), IDEHU-CO-NICET, Hospital de Clínicas, José de San Martín, UBA<sup>5 6</sup> vcavaliere@ffy.uba.ar

BNIP3 es una proteína de la familia Bcl-2 que induce muerte celular por inserción en la membrana mitocondrial en tanto la localización nuclear se asocia a resistencia a drogas citotóxicas. BNIP3 también induce autofagia y en algunas neoplasias se observó su silenciamiento epigenético. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la modulación de BNIP3 y los niveles de autofagia en células leucémicas U937, K562 y Raji por tratamiento con arsenito de sodio (NaAsO<sub>2</sub>) y MG132. Determinamos el efecto citotóxico 90% (EC90) a 72 hs por citometría de flujo y con los valores obtenidos para cada droga en cada línea se evaluó: 1) autofagia a 24 hs por expresión de LC3 y tinción con monodancyl-cadaverina (MDC) por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia; 2) la expresión y localización subcelular de BNIP3 por western blot en fracciones proteicas nucleares y citoplasmáticas; 3) la expresión de ARNm de BNIP3 por RT-PCR. Los resultados mostraron expresión basal de la proteína BNIP3 sólo a nivel nuclear. El tratamiento individual y combinado produjo un aumento de BNIP3 en la fracción citoplásmica con desaparición de la fracción nuclear en K562 y U937 pero no en Raji. En las tres líneas se observó un incremento de la expresión de LC3 con respecto a los basales luego del tratamiento con la dosis EC90 para AsNaO<sub>2</sub> (3.29, 1.20, 5.54 índice de incremento para K562, Raji y U937 respectivamente), MG132 (4.87, 2.24, 2.71) y la combinación de ambas (2.27, 3.90, 3.65). El ARNm de BNIP3 se detectó en U937 y K562 y no se modificó con los tratamientos. Contrariamente el nivel ARNm de BNIP3 fue muy bajo en las células Raji en todas las condiciones pero en presencia de 5-azacitidina (hipometilante) 5 mM aumentó su expresión. Concluimos que las drogas inducen muerte asociada con autofagia en las tres líneas celulares y traslocación núcleo-citoplásmica de BNIP3 por tratamiento con AsNaO<sub>2</sub> y MG132 en células U937 y K562 pero no en Raji debido en parte a su silenciamiento epigenético.

**401. (560) EFECTO DE LA INTERFERENCIA ENTRE FACTORES DE CRECIMIENTO Y ERITROPOYETINA CARBAMILADA EN CÉLULAS NEURONALES Y ERITROIDES**

Chamorro M.<sup>1</sup>; Wenker S.<sup>2</sup>; Vittori D.<sup>3</sup>; Nesse A.<sup>4</sup>  
Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
mariaeugenia.chamorro@gmail.com

Además de la función hematopoyética, se adjudica a la eritropoyetina (Epo) capacidad neuroprotectora. Para evitar que esta acción cause un aumento innecesario de la masa eritroide se han estudiado modificaciones de la hormona, como la eritropoyetina carbamylada (cEpo). Previamente, demostramos los efectos antiapoptóticos de Epo y cEpo en células neuronales y la falta de efecto proliferativo de cEpo en células eritroides. Existe controversia sobre la interacción de Epo y/o cEpo con el homoreceptor (REpo)2, o un heteroreceptor (subunidad de REpo + subunidad beta-common, relacionada con el receptor de GM-CSF) en distintos tipos celulares. Con el objetivo de determinar la causa de la acción diferencial de ambas eritropoyetinas, se realizaron ensayos de viabilidad y apoptosis para evaluar la interferencia entre factores de crecimiento en células neuronales (SH-SY5Y) y eritroides,

UT-7 (dependiente de Epo) y TF-1 (factores de crecimiento: GM-CSF o Epo). Una dosis elevada de cEpo impidió la acción antiapoptótica de GM-CSF en células TF-1 y, parcialmente la de Epo, tanto en UT-7 como en TF-1 (Hoechst: UT-7: Sin/E 42±5; E 10±3; cE 44±5, E+cE10x 32±3%; E+cE10x vs. E, P<0,05, n=4. TF-1: Sin/FC 43±2, E 10±3; GM 10±4; cE 38±9; E+cE10x 28±5; GM+cE10x 36±7%, S/FC vs. GM+cE10x, NS, n=3). En células SH-SY5Y, GM interfirió en la acción protectora de cEpo frente a staurosporina, disminuyendo significativamente la viabilidad celular (MTT: C 68±7; STP 32±3; E+STP 69±2; cE+STP 63±2; GM+STP 28±5; E+GM+STP 48±2; cE+GM+STP 31±2 u.a.; cE+GM+STP vs. cE+STP, P<0,01, n=4). Observamos la expresión y modulación (ARNm y proteína) de ambos receptores en las líneas celulares estudiadas. En conclusión, debido a la interferencia de acción con GM-CSF, no se descarta la posibilidad de que cEpo pueda actuar a través del heteroreceptor. Sugerimos que la acción sobre este receptor en células eritroides se vería truncada en algún paso de las vías de señalización intracelulares aún sin dilucidar.

**402. (563) INUSUAL HALLAZGO EN LOS TESTS DE LABORATORIO EN UNA PACIENTE EMBARAZADA CON VWD2B**

Woods A.<sup>1</sup>; Bermejo E.<sup>2</sup>; Sánchez-luceros A.<sup>3</sup>; Kempfer A.<sup>4</sup>; Alberto M.<sup>5</sup>; Grosso S.<sup>6</sup>; Blanco A.<sup>7</sup>; Lazzari M.<sup>8</sup>

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>

aiwoods@hematologia.anm.edu.ar

La enfermedad de von Willebrand 2B (VWD2B) se caracteriza por RIPA positiva a bajas concentración, VWF:RCo/VWF:Ag<0,6, ausencia de multímeros grandes del VWF y trombocitopenia aunque puede estar ausente en reposo y evidenciarse en el embarazo. Describimos este inusual hallazgo de laboratorio: Pte (27 años) con síntomas hemorrágicos mucocutáneos con score de sangrado de International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH)=6) concurre durante la semana 10 de embarazo, con el siguiente laboratorio: TS>9min; FVIII=56UI/dL; VWF:Ag=47UI/dL; VWF:RCo<10UI/dL; VWF:RCo/VWF:Ag=0,21; VWF:CB=6UI/dL; VWF:CB/VWF:Ag<0,13; 150.000 plaquetas; RIPA 1,2mg/mL normal; RIPA 0,5mg/mL ausente. Ausencia de multímeros de alto peso molecular. Control en la semana 26: TS=7 min; FVIII=90UI/dL; VWF:Ag=64UI/dL; VWF:RCo=23UI/dL; VWF:RCo/VWF:Ag=0,36; VWFpp/VWF:Ag=2,08 (vn= 0,92-2,14); 114.000 plaquetas; RIPA 1,2mg/mL normal, 0,5 y 0,4mg/mL positivos. Resultados compatibles con VWD2B. Genotipificación: El exón 28 del gen del VWF se amplificó por fragmentos y se secuenció (ABI Prism 310) detectándose la sustitución missense heterocigota 3922C>T que resulta en R1308C, confirmando el diagnóstico de VWD2B. En nuestros 12 pts VWD2B (2 embarazos en 5 mujeres), ésta es la única pte con VWF:RCo basal <10UI/dL. En el 1º estudio, fue sorprendente hallar VWF:RCo<10UI/dL con RIPA 1,2mg/mL normal, lo que nos sugirió el diagnóstico de VWD2B. RIPA 0,5mg/mL ausente en el primer estudio podría relacionarse al VWF:RCo<10UI/dL. En el segundo estudio, el aumento del VWF:RCo probablemente provocó trombocitopenia y positivizó el RIPA 0,5 y 0,4mg/mL. Un mínimo nivel de VWF:RCo parecería requerirse para que RIPA se ponga en evidencia a bajas concentraciones. Por lo tanto, en estos ptes el diagnóstico de VWD2B no puede descartarse. El estudio genético, la positividad del RIPA a baja concentración y la trombocitopenia dados por la progresión del embarazo fueron muy importantes para confirmar el diagnóstico inicial.

**403. (585) M1304V: UNA NUEVA MUTACIÓN EN EL DOMINIO A1 ASOCIADO AL FENOTIPO 2B ATÍPICO DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND**

Woods A.<sup>1</sup>; Sánchez-luceros A.<sup>2</sup>; Kempfer A.<sup>3</sup>; Bermejo E.<sup>4</sup>; Calderazzo Pereyra J.<sup>5</sup>; Grosso S.<sup>6</sup>; Meschengieser S.<sup>7</sup>; Lazzari M.<sup>8</sup>

Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>

aiwoods@hematologia.anm.edu.ar

Se ha descrito casos de VWD2B atípico con ausencia de trombocitopenia y multímeros del VWF normales pero con RIPA a bajas concentraciones positiva. Describimos una nueva mutación en heterocigocidad asociada con fenotipo 2B atípico en un grupo familiar. Pte: niño (15 años) con síntomas hemorrágicos mucocutáneos con score de sangrado de International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH)=5. Laboratorio: TS>9 min; FVIII=70UI/dL; VWF:Ag=17UI/dL; VWF:RCo=15UI/dL; VWF:RCo/VWF:Ag=0.88; 207.000 plaquetas; RIPA 1,2mg/mL normal; RIPA 0,5 y 0,4mg/mL positivos. Ausencia de multímeros de alto peso molecular. Post DDAVP: TS>9min; FVIII=130UI/dL; VWF:Ag=59UI/dL; VWF:RCo=40UI/dL; VWF:RCo/VWF:Ag=0,68; 154.000 plaquetas; VWFpp/VWF:Ag=2,33. Pruebas de diferenciación con seudo VWD compatibles con VWD2B. Madre (36 años) con síntomas hemorrágicos mucocutáneos (score ISTH=5). TS=5,5min; FVIII=50UI/dL; VWF:Ag=30UI/dL; VWF:RCo=39UI/dL; VWF:RCo/VWF:Ag=1,3; 162.000 plaquetas; RIPA 1,2mg/mL normal; RIPA 0,5mg/mL positivo. Multímeros: normales. VWFpp/VWF:Ag=2,87. Pruebas de diferenciación con seudo VWD compatibles con VWD2B. Tía (25 años) con síntomas hemorrágicos mucocutáneos (ISTH score=3) TS=7,5min; FVIII=40UI/dL; VWF:Ag=26UI/dL; VWF:RCo=26UI/dL; VWF:RCo/VWF=1,0; 205.000 plaquetas; RIPA 1,2mg/mL normal; RIPA 0,5 y 0,4mg/mL positivos. Multímeros: normales. VWFpp/VWF:Ag=2,35. Pruebas de diferenciación con seudo VWD compatibles con VWD2B. Genotipificación: el exón 28 del gen del VWF se amplificó por fragmentos y se secuenció (ABI Prism 310). Se encontró la sustitución tipo missense heterocigota 3910A>G dando por resultado M1304V en los tres familiares estudiados que corresponden al fenotipo VWD 2B atípico. La misma fue reportada por nosotros a la ISTH SSC VWF database, no habiendo sido reportada previamente. La mutación no se halló en 200 alelos normales.

#### 404. (594) E1549K: UNA NUEVA MUTACIÓN RESPONSABLE DE LA ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND TIPO 2M

Woods A.<sup>1</sup>; Sánchez-luceros A.<sup>2</sup>; Kempfer A.<sup>3</sup>; Bermejo E.<sup>4</sup>; Calderaza Pereyra J.<sup>5</sup>; Grosso S.<sup>6</sup>; Blanco A.<sup>7</sup>; Meschengieser S.<sup>8</sup>; Lazzari M.<sup>9</sup>

*Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>*  
aiwoods@hematologia.anm.edu.ar

La enfermedad de von Willebrand tipo 2M (VWD2M) se caracteriza por la pérdida de su capacidad de unión a la glicoproteína Ib plaquetaria (GPIb), con VWF:RCo/VWF:Ag<0,6 y multímeros del VWF normales. Se han reportado 21 mutaciones en el exón 28, correspondientes a los dominios A1 y A2. Se estudian genotípicamente 9 integrantes (4 hombres y 5 mujeres) de una familia con 23 miembros estudiados por sintomatología hemorrágica mucocutánea, con diagnóstico fenotípico de VWD 2M. Todos tenían TS (Ivy) prolongado, recuento de plaquetas normal, FVIII normal o levemente disminuido, VWF:Ag normal, VWF:RCo<10 UI/dL en 6 pacientes y entre 10 y 20 UI/dL en tres. Multímeros del VWF: normales. RIPA 1,2 mg/mL ausente; RIPA 2 mg/mL normal. Score de sangrado, International Society on Hemostasis and Thrombosis (ISHT): hombres= 3,7±2,1; mujeres= 4,8±1,5. Genotipificación: el exón 28 del gen del VWF se amplificó por fragmentos y se secuenció (ABI Prism 310). Se encontró la sustitución de tipo missense heterocigota 4645G>A dando por resultado E1549K en los 9 familiares estudiados, compatible con el fenotipo VWD2M. La misma fue reportada por nosotros a la ISTH SSC VWF database, no habiendo sido reportada previamente. La mutación no se halló en 200 alelos normales.

#### 405. (673) ESTUDIO DE FERROPORTINA Y DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A LA HEMOCROMATOSIS EN UN MODELO ANIMAL DE FLEBOTOMÍA CRÓNICA

Danna M.<sup>1</sup>; García B.<sup>2</sup>; Roque M.<sup>3</sup>  
*Laboratorio de Fisiología Humana, UNS<sup>1 2 3</sup>*  
cdanna@uns.edu.ar

Se conoce ampliamente el rol del Ferroportina (FPN) como exportador de Fe en alta demanda del biometal y de la proteína

asociada a la hemocromatosis (HFE) como reguladora del Fe en las criptas duodenales por interacción con Receptores de Transferrina. El objetivo fue estudiar la distribución intestinal y renal de FPN y HFE en intensa demanda de Fe eritropoyético en un modelo de ratón con flebotomía crónica, con y sin bazo. Ratones hembra CF1 (n=8/grupo, diseño en bloques) agrupados en: 1) Esplenectomía con flebotomía crónica; 2) Esplenectomía sin flebotomía; 3) Sin esplenectomía con flebotomía crónica; 4) Sin esplenectomía, sin flebotomía. Se siguieron las normas internacionales de uso de animales de experimentación. Esplenectomía: disección del bazo. Flebotomía crónica: extracciones sanguíneas del seno retroorbital cada 3 días, durante 32 días. Inmunohistoquímica de intestino y riñón: anti-FPN; anti-HFE; anti-rabbit-HRP. La anemia se observó el día 32: grupo 1 (Hb:8.5g/dL±0.2); grupo 3 (Hb:10.3g/dL±0.3) respecto al grupo 4 (Hb:15.2g/dL±0.5)(p<0.05). Anemia por flebotomía crónica, con y sin esplenectomía: 1)expresión de FPN duodenal con evidente redistribución hacia la membrana basolateral e intracelular, respecto a ratones sin flebotomía; 2)evidente expresión de FPN en la zona cortical renal, respecto a ratones sin flebotomía, sin cambios en médula renal interna; 3)expresión de HFE en enterocitos duodenales sin cambios: en vellosidades fue evidente la expresión intracelular y la expresión desplazada hacia la membrana; en las criptas mostró localización intracelular; 4) expresión de HFE renal sin cambios: expresión en corteza y médula renal. Concluimos que los cambios del exportador de Fe FPN descriptos favorecieron la absorción intestinal y reabsorción renal de Fe, para restablecer el déficit de Fe eritropoyético inducido por flebotomía crónica con y sin esplenectomía. HFE duodenal y renal no participaría en forma directa regulando el déficit de Fe en flebotomía crónica.

#### 406. (674) EXPRESIÓN DUODENAL Y RENAL DEL TRANSPORTADOR DE METALES DIVALENTES EN UN MODELO ANIMAL DE FLEBOTOMÍA CRÓNICA CON ESPLENECTOMÍA.

Giorgi G.<sup>1</sup>; Petasny M.<sup>2</sup>; Roque M.<sup>3</sup>  
*Laboratorio de Fisiología Humana, UNS<sup>1 2 3</sup>*  
gisela.giorgi@uns.edu.ar

La importación de Fe por el transportador de metales divalentes (DMT1), cumple un rol clave en procesos agudos de demanda eritropoyética. No existen claras evidencias de su regulación en la demanda crónica del eritrón, en ausencia de un órgano proveedor de Fe como el bazo. El objetivo fue estudiar la regulación de DMT1 en un modelo animal de flebotomía crónica con y sin esplenectomía. Ratones hembra CF1(n=8/grupo,diseño en bloques) agrupados en:1)Esplenectomía+flebotomía crónica;2)Esplenectomía sin flebotomía;3)Sin esplenectomía+flebotomía crónica;4)Control:sin esplenectomía,sin flebotomía. Flebotomía crónica: extracción sanguínea del seno retroorbital cada 3 días, durante 32 días. Esplenectomía: disección del bazo. Se siguieron las normas internacionales del uso de animales de experimentación. Parámetros(día32):Hb,HCT,ferremia(p<0.05). Inmunohistoquímica duodenal y renal:anti-DMT1;anti-rabbit-HRP. Fe tisular: Perl's y cuantificación previa digestión. Hb: disminuyó significativamente en flebotomía con esplenectomía (8.8±0.7g/dl) y sin esplenectomía (10.3±0.3g/dl) respecto al control (15.2±0.5g/dl). Ferremia: aumentó significativamente en flebotomía con esplenectomía (253±37µd/dl) y sin esplenectomía (213±21µd/dl), respecto al control (177±4µd/dl). Fe esplénico: disminuyó significativamente en flebotomía (4,0±0,9µg/gr vs.25,6±2,1µg/gr), evidenciando la depleción esplénica. Flebotomía con y sin esplenectomía: expresión de DMT1 en enterocitos y en epitelio renal cortical con evidente distribución en la cara apical de estas células. Evidente localización de DMT1 en médula interna renal. Esplenectomizados: expresión intracelular de DMT1 en enterocitos y epitelio renal cortical, sin cambios respecto al control. Podemos concluir que la esplenectomía no produce modificaciones en la expresión de DMT1. Sin embargo, en la anemia por flebotomía crónica (con y sin bazo), DMT1 tendría un rol activo en la absorción de Fe duodenal y renal para satisfacer la demanda eritropoyética.

## ONCOLOGÍA 6

**407. (13) ESTUDIO DEL POTENCIAL CARCINOGENICO HEPÁTICO DEL HERBICIDA ROUNDUP(R). BIOENSAYO EN RATAS.**

Frontini A.<sup>1</sup>; De La Vega C.<sup>2</sup>; Sylvestre Begnis D.<sup>3</sup>; Cerana C.<sup>4</sup>; Cerana A.<sup>5</sup>; Jauk F.<sup>6</sup>; Venera G.<sup>7</sup>

Instituto Universitario Italiano de Rosario, Escuela de Medicina<sup>1 2 3 4 5 6</sup>; Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas (IQUIFIB-CONICET); FFy B, UBA<sup>7</sup>  
veronicafrontini@hotmail.com

Es reconocida la importancia de la exposición del ser humano a contaminantes medioambientales en el desarrollo de cáncer. El RoundUpR es el desmalezante de elección en la siembra de soja transgénica.

El objetivo del estudio fue determinar el potencial carcinogénico hepático de la administración de RoundUpR (R) mediante un bioensayo en dos etapas a mediano plazo en ratas. Modelo animal: 1) Iniciación (D) dietilnitrosamina (DEN) i.p. y 2) Promoción (H) (hepatectomía del 70%). Ratas Wistar macho jóvenes se dividieron en 3 grupos: (D+H+R), (D+H), (H+R). Se cuantificaron: a) N° de células iniciadas, N° de focos y volumen de focos pre-neoplásicos por hígado evaluando la expresión de la forma placentaria de la glutatión S-transferasa de rata (rGSTp), b) el índice apoptótico (IA) mediante HE. Se pesaron los animales y el hígado y se realizó hepatograma. Los animales que recibieron RoundUpR mostraron un aumento de peso menor e independiente de la administración de DEN y un peso menor del hígado demostrando el efecto tóxico del herbicida y su asociación con el retraso en la regeneración hepática. Del hepatograma sólo se vieron afectadas las colinesterasas y la fosfatasa alcalina.

Grupo	Aumento Peso (g)	Peso Hígado (g)	Colinesterasas (UI/ml)	Fosfatasa alcalina (UI/L)
D+H+R (n=9)	91 ± 14*	7,78 ± 0,54	866 ± 51**	682 ± 35
H+R (n=10)	56 ± 9*	6,60±0,34*	840 ± 28**	1135 ± 31†
D+H (n=10)	185 ± 8*	12,20 ± 0,44	1112 ± 89	690 ± 30

Resultados expresados como media ± ES. \*Diferente de D+H (p<0,001). \*\* Diferente de D+H (p<0,05). † Diferente de D+H+R y D+H (p<0,001). Los estudios inmunohistoquímicos mostraron que el RoundUpR no es promotor de las células iniciadas. El efecto negativo sobre la proliferación concuerda con el peso del hígado. Estos datos podrían descartar el potencial efecto epigenético del herbicida.

	D+H+R n =9	H+R n=10	D+H n=10
N° Células iniciadas/cm <sup>2</sup>	432±55*	423±63	214±19**
N° Focos/cm <sup>3</sup>	561±134†	22±14	747±149**
Volumen relativo de focos mm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup>	1,074± 0,252*	0,025± 0,016*	1,83± 0,40**

Resultados expresados como media ± ES. \*Diferente de H+R p<0,005. \*\*Diferente de H+R p<0,0001. † Diferente de H+R p< 0,005. El IA expresado como porcentaje fue mayor en los grupos D+H+R (0,16±0,07) y H+R (0,14±0,03) respecto a D+H (0,07±0,03) p<0,01. La actividad pro-apoptótica sería responsable del efecto antiproliferativo de células iniciadas. Demostramos que el RoundUpR disminuye la tasa de crecimiento de animales jóvenes y retrasa la proliferación hepática.

**408. (36) ESTUDIO DE POBLACIONES LINFOIDES NO NEOPLÁSICAS EN LA PROGRESIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA MICOSIS FUNGOIDE**

Vallecorsa P.<sup>1</sup>; Fridmanis M.<sup>2</sup>; Meiss R.<sup>3</sup>; Bengi R.<sup>4</sup>; Narbaitz M.<sup>5</sup>; Vanzulli S.<sup>6</sup>

Academia Nacional de Medicina IEO<sup>1 2 3 6</sup>; Academia Nacional de Medicina, IHEMA<sup>4 5</sup>  
pvallecorsa@intramed.net

La forma más frecuente (50%) de todos los Linfomas Cutáneos Primarios es la Micosis Fungoide (MF). La MF es un linfoma de células T CD4+ de memoria con una incidencia anual de 1/100.000

y evolución indolente en las etapas tempranas pero en estadios avanzados con sobrevida del 30-40% a los 5 años. La enfermedad progresa a través de tres etapas clínico-patológicas: macula, placa y tumor. El infiltrado celular contiene numerosos linfocitos reactivos que acompañan a la población neoplásica y cuya participación en la patogénesis de la enfermedad no está clara. En este trabajo analizamos las poblaciones No Neoplásicas de Linfocitos B y T CD8+ en dos etapas de progresión de la MF y su relación con la evolución de los pacientes. Estudiamos retrospectivamente 20 muestras de MF placa (MFP) y 7 de MF tumor (MFT) provenientes de 15 pacientes con un seguimiento de 1,5 a 20 años. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética institucional. Analizamos la expresión de CD20 y CD8 mediante inmunohistoquímica con streptoavidina-peroxidasa. El porcentaje de células positivas sobre el total de células y el patrón del infiltrado (nodular o aislado) se correlacionó con datos de evolución (sobrevida < 5 años, resistencia al tratamiento o factores de riesgo). Seis de 15 pacientes (40 %) tuvieron mala evolución o pronóstico. No hubo diferencias significativas entre MFP y MFT en la expresión de CD20 ni de CD8. En las MFP hubo mayor expresión de CD8 (4,91 ± 2,58) que de CD20 (1,21 ± 0,84) p< 0,001. Por otra parte, de los 6 pacientes con mala evolución o pronóstico, 4 tuvieron MFP con patrón nodular o focal y alto % de CD20 (16,5 ± 9,69 vs. 1,21 ± 0,84, p =0,001), dos de ellas además con incremento de CD8 (18,7±0,42, p< 0,001) y sólo 2/6 tuvieron bajo CD20 con patrón aislado. Estos resultados preliminares muestran diferencias en el contenido de Células B y T CD8+ en las MFP y plantea la posibilidad de que el aumento de CD20 pueda ser indicador de mala evolución.

**409. (204) LA DEFICIENCIA LOCAL DEL RECEPTOR DE IGF-1 (IGF-1R) AFECTA EL DESARROLLO DEL FEOCROMOCITOMA MURINO.**

Martin A.<sup>1</sup>; Fernández M.<sup>2</sup>; Mathó C.<sup>3</sup>; Venera M.<sup>4</sup>; Pennisi P.<sup>5</sup>  
Centro de Investigaciones Endocrinológicas, CEDIE-CO-  
NICET<sup>1 2 3 4 5</sup>  
ayemartin@hotmail.com

El IGF-1 está involucrado en la tumorigénesis de la glándula adrenal. Demostramos previamente que el IGF-1, a través del IGF-1R, estimula la proliferación e inhibe la apoptosis de la línea celular murina de feocromocitoma (MPC). In vivo la deficiencia de IGF-1 circulante disminuye la incidencia y prolonga el periodo de latencia del feo experimental. Sin embargo, el rol a nivel local del circuito IGF-1/IGF-1R no ha sido determinado. Objetivo: estudiar el rol del IGF-1 a nivel local en el desarrollo de feocromocitoma in vivo. Diseño: se utilizó un modelo de haploinsuficiencia del IGF-1R (ratones IGF-1R+/n) que expresan 1 solo alelo del IGF-1R y por lo tanto los niveles de expresión de dicho receptor en todos los tejidos son menores a los que se expresan en un ratón control. Se inyectaron 1x10<sup>6</sup> MPC por vía subcutánea en ratones machos IGF-1R+/n (n=8) y controles (n=10) de 8 semanas de edad. Se registró el tiempo de inicio, la incidencia y crecimiento tumoral hasta la semana 13 post-inoculo. Resultados: el tiempo de aparición de los tumores estuvo retrasado en el grupo IGF-1R+/n respecto del control [Mediana del tiempo al evento: 8 vs 5 semanas; Hazard Ratio: 0.33 IC95%: 0.17-1.88, IGF-1R+/n vs Control]. El 37.5% de los ratones haploinsuficientes para el IGF-1R no desarrollaron tumor siendo la incidencia tumoral y las curvas de sobrevida libres de tumor significativamente diferentes del grupo control (p<0.0001, Logrank Test). Conclusión: Estos resultados sugieren que la deficiencia local del IGF-1R, en el microambiente tumoral, disminuye la incidencia y prolonga el periodo de latencia del feocromocitoma experimental.

**410. (244) EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE ANTÍGENOS VIRALES EN NEOPLASIAS DE MAMA INDUCIDAS POR EL VIRUS POLIOMA MURINO**

Símula S.<sup>1</sup>; Sanjuan N.<sup>2</sup>  
Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina,  
UBA<sup>1 2</sup>  
patoexpe@fmed.uba.ar

Los virus poliovirus pueden producir transformación celular in vitro e inducir neoplasias en ratones. Son virus con DNA,



desnudos, que tienen 3 genes tempranos (LT, MT y ST) y 3 tardíos (VP-1, VP-2 y VP-3). El oncogén viral es MT y VP-1 es la mayor proteína de la cápsida. Se sabe que la expresión continua de MT es necesaria para la transformación celular in vitro, mientras que en las neoplasias se detectaron 3 tipos celulares: células que contienen DNA viral y expresan VP-1, células con DNA viral pero sin VP-1 y otras que expresan VP-1 pero en las que el virus no encapsida. El objetivo de este trabajo fue estudiar la expresión de los antígenos tempranos y tardíos de polioma en neoplasias de mama inducidas por el virus. Se inocularon ratones C3H BiDa con la cepa A2 de polioma y a los 4 meses se detectaron neoplasias múltiples, entre ellas las de mama. 10 tumores de mama fueron procesados histológicamente y se obtuvieron cortes seriados adyacentes de cada uno. Por inmunoperoxidasa se detectó la presencia de VP-1 en un corte, y la expresión de MT, LT y ST en otro, empleando sueros policlonales de conejo y de ratón, respectivamente. Como control positivo se empleó tejido renal de ratones infectados y como control negativo riñón de ratones no infectados. El control interno fueron cortes de tumor tratados con sueros normales de conejo o de ratón. En todos los casos se observó que los adenocarcinomas de mama expresaban antígenos tempranos y muy raramente VP-1. No obstante, la expresión de antígenos tempranos se daba en sectores de la neoplasia o en células aisladas, siendo que el resto del tumor no los evidenciaba. Se concluye que para el crecimiento continuo de los tumores de mama inducidos por polioma no es necesaria la expresión constitutiva de MT (a diferencia de lo que ocurre in vitro) y que, probablemente, el virus actúe por un mecanismo de "hit and run", lo que sería un concepto novedoso en la patogénesis de estas neoplasias.

**411. (298) LA HIPERACTIVACIÓN DEL ONCOGÉN AKT1 PROFUNDIZA LOS EFECTOS DE GLIPICANO-3 (GPC3) SOBRE LA PROGRESIÓN METASTÁSICA DE CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS MURINAS**

Romero S.<sup>1</sup>; Peluffo G.<sup>2</sup>; Lago Huvelle M.<sup>3</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>4</sup>; Urtreger A.<sup>5</sup>; Peters M.<sup>6</sup>  
*Instituto de Oncología Angel Roffo, Area de Investigación*<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
 silvina2002@hotmail.com

Las quinasas Akt tienen un rol crítico en la regulación de la supervivencia celular, pero su papel en la migración y metástasis es menos claro. Previamente demostramos que la reexpresión de GPC3 (un proteoglicano regulado negativamente en tumores de mama) inhibe la capacidad metastásica del adenocarcinoma mamario murino LM3 in vivo, asociada a una reversión parcial de la transición epitelio-mesenquimática in vitro. Determinamos también que las células LM3-GPC3 presentan menor actividad de la vía Akt. El objetivo de este trabajo fue investigar el papel de Akt1 en el comportamiento invasivo/metastático de células que reexpresan GPC3. Mediante WB corroboramos que las células LM3-GPC3 presentan mayores niveles de Akt1 que las LM3-vector. Para discernir la función de esta isoforma, los clones LM3-GPC3 fueron infectados con una variante constitutivamente activa (CA) de Akt1. Aunque no se detectaron cambios en la organización del citoesqueleto de actina, determinamos mediante un ensayo de cicatrización de heridas que las células LM3-GPC3 CA Akt1 son menos migrantes que sus controles (Cobertura de herida: LM3-GPC3 control=50% vs LM3-GPC3 CA Akt1=30%, p<0,05). Los distintos clones inyectados sc en ratones hembra BALB/c generan tumores que no difieren en su tasa de crecimiento. Para estudiar la capacidad metastásica, los distintos tipos celulares fueron inoculados iv. Observamos que los clones LM3-GPC3 CA Akt1 desarrollan menor número de metástasis pulmonares (Md [Rg]: LM3-GPC3 control=9 [3-29] vs LM3-GPC3 CA Akt1=0,5 [0-10], p<0,05), siendo estos nódulos más pequeños (<0,5 mm). En conclusión, nuestros resultados sugieren que GPC3 inhibe la progresión tumoral mediante la regulación positiva de Akt1. La hiperactivación de este oncogén profundizaría los efectos de GPC3, previniendo la progresión de la metástasis a través de una reducción en la migración.

**412. (332) INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE UN LINFOMA T MURINO PROVOCADO POR EL COMPUESTO IMIQUIMOD.**

Di Sciullo M.<sup>1</sup>; Herschlik L.<sup>2</sup>; De Toro J.<sup>3</sup>; Waldner C.<sup>4</sup>; Mongini C.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular, CEFYBO-CONICET-UBA*<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 mdiSciullo@fmed.uba.ar

El agonista TLR 7 IMIQUIMOD es el principal representante de la familia de las imidazoquinolinas. Se ha demostrado su eficacia como agente antiviral y en el tratamiento de tumores de la piel y metástasis cutáneas. Se ha descrito que puede inducir la apoptosis de keratinocitos malignos y de células de melanoma, pero no se ha estudiado dicho efecto en linfomas. Por esta razón, nuestro objetivo es determinar si el compuesto IMIQUIMOD POSEE UN EFECTO ANTIPROLIFERATIVO y si promueve la apoptosis de las células del linfoma T murino LBC. Para esto, las células LBC fueron incubadas con igual volumen de medio de cultivo (control), y con diferentes concentraciones de IMIQUIMOD comprendidas entre 200 y 0,5 ug/ml. La proliferación, determinada por incorporación de 3H timidina a las 48 y 72 horas de las células LBC, fue inhibida (p<0.001, ANOVA) y este efecto se revirtió con las dosis de 1 y 0,5 ug/ml. Para estudiar si el efecto antiproliferativo era causado por la inducción de apoptosis, se cultivaron células LBC con concentraciones crecientes de IMIQUIMOD entre 1 y 100 ug/ml durante 24 hs. y se incubaron con Genetecin 800 ug/ml (como control de apoptosis) o con RPMI 1640 como control negativo y se determinó la presencia de apoptosis mediante la técnica de tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio y por el método de detección de la fragmentación nucleosomal del ADN en geles de agarosa. Los índices apoptóticos fueron los siguientes: 4 para 1 ug/ml, 4 para 10 ug/ml, 16 para 25 ug/ml, 45 para 50 ug/ml, 90 para 100 ug/ml de IMIQUIMOD, 2 para LBC+RPMI y 87 para Genetecin. Se demostró así, niveles crecientes de apoptosis dosis dependiente, observándose el mayor nivel con la mayor concentración. Estos resultados indican que el IMIQUIMOD tiene un efecto antiproliferativo y un efecto proapoptótico per se sobre la línea celular LBC in vitro.

**413. (353) EVALUACIÓN DEL PERFIL DE GALECTINAS EN CÁNCER DE PRÓSTATA Y SU PAPEL CRÍTICO EN PROCESOS DE NEOVASCULARIZACIÓN.**

Gentilini L.<sup>1</sup>; Giribaldi L.<sup>2</sup>; Al Nakouzi N.<sup>3</sup>; Cárdenas Delgado V.<sup>4</sup>; Croci D.<sup>5</sup>; Nugnes L.<sup>6</sup>; Scott R.<sup>7</sup>; Kutok J.<sup>8</sup>; Casas G.<sup>9</sup>; Mazza O.<sup>10</sup>; Vazquez E.<sup>11</sup>; Elola M.<sup>12</sup>; Chauchereau A.<sup>13</sup>; Rabinovich G.<sup>14</sup>; Laderach D.<sup>15</sup>; Compagno D.<sup>16</sup>  
*Depto. Química Biológica, FCEN, UBA*<sup>1 2 11 15 16</sup>; *Institut Gustave Roussy-INSERM U981, Villejuif, France*<sup>3 13</sup>; *Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas (UBA-CONICET), FFyB, UBA*<sup>4 6 12</sup>; *Laboratorio de Inmunopatología, IBYME-CONICET*<sup>5 14</sup>; *Dep. of Pathology, Harvard Medical School, Boston (MA), USA*<sup>7 8</sup>; *Hospital Alemán, Buenos Aires, Argentina*<sup>9</sup>; *Hospital Nacional de Clínicas Jose de San Martin, Buenos Aires, Argentina*<sup>10</sup>  
 lucas.gentilini@gmail.com

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más frecuente en hombres adultos mayores. Desde etapas precoces de la transformación, este tipo de cáncer se caracteriza por una importante vascularización, necesaria tanto para el aporte de nutrientes/hormonas como para su diseminación metastásica. El proceso angiogénico es mediado por diversos mecanismos moleculares, entre los que las interacciones glicanos/proteínas podrían participar activamente. No obstante este campo de investigación permanece poco explorado en cáncer de próstata. En estudios previos demostramos, a partir de un análisis pormenorizado del perfil de galectinas, un incremento selectivo en la expresión de galectina-1 (Gal-1) durante el proceso evolutivo del cáncer de próstata. En este estudio evaluamos el papel de Gal-1 durante el proceso de vascularización en este tipo de cáncer. Por inmunohistoquímica en « tissue arrays » describimos que la expresión de Gal-1 correlaciona con la expresión de CD34, un marcador

de células endoteliales ( $p=0,0377$ ). Esta correlación Gal-1/CD34 presenta significatividad estadística sólo en zonas tumorales y aumenta en estadios avanzados del tumor. Con el objetivo de profundizar dicha observación efectuando estudios funcionales hemos analizado el papel de Gal-1 en la angiogénesis in vivo. A tal efecto se inyectaron en Matrigel células prostáticas tumorales 22RV1 transducidas con una construcción lentiviral codificante para un Gal-1 shRNA. A los 5 días se extrajeron los tapones de Matrigel y se evaluó la neo-vascularización mediante la presencia de Hemoglobina/ $\mu\text{g}$  proteína. La inhibición de Gal-1 indujo una disminución dosis-dependiente de vasos inducidos por las células tumorales prostáticas. En su conjunto estos resultados ponen en evidencia el activo papel que Gal-1 posee en la vascularización en cáncer de próstata, evidenciando que esta galectina es un atractivo blanco terapéutico mismo en estadios avanzados de la enfermedad.

**414. (398) EFICACIA TERAPÉUTICA DE QUIMIOTERAPIA Y TERAPIA FOTODINÁMICA BASADA EN ALA EN UN MODELO DE LEUCEMIA IN VIVO.**

Diez B.<sup>1</sup>; Meiss R.<sup>2</sup>; Ernst G.<sup>3</sup>; Teijo M.<sup>4</sup>; Batlle A.<sup>5</sup>; Hajos S.<sup>6</sup>; Fukuda H.<sup>7</sup>.

*CIPYP, CONICET, Hospital de Clínicas, UBA, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 4 5 7</sup>; Instituto de Estudios Oncológicos, Departamento de Patología, Academia Nacional de Medicina<sup>2</sup>; Cátedra de Inmunología, IDEHU, FFyB, UBA-CONICET<sup>3 6</sup> berenediez@hotmail.com*

La combinación de terapias con diferentes mecanismos de acción es útil frente a la monoterapia en el tratamiento del cáncer. El trasplante de médula ósea asociado a quimioterapia en el tratamiento de leucemias está limitado por la presencia de células malignas remanentes y la aparición de fenotipos resistentes a multidrogas. La terapia fotodinámica (TFD) con ácido 5-aminolevulínico (ALA) elimina células malignas mediante la fotoactivación de porfirinas sintetizadas endógenamente a partir del precursor biológico ALA. En estudios previos con la línea celular de leucemia murina LBR-, demostramos que ALA-TFD combinada con doxorubicina (DOX) y/o vincristina (VCR) es más efectiva que la aplicación de las terapias en forma independiente. En este trabajo estudiamos la eficacia de combinar estas terapias en un modelo in vivo. Ratones BALB-C se inocularon vía intravenosa con células LBR- tratadas previamente en cultivo; se sacrificaron a los 30 días y se evaluó presencia y grado de infiltración tumoral mediante análisis histológico en timo, riñón, hígado, bazo, corazón, pulmón, ganglios linfáticos y cerebro. En el grupo inoculado con el vehículo no se observó infiltración, en el grupo inoculado con las células sin tratar se observó infiltración, en el 87,5% de los órganos. El grupo inoculado con células sometidas a TFD mostró un 50 % de órganos infiltrados (principalmente ganglios linfáticos), pero con menor intensidad que el grupo sin tratar. En los animales inoculados con células tratadas con DOX ó VCR se observaron células tumorales en el 87,5% y el 75% de los órganos, respectivamente. Utilizando la combinación DOX+TFD ó VCR+TFD, en ningún caso se evidenció infiltración tumoral. Los resultados demuestran el gran beneficio de utilizar terapias combinadas, sugiriendo una potencial alternativa terapéutica en pacientes con leucemia, brindando la posibilidad de disminuir las dosis de quimioterapia, minimizando sus limitaciones y efectos adversos.

**415. (475) ROL DE ÓXIDO NÍTRICO EN EL CÁNCER DE VEJIGA UTILIZANDO UN MODELO MURINO CON DISTINTOS GRADOS DE INVASIÓN**

Belgorosky D.<sup>1</sup>; Langle Y.<sup>2</sup>; Lodillinsky C.<sup>3</sup>; Sander E.<sup>4</sup>; Eiján A.<sup>5</sup>

Instituto de Oncología Angel Roffo, Area de Investigación<sup>1 2 3 4 5</sup> d\_belgo@hotmail.com

El óxido nítrico (NO) es un radical libre altamente reactivo producido por un grupo de enzimas denominadas NO sintasas (NOS). La isoforma inducible (iNOS), produce niveles altos de NO ( $\mu\text{M}$ ) en respuesta a estímulos inflamatorios. Estudios en pacientes

con cáncer de vejiga (CaV), realizados en nuestro laboratorio, demostraron que la mayor expresión de iNOS en los tumores está asociado con un pronóstico desfavorable, mayor invasión y recurrencias más tempranas. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo murino de CaV con diferente grado de invasión, donde la inoculación ortotópica de la línea MB49 produce tumores superficiales mientras que la de MB49-I origina tumores invasores. El objetivo fue estudiar las diferencias entre MB49 y MB49-I tanto in vitro como in vivo, en cuánto a la producción de NO y analizar la respuesta de cada una de estas líneas al tratamiento con L-NAME (inhibidor de la producción de NO). In vitro, MB49-I expresa hasta dos veces más la enzima iNOS (western blot), y produce mayores niveles de NO que MB49 ( $p<0,05$ ) (Ensayo de Griess). El tratamiento con L-NAME (2mM) disminuye hasta 5 veces su producción, genera la disminución de la proliferación celular de ambas líneas ( $p<0,05$ ) (MTS) y reduce la migración de MB49-I (control:171+/-23, L-NAME:39+/-10 unidades arbitrarias (ua),  $n=5$ ,  $p<0,01$ ) sin afectar la de MB49 (control:114+/-54, L-NAME:78+/-35 ua,  $n=5$ ). In vivo, tumores MB49-I presentan mayor expresión de iNOS (inmunoquímica). La administración oral de L-NAME (250mg/kg/ratón) inhibe el crecimiento sc. y ortotópico de ambas líneas tumorales ( $p<0,05$ ), observándose, reversión de la invasión en el caso de tumores MB49-I (hematoxilina y eosina). Concluimos que el NO producido en el cáncer de vejiga estaría involucrado en la progresión tumoral confiriendo un comportamiento más invasor. Planteamos la hipótesis de que la inhibición de iNOS podría ser un posible blanco terapéutico favorable para pacientes con CaV cuyos tumores expresen iNOS.

**416. (483) EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE P300 EN LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA MAMARIO.**

Fermento M.<sup>1</sup>; Salomón D.<sup>2</sup>; Gandini N.<sup>3</sup>; Ferronato M.<sup>4</sup>; Facchinetti M.<sup>5</sup>; Curino A.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca (INIBIBB) Centro Científico Tecnológico Bahía Blanca<sup>1 2 3 4 5 6</sup> efermento@criba.edu.ar*

El cofactor transcripcional p300 participa en los procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis y senescencia. Resultados previos del laboratorio demuestran que este cofactor puede tener un rol importante en el carcinoma mamario. Para confirmar esta hipótesis se evaluó la acción de 2 inhibidores específicos de p300 (vv59 y vv56) sobre la supervivencia y migración celular (ensayo de herida) en las líneas LM3 y LM05e. Se observó que la inhibición de p300 indujo una disminución de la supervivencia ( $p=0,001$ ) y de la migración celular (porcentaje de cierre: media control=91,89 % vs. media tratado con VV56=59,80 % y con VV59 =36,6 %;  $p=0,0014$  y  $p<0,0001$ , respectivamente) en las células LM3. Ninguno de los dos procesos celulares estudiados se vio afectado por la inhibición del cofactor en la línea con receptores hormonales positivos LM05e. Para profundizar estos estudios se utilizó un modelo murino de inyección subcutánea de células LM3 en el que se analizó el efecto de la administración de vv59 y del inhibidor no específico curcumina sobre el desarrollo de los tumores subcutáneos. El tratamiento con curcumina produjo una reducción del peso tumoral (media tratados=1,519 g vs. media controles=3,464 g;  $p=0,028$ ). Estos resultados se repitieron con el inhibidor vv59 (media tratados=1,227 g vs. media controles 2,243 g;  $p=0,042$ ). En los animales tratados con este último inhibidor también se produjeron menos metástasis pulmonares (media controles=12,75 vs. media tratados=3,583;  $p=0,045$ ) y un menor número de tumores invadió la cavidad abdominal (tratados=3 animales de 12 vs. control=9 animales de 12;  $p=0,014$ ). En conclusión los resultados obtenidos demuestran que la inhibición de p300 induce una disminución significativa de la supervivencia y migración celular en la línea hormono-independiente LM3, no ejerciendo efecto en la línea LM05e con receptores hormonales positivos. Además produce una importante disminución de la progresión tumoral en el modelo animal utilizado.

**417. (488) ESTUDIO DE RUNX1 COMO POTENCIAL REGULADOR DE TUMORIGÉNESIS EN GLÁNDULA MAMARIA**

Recouvreur M.<sup>1</sup>; Rocha-viegas L.<sup>2</sup>; Kordon E.<sup>3</sup>; Echeverría P.<sup>4</sup>; Rubinstein N.<sup>5</sup>  
 IFIBYNE <sup>1 2 3 5</sup>; Universidad de Ginebra <sup>4</sup>  
 solrecu@gmail.com

En nuestro laboratorio estudiamos la actividad y regulación del factor de transcripción RUNX1 en glándula mamaria normal y tumoral. Se ha reportado que RUNX1 está involucrado en el desarrollo de leucemias y que FOXP3 inhibe su actividad transcripcional a través del contacto proteína-proteína. Recientemente hemos demostrado que RUNX1 se une al promotor del oncogén RSPO3 y que su sobre expresión en células epiteliales mamarías normales es acompañada por un aumento en la expresión de RSPO3. Con el objetivo de conocer la potencialidad de RUNX1 como modulador de la expresión de oncogenes o genes supresores de tumor en glándula mamaria realizamos una exhaustiva integración de información de distintas bases de datos disponibles on line (BioGRID, Mint, HRPD, Intact). Estas bases de datos contienen interacciones moleculares provenientes de transcriptomas e interactomas. Utilizando el programa Cytoscape para integrar la información generamos un interactoma humano de RUNX1 y FOXP3. Con el fin de explorar los potenciales sitios de unión de RUNX1 en promotores de genes blanco se utilizaron bases de datos de Chip-seq proveniente de la línea humana Jurkat de linfocitos T. Finalmente, para evaluar cuales de estos genes estarían involucrados en procesos tumorales en glándula mamaria se evaluó su expresión en microarrays preparados a partir de líneas humanas tumoral y normal, o muestras de pacientes de tumor de mama y mama normal. Este análisis reveló que RUNX1 tiene la potencialidad de regular positivamente los oncogenes: SOX4 y GALNT6; así como de disminuir la expresión de genes supresores de tumor: GJA1, FST y PTEN. La interacción física de RUNX1 con el promotor de estos genes blancos fue validada por la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). El análisis in silico y experimental realizado en este trabajo nos permite sugerir a RUNX1 como un potencial modulador de la expresión de distintos genes involucrados en el desarrollo de tumores en glándula mamaria humana.

**418. (493) EXPRESIÓN DE CD4, CD8, FOXP3 Y CD34 EN TUMORES PRIMARIOS DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA**

Rico M.<sup>1</sup>; Rozados V.<sup>2</sup>; Herrera C.<sup>3</sup>; Alasino C.<sup>4</sup>; Vargas Roig L.<sup>5</sup>; Gago F.<sup>6</sup>; Tello O.<sup>7</sup>; Nocito A.<sup>8</sup>; Roggero E.<sup>9</sup>; Scharovsky O.<sup>10</sup>  
 Instituto de Genética Experimental, Fac. Cs. Médicas, UNR <sup>1 2 3 9 10</sup>; Instituto de Oncología y Especialidades Médicas, Rosario<sup>4</sup>; IMBECU, CCT CONICET, Mendoza, Fac. Cs. Médicas, UNCuyo<sup>5</sup>; Fac. de Cs. Médicas, UNCuyo, Instituto Ginecomamarío, Mendoza<sup>6</sup>; Fac. Cs. Médicas, UNCuyo<sup>7</sup>; Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas Fac. de Cs. Médicas, UNR<sup>8</sup>; CI UNR<sup>10</sup>  
 majorico@gmail.com

El mejor conocimiento de la biología de los tumores de mama, una de las neoplasias más comunes en la mujer, permitiría mejorar las terapias habituales, dado que solo aproximadamente el 50% de las pacientes responden a las mismas. Se ha propuesto que diferentes características de los tumores como el grado de infiltrado inflamatorio, el número de células T reguladoras (Tregs) y la densidad de vasos sanguíneos podrían ser útiles para anticipar la respuesta a la terapia. Nuestro objetivo fue: a) analizar el infiltrado linfocitario y la expresión de las moléculas CD4 y CD8, CD34 (marcador endotelial) y Foxp3 (marcador Treg) en tumores primarios de pacientes con cáncer de mama, y b) relacionarlas con la evolución clínica (libres de enfermedad LE, o recaídas R) de las mismas a los 5 años del tratamiento primario. Se analizaron muestras de archivo de tumores de mama ductal en su mayoría en estadios I y II (n=27). Se determinó por inmunohistoquímica, y se confirmó por microscopía confocal, la expresión de CD4 y CD8 en linfocitos intra y peritumorales, de Foxp3 en linfocitos y células tumorales y de CD34 en células endoteliales. El infiltrado linfocitario se evaluó en cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina.

La cuantificación se realizó en 20 campos de alta magnificación y se utilizó un score de 0 (nulo) a 6 (alto). Se observó un mayor infiltrado linfocitario intratumoral en las pacientes LE (n=22) en comparación con las R (n=5), (P<0,05). No se observaron diferencias en las moléculas estudiadas al comparar ambos grupos de pacientes: la expresión fue muy variable para CD4, CD8 y Foxp3 linfocitario y tumoral (0-6) y para CD34 (1-6). 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 las otras moléculas estudiadas y la evolución de la enfermedad.

**419. (516) MODELO DE ESTRÉS EN RATÓN QUE TRATA DE ASEMEJAR LO QUE SUCEDE EN LOS PACIENTES ONCOLÓGICOS: 1ROS RESULTADOS CON EL ADENOCARCINOMA MAMARIO LM3.**

Cresta Morgado P.<sup>1</sup>; Colombo L.<sup>2</sup>  
 Area Investigaciones, Instituto Oncológico A. H. Roffo, UBA <sup>1 2</sup>, CAECIHS (UAI) <sup>2</sup>  
 pablo\_crestam@hotmail.com

Introducción: Existen muchos modelos de stress en ratones y crecimiento tumoral. Objetivos: Investigar en modelos murinos que se aproximen más a lo que sucede clásicamente en los pacientes oncológicos: ellos se estresan desde la sospecha y diagnóstico del tumor, y continúan el resto de sus vidas con la espada de Damocles de haber tenido un tumor maligno. Material y Métodos: 30 ratones hembras (BALB x C56BL) F-1 adultas jóvenes fueron inoculadas subcutáneamente con 500.000 células del adenocarcinoma de mama LM3, de origen BALB/c. Cuando todas tenían tumor clínicamente detectable, se las subdividió en 2 grupos equivalentes en el volumen de sus tumores: Control (C), 5 ratonas por jaula con medio ambiente enriquecido (tubos, cuevas, etc), y Estresadas (E): cada ratona aislada en una caja por el resto de su vida. Los ratones son animales sociales y el estar aislado es una metodología clásica de stress crónico, y la más aceptada por los comités de ética de todo el mundo. Se realizó un ligero masaje de 1 minuto de cada tumor en los días 1, 3 y 5 previos a la cirugía, para incrementar la formación de micrometástasis. Se las subdividió en los 2 grupos 3 días antes de la cirugía de sus tumores primarios. Los ratones continuaron el resto de sus vidas en las mismas condiciones que tenían al momento de la cirugía (C o E). Se midió la sobrevida y se realizó la autopsia bajo microscopio estereoscópico de todas ellas, registrándose si había recidivas y/o metástasis (número y tamaño de las mismas). Resultados: No hubo diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados: días de sobrevida, porcentaje de ratones con recidivas, número y tamaño de metástasis tanto en ganglios drenantes como en pulmón. Discusión: No hemos podido detectar diferencias entre controles y estresadas en ninguno de los parámetros mencionados, en este modelo experimental, con estos ratones, con esta línea tumoral, en estos tiempos de cirugía y con esta metodología clásica de estrés.

**420. (721) AMINOFLAVONA INDUCE APOPTOSIS MEDIADA POR AHR EN LÍNEAS DE CÁNCER RENAL HUMANO DE CÉLULAS CLARAS Y PAPILARES.**

Luzzani G.<sup>1</sup>; Callero M.<sup>2</sup>; Itkin B.<sup>3</sup>; Loaiza Perez A.<sup>4</sup>  
 Instituto Oncológico Angel H Roffo <sup>1 2 3 4</sup>  
 gaby.luzzani@gmail.com

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que Aminoflavona (AF) posee un efecto antitumoral/pro-apoptótico mediado por la activación de la vía señalización del receptor de hidrocarburos arílicos (AhR) en las líneas celulares de cáncer renal humano TK-10 y SN12-C. La línea de cáncer renal ACHN se mostró resistente a este tratamiento y no presentó activación de AhR. Demostramos también, que células provenientes de un carcinoma renal papilar de un paciente, denominadas 112, fueron extremadamente sensibles a AF y que esta sensibilidad fue revertida por el pre-tratamiento con el inhibidor de AhR,  $\alpha$ NF. Consecuentemente, los objetivos del presente trabajo, fueron: evaluar la participación de AhR en el efecto antitumoral de AF

en la línea de cáncer de riñón de células claras Caki-1 y la de células papilares 112 y confirmar el efecto pro-apoptótico de AF en la línea TK-10. En Caki-1 y 112, AF indujo la translocación nuclear de AhR luego de 6 h de tratamiento, evaluada por western blot del receptor en fracciones citosólica y nuclear. El tratamiento durante 24 h con AF (1 mM) indujo la formación de cuerpos apoptóticos en estas dos líneas celulares observados mediante tinciones con DAPI y bromuro de etidio/ naranja de acridina. Este efecto fue revertido al pre-tratar las células con el inhibidor AhR,  $\square$ NF. En Caki-1 transfectadas con un plásmido conteniendo el gen reportero luciferasa acoplado a la secuencia promotora de unión a AhR, XRE, observamos que AF (1 mM) indujo un aumento en la actividad luciferasa de 1.85 veces. En TK-10, observamos por western blot, que el tratamiento con AF (1 mM) indujo activación de las enzimas Caspasa-3, PARP, y pP53, directamente implicadas en el proceso de apoptosis. Además se observó un aumento de la expresión de p21. Concluimos que en las células Caki-1, 112 y TK-10, AF induce apoptosis mediada la activación de la vía de AhR, la cual podría constituir un blanco terapéutico alternativo a los utilizados actualmente para el tratamiento de tumores renales de distinto origen histológico

## ENDOCRINOLOGÍA 4

### 421. (17) ESTUDIOS DE SENESCENCIA Y DEL ROL DE IL-6 EN TUMORES DE HIPÓFISIS

Haedo M.<sup>1</sup>; Sapochnik M.<sup>2</sup>; Fuertes M.<sup>3</sup>; Carrizo G.<sup>4</sup>; Arzt E.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck* <sup>1 2 3 5</sup>; *Hospital Italiano de Buenos Aires* <sup>4</sup>  
*mhaedo@fbmc.fcen.uba.ar*

Los tumores de hipófisis a pesar de su frecuencia son mayoritariamente benignos. La senescencia inducida por oncogenes (SIO) es un mecanismo por el cual células que son potencialmente malignas entran en estado senescente, donde irreversiblemente son incapaces de responder a estímulos de crecimiento. Existen evidencias de que SIO está inducida y mantenida por interleucina 6 (IL-6) endógena del tumor, y la proteína del ciclo celular, p15, está involucrada. La IL-6 cumple un rol dual e importante en hipófisis normal y tumoral. Es por esto que nos propusimos estudiar la existencia efectiva de senescencia en tumores de hipófisis y comprobar si IL-6 cumple un rol en la misma. Se utilizaron 2 abordajes: a) la verificación de senescencia en tumores de hipófisis humanos luego de silenciar IL-6 en los mismos, y b) el desarrollo de un modelo de senescencia en la línea tumoral de hipófisis MtT/S. Utilizando tinción para  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -gal), pudimos comprobar senescencia en 17 de 24 cultivos primarios de adenomas de hipófisis y en la línea celular MtT/S. Los 17 cultivos positivos fueron electroporados con siRNA contra IL-6, y 6 (35%) de ellos resultaron tener tinción de SA- $\beta$ -gal disminuída y mostraron una variación en la expresión de p15. Las células MtT/S tuvieron un comportamiento similar cuando transfectadas con siRNA contra IL-6, y también una menor expresión de p15. En cambio, cuando tratadas con LPS (10-1000 ng/ml), que aumenta la expresión de IL-6 endógena, la tinción y actividad SA- $\beta$ -gal fue mayor. El tratamiento con rIL-6 (0,1-100 ng/ml) exógena no modificó la actividad de SA- $\beta$ -gal. Concluimos que la senescencia es un fenotipo importante de los tumores de hipófisis y que la IL-6 participa en la regulación del mismo. La línea tumoral MtT/S exhibe características de senescencia y también evidencia un rol importante de la IL-6 en la misma. Los resultados obtenidos contribuyen a explicar la poca proliferación y agresividad de los tumores hipofisarios.

### 422. (238) EFECTOS DE MELATONINA SOBRE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DE CALCIO ALTERADA POR MENADIONA

Areco V.<sup>1</sup>; Carpentieri A.<sup>2</sup>; Marchionatti A.<sup>3</sup>; Perez A.<sup>4</sup>; Centeno V.<sup>5</sup>; Tolosa De Talamoni N.<sup>6</sup>  
*Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular Fac. Ciencias Médicas UNC* <sup>1 2 3 4 6</sup>; *Cátedra de Química Biológica, UNC* <sup>2 5</sup>  
*vecaareco@hotmail.com*

En este laboratorio se demostró que menadiona (MEN) inhibe la absorción intestinal de calcio. El objetivo de este trabajo fue conocer el efecto de melatonina (MEL) sobre esta respuesta inhibitoria. Para ello, se utilizaron pollos de 4 semanas de edad, los cuales se dividieron en 4 grupos: 1) controles, 2) tratados con MEN (2,5  $\mu$ mol/kg de peso) 3) tratados con MEL (10 mg/kg de peso) 4) tratados con MEL después de la inyección con MEN. La expresión de genes y proteínas de las moléculas implicadas en el transporte transcelular de  $Ca^{2+}$  se estudiaron mediante las técnicas de RT-PCR y Western Blot, respectivamente. El estrés oxidativo se evaluó mediante la determinación del contenido de glutatión (GSH) y la medición de la actividad de enzimas del sistema antioxidante. La apoptosis se determinó en base a la fragmentación de ADN, la expresión inmunocitoquímica del citocromo c y la actividad de caspasa 3. Los resultados se evaluaron con ANOVA y test de Bonferroni. Los datos indican que MEL revirtió el efecto inhibitorio de la absorción intestinal de  $Ca^{2+}$  producido por MEN. Tanto la expresión génica como la proteica del intercambiador  $Na^{+}/Ca^{2+}$  y de calbindina no se modificaron por los tratamientos. MEN causó estrés oxidativo a juzgar por la disminución del contenido de GSH y el incremento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa. Estos efectos se revertieron con MEL. MEN incrementó la fragmentación del ADN, la expresión del citocromo c y la actividad de caspasa 3, todos estos efectos se contrarrestaron con MEL. MEL por sí misma no alteró ninguna de las variables estudiadas. En conclusión, MEL contrarresta el estrés oxidativo y la apoptosis producida por MEN, llevando a la normalización de la absorción intestinal de  $Ca^{2+}$ . MEL sería una potencial droga de elección para la reversión de la alteración de la absorción intestinal de  $Ca^{2+}$  producida por estrés oxidativo.

### 423. (241) LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 1 DE PTH EN OSTEOCITOS ES INDISPENSABLE PARA EL EFECTO ANABÓLICO DE LA CARGA MECÁNICA EN RATONES

Pellegrini G.<sup>1</sup>; Tu X.<sup>2</sup>; Galli C.<sup>3</sup>; Benson J.<sup>4</sup>; Condon K.<sup>5</sup>; Bivi N.<sup>6</sup>; Plotkin L.<sup>7</sup>; Robling A.<sup>8</sup>; Bellido T.<sup>9</sup>  
*Sección Osteopatías Médicas, Htal de Clínicas UBA, Cát. de Bioquímica Gral y Bucal Fac. Odontología UBA, CONICET* <sup>1 3 8</sup>; *Department of Anatomy & Cell Biology, Department of Medicine, Division of Endocrinology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN* <sup>2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
*gretelitak@hotmail.com*

Los osteocitos juegan un rol esencial en la homeostasis esquelética integrando la respuesta ósea a estímulos mecánicos y hormonales. Estudios previos han demostrado que fuerzas mecánicas impartidas al hueso así como también la hormona paratiroidea (PTH) tienen un efecto anabólico debido a que inhiben la expresión de esclerostina en osteocitos con la consecuente activación de la vía de señalización Wnt. En el presente trabajo evaluamos la relación potencial entre el receptor de PTH (PTHR1) y mecanotransducción. Con este fin, evaluamos la respuesta osteogénica a la carga mecánica en ratones en los cuales el PTHR1 fue removido específicamente en osteocitos (cKO), generados cruzando ratones PTHR1 flox/flox con DMP1-8kb-Cre. El ARNm para PTHR1 disminuyó 73% en huesos largos en cKO vs. controles PTHR1 flox/flox. A los 4 meses los cKO no exhibieron cambios significativos en geometría y en densidad mineral del cúbito. La carga ex vivo, indujo fuerzas un 20% mayores en cKO vs. controles (1541.7 vs. 1229.1  $\mu$ e/N  $p < 0.05$ ), sugiriendo una menor resistencia a las fuerzas mecánicas. El cúbito derecho de ambos grupos fue sometido a intensidades de fuerza: baja, mediana y alta, durante 1min/día por 3 días consecutivos y sacrificados 14 días después; el cúbito izquierdo sin carga mecánica se utilizó como control. La histomorfometría dinámica reveló que la tasa de formación perióstica basal (BFR) es similar en controles y cKO. BFR en controles aumentó con la carga en forma dependiente del estímulo (0.13 $\pm$ 0.06; 0.18 $\pm$ 0.13; y 0.38 $\pm$ 0.15  $\mu$ m<sup>3</sup>/  $\mu$ m<sup>2</sup>/ d), como consecuencia de un incremento en la superficie mineralizada cubierta por osteoblastos (MS/BS) y en la actividad individual de osteoblastos (MAR). En contraste,

la BFR en respuesta a la carga mecánica fue menor en los cKO ( $0.10 \pm 0.05$ ,  $0.10 \pm 0.05$  y  $0.11 \pm 0.08$   $\mu\text{m}^3/\text{um}^2/\text{d}$ ). Estos resultados sugieren que hay un intercambio entre respuestas hormonales y mecánicas en el hueso por lo cual la respuesta osteogénica inducida por cargas mecánicas requiere la señal de activación del PTHR1 en osteocitos.

#### 424. (371) EFECTOS DEL MONOFLUOROFOSFATO (MFP) Y ZOLEDRONATO (Z) SOBRE HUESO CORTICAL Y TRABECULAR EN RATAS CON OSTEOPOROSIS (OP) POR OVARIETOMIA (OVX)

Lombarte M.<sup>1</sup>; Bues F.<sup>2</sup>; Brun L.<sup>3</sup>; Rigalli A.<sup>4</sup>; Di Loreto V.<sup>5</sup>  
*Facultad Ciencias Médicas UNR<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*mercedes\_lombarte@yahoo.com.ar*

La OP se caracteriza por disminución de la masa ósea a nivel del hueso trabecular y cortical. La terapia combinando agentes anabólicos (como el MFP) y antirresortivos (como el Z) no ha sido suficientemente estudiada. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del uso combinado de Z y MFP sobre hueso trabecular y cortical en ratas con OP por OVX. 32 ratas Sprague Dawley hembra de 70 días fueron OVX. Luego de 30 días de desarrollo de la OP se dividieron en 4 grupos que recibieron: 400  $\mu\text{moles}$  MFP/kg.día (grupo MFP), 1.5  $\mu\text{g}$  Z/kg.semana (grupo Z), ambas drogas (grupo MZ) o vehículo (controles). Luego de un mes de tratamiento se obtuvieron las tibias y se realizaron medidas morfométricas y de densidad mineral (DM) en el hueso cortical de la diáfisis y volumen óseo trabecular en la metafisis proximal. El desarrollo de la OP en los parámetros estudiados se evaluó respecto un grupo de ratas sham (resultados no mostrados). Se calculó el % de variación de los parámetros medidos en los grupos tratados respecto al control y los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES, y la semejanza del mismo respecto de cero se comparó con test t de Student para una sola muestra, \*  $p < 0.05$ . A nivel cortical, la DM aumentó en animales tratados con MFP ( $27.6 \pm 10.4\%$ ) y MZ ( $8.5 \pm 7.8\%$ ), mientras que disminuyó por tratamiento con Z ( $-10.8 \pm 3.9\%$ ), \*  $p < 0.05$ . También se incrementaron significativamente el diámetro externo y el área cortical en los grupos MFP y MZ respecto los controles. A nivel trabecular, solo los grupos Z y MZ lograron recuperar el volumen óseo trabecular perdido por la OP (MFP:  $-7.57 \pm 11.2\%$ , Z:  $90.8 \pm 25.6\%$ , MZ:  $69.3 \pm 22.9\%$ , \*  $p < 0.05$ ). Los resultados indican que el tratamiento simultáneo con MFP y Z recupera el volumen de hueso trabecular y aumenta la DM y área cortical, mejorando las propiedades materiales y geométricas del hueso, lo que no consigue ni el MFP ni el Z de forma individual. Ambos efectos serían óptimos para mejorar la fortaleza y calidad ósea del hueso con OP.

#### 425. (471) EFECTO DEL ÁCIDO LIPOICO SOBRE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA Y TEJIDO ADIPOSITO ABDOMINAL INDUCIDOS POR DIETA RICA EN FRUCTOSA.

Fariña J.<sup>1</sup>; García M.<sup>2</sup>; Alzamendi A.<sup>3</sup>; Castro M.<sup>4</sup>; Francini F.<sup>5</sup>; Giovambattista A.<sup>6</sup>; Gagliardino J.<sup>7</sup>  
*CENEXA<sup>1 2 4 5 7</sup>; IMBICE<sup>3 6</sup>*  
*rodio@hotmail.com*

Previamente demostramos que la administración de una dieta rica en fructosa (DRF) durante 3 semanas a ratas normales induce estrés oxidativo (EO), cambios en la masa, función endocrino-metabólica y composición de ácidos grasos (AG) del tejido adiposo abdominal (TAA). Objetivo: analizar el efecto del ácido lipoico (AL) sobre marcadores de EO plasmáticos y del TAA inducidos por la DRF. Metodología: alimentamos ratas macho adultas normales durante 3 semanas con dieta comercial estándar (C) sin o con el agregado de fructosa (10%) en el agua de bebida (F); simultáneamente agregamos AL (35 mg/kg de peso corporal) durante los últimos 5 días de tratamiento en ambos grupos (CAL y FAL). Previo al sacrificio pesamos los animales (P) y obtuvimos muestras de sangre para medir, glucemia (G), triglicéridos (TG), ácidos grasos libres (AGL), TBARS, adiponectina (A) y leptina (L); por otro lado, diseccamos el tejido adiposo abdominal, aislamos e incubamos adipocitos para determinar las especies reactivas de oxígeno (ROS). Resultados:

Plasma	Control (C)	Fructosa (F)	CAL	FAL	p <
G (mg/dl)	114.0 $\pm$ 2.50	111.0 $\pm$ 3.60	101.7 $\pm$ 2.90	112.3 $\pm$ 4.20	C vs. CAL 0.009; CAL vs. FAL 0.04
TG (mg/dl)	80.1 $\pm$ 5.90	153.3 $\pm$ 5.60	70.3 $\pm$ 11.7	97.5 $\pm$ 10.2	C vs. F y F vs. FAL 0.001
AGL (mM)	0.64 $\pm$ 0.07	0.68 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.14	C vs. CAL y F vs. CAL 0.01
TBARS (pmol/mg)	55.7 $\pm$ 4.74	61.71 $\pm$ 4.21	44.5 $\pm$ 5.21	45.9 $\pm$ 5.59	F vs. CAL 0.035
A ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	10.57 $\pm$ 0.68	14.12 $\pm$ 0.79	6.87 $\pm$ 0.58	7.89 $\pm$ 0.36	C vs. F; CAL vs. C 0.007 y F 0.0002; FAL vs. C 0.02 y F 0.0004
L (ng/ml)	4.77 $\pm$ 0.35	6.67 $\pm$ 0.62	3.58 $\pm$ 0.46	3.68 $\pm$ 0.44	C vs. F 0.02; CAL vs. F 0.009; FAL vs F 0.009
	Control (C)	Fructosa (F)	CAL	FAL	p <
P (g)	282.4 $\pm$ 6.1	295.1 $\pm$ 4.80	277.5 $\pm$ 7.90	285.7 $\pm$ 4.60	NS
ROS en TAA	746.6 $\pm$ 3.8	1994 $\pm$ 105.3	36.02 $\pm$ 2.13	446.6 $\pm$ 63.9	C vs. F y CAL; F vs. FAL; CAL vs. FAL 0.001

Conclusión: El AL sería potencialmente útil para prevenir el EO y los cambios metabólicos inducidos por dietas no saludables.

#### 426. (553) VARIACIONES DEL CORTISOL SALIVAL MATERNO DURANTE LA LACTANCIA EN CANINOS

Koscinczuk P.<sup>1</sup>; Alabarce M.<sup>2</sup>; Rossner M.<sup>3</sup>; Cainzos R.<sup>4</sup>  
*Universidad Nacional del Nordeste<sup>1 2 3 4</sup>*  
*pkoscinczuk@hotmail.com*

El propósito de este trabajo fue evaluar los efectos que la lactancia tiene sobre los niveles de cortisol salival. Dada las necesidades energéticas para producir leche y mantener la temperatura corporal de los cachorros, se considera que la concentración de cortisol debería ser más alta durante la noche. El estudio se llevó a cabo en cinco hembras caninas con sus crías, nacidas por parto natural de junio a noviembre. Cada madre con sus cachorros fue alojada en una jaula individual dentro del living de una casa familiar, con agua ad libitum y comida cada 6 horas. Las extracciones de muestras de saliva se realizaron a las 7.30, 14.00 y 21.00 horas, los días 14 (coincidiendo con el apego materno), 45 (cuando el apego es mutuo) y 46 (luego de un desapego forzado). La concentración de cortisol se evaluó mediante el uso de un kit inmunoenzimático (Salimetrics, State Collage, USA). El análisis descriptivo y correlación de los datos (Infostat) fue definido con un  $\alpha = 0.05$ . La concentración promedio de cortisol diario se correlacionó positivamente con el número de cachorros ( $r = 0.6$ ). El valor más alto se registró en la hembra con nueve crías (1,092  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) y el menor en aquella con dos (0,05  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ). El día 15, los valores más altos se registraron por la noche (2,95  $\mu\text{g}/\text{dl}$  para la hembra con 9 cachorros), con excepción de la hembra con dos, en la que el valor máximo se registró a las 14 horas (0,071  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ), destacándose que sus crías abrieron los ojos a los 8 días. En los días 45 y 46 la curva de cortisol fue más alta por la mañana, excepto en la hembra con nueve crías, en la cual este se registró a las 14 horas. Al comparar las curvas entre las madres, no se hallaron diferencias significativas. Más allá de las variaciones individuales que se observaron con la medición de cortisol salival, éste resulta un método adecuado para evaluar las respuestas endocrinas de estrés en el período de lactancia que afectan al bienestar de las madres.

### TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 4

#### 427. (541) MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE RECEPTORES DE CORTICOESTEROIDES POR DERIVADOS DE PROGESTERONA

Molinari A.<sup>1</sup>; Machado-rada M.<sup>2</sup>; Ghini A.<sup>3</sup>; Erlejman A.<sup>4</sup>; Galigniana M.<sup>5</sup>  
*FCEN, UBA, IByME<sup>1 5</sup>; FCEN, UBA<sup>2 3 4</sup>*  
*ammolinari@arnet.com.ar*

Se estudió la modulación de la actividad transcripcional del receptor de mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR) por derivados naturales y sintéticos de progesterona. Se evidenció que  $5\alpha$ -dihidroprogesterona ( $5\alpha$ -dhp) activa a MR y posee pobre actividad intrínseca sobre GR. Cuando las células se incubaron

con agonista y 5 $\alpha$ -dhp, éste inhibió significativamente la actividad transcripcional de ambos receptores. Ensayos transcripcionales y estudios de localización subcelular indicaron que la inhibición no es de tipo competitiva ni se relaciona con fallas en la translocación nuclear de los receptores. Ensayos de desplazamiento de radioligando indicaron que 5 $\alpha$ -dhp no desplaza a dexametasona de GR y es un competidor débil de aldosterona por MR (afinidad relativa 50 veces menor). Además, 5 $\alpha$ -dhp abolió casi por completo el efecto potenciador mediado por el coactivador p300 sobre la activación transcripcional de ambos receptores, sugiriendo que 5 $\alpha$ -dhp podría interferir con el efecto de cofactores. Postulamos la existencia de un segundo sitio para 5 $\alpha$ -dhp que modularía alostéricamente la actividad de ambos receptores. Para comparar los efectos de 5 $\alpha$ -dhp con derivados sintéticos de progesterona, se realizaron los mismos ensayos con 22-oxa-24,13 $\beta$ -ciclo-18-norcol-4-en-3-ona ( $\gamma$ 1) y 22-oxa-23-metil-24,13 $\beta$ -ciclo-18-norcol-4,23-dien-3,6-diona ( $\gamma$ 2). Se evidenció que  $\gamma$ 1 inhibe selectivamente la actividad de MR, mientras que  $\gamma$ 2 resultó ser un potente inhibidor selectivo de GR. Los ensayos de radioligando con GR mostraron que  $\gamma$ 2 interactuaría directamente con GR ya que compete con [3H]dexametasona. Ensayos *in vivo* corroboran los resultados obtenidos *in vitro*. La reabsorción de Na<sup>+</sup> mediada por aldosterona fue significativamente inhibida cuando  $\gamma$ 1 se inyectó con el agonista, pero no así con  $\gamma$ 2. Postulamos 5 $\alpha$ -dhp participaría en el síndrome de resistencia a mineralocorticoides que se observa en parturientas y neonatos, y que  $\gamma$ 1 podría mimificar su acción antiminerlocorticoide.

**428. (624) IDENTIFICATION AND EXPRESSION OF AMPK IN ECHINOCOCCUS SP: CONSERVED SIGNAL TRANSDUCTION IN CESTODE**

Loos J.<sup>1</sup>; Cumino A.<sup>2</sup>

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Area Biología Molecular de Cestodes, CONICET, FCEN, UNMDP<sup>1,2</sup>  
julialoos@hotmail.com

Glucose and glycogen are the main energy source in both larval and adult of the cestode. In helminthes, the carbohydrate metabolism is known target to be affected by a number of anthelmintic agents (benzimidazole derivatives, praziquantel, and genistein). Here, we investigated the effects of metformin (biguanide) in the viability of protoscoleces and metacestode of *Echinococcus granulosus*, causative agent of the cystic hydatid disease. Metformin inhibit gluconeogenesis and mitochondrial respiratory chain complex I, and activates the AMP-activated kinase (AMPK) in insulin-sensitive tissues. The drug reduced the vitality of protoscoleces in a dose-dependent manner and induces the deleterious effect on germinal layer of intact cysts determined by confocal and SEM. As metformin sensitivity is the major criterion used to detect AMP kinase, we identified *in silico* orthologous in *E. granulosus* genome. In this work, we analyzed encoding genes for  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits of Eg-AMPK and carry out expression studies of regulatory genes ( $\beta$  and  $\gamma$ ). The primary and quaternary structures are highly conserved in *Echinococcus sp*: Eg-AMPK $\alpha$ , belongs to the protein kinases C superfamily and contains a kinase domain (with conserved T176, possible phosphorylation and activation site) and an  $\beta\gamma$  interaction domain; Eg-AMPK $\beta$  contains glycogen-binding domain (GBD) and  $\alpha\gamma$  interaction domains; and finally Eg-AMPK $\gamma$  (CBS superfamily) show typical CBS motifs (Bateman domains) of AMP and ATP interaction. Also, transcriptional expression studies were conducted to evaluate the metformin effect on the levels of key transcripts, demonstrated reduction level of *pepck*, *g6p* and *mdh* expression in protoscoleces. Finally, we showed an increase in type II fermentation due to the reduction of glycogen and increased  $\square$ -amylase and LDH activities. These preliminary results will let us continue subsequent studies that may improve the outline for further identification of downstream target proteins, a promising target for chemotherapy of cystic echinococcosis.

**429. (612) FUSIÓN MITOCONDRIAL EN LA SÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES: NUEVO MECANISMO DE REGULACIÓN HORMONAL**

Duarte A.<sup>1</sup>; Poderoso C.<sup>2</sup>; Cooke M.<sup>3</sup>; Soria G.<sup>4</sup>; Cornejo Maciel F.<sup>5</sup>; Gottifredi V.<sup>6</sup>; Podestá E.<sup>7</sup>

INBIOMED, Depto Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2,3,5,7</sup>; Fundación Instituto Leloir<sup>4,6</sup>  
ales\_duarte@hotmail.com

En la esteroidogénesis existen dos interrogantes aún no resueltos: ¿Cómo los esteroides son trasladados de mitocondria a retículo endoplasmático (RE) y a membrana para su síntesis y secreción siendo moléculas hidrofóbicas? y ¿Cómo se asocian a mitocondria proteínas que no presentan señal mitocondrial? Por lo tanto, el objetivo del trabajo es estudiar si la estimulación hormonal produce un reordenamiento de mitocondrias permitiendo la localización de proteínas y sustratos a las organelas correspondientes. Con este fin, células de Leydig de la línea MA-10 fueron transfectadas con un plásmido conteniendo un marcador fluorescente específico de mitocondria. La estimulación con hormona o el segundo mensajero AMPc, produce reorganización de las mitocondrias hacia una forma tubular (30 $\pm$ 10 vs 80 $\pm$ 15 control vs AMPc p<0,001), posiblemente fusionadas, visualizadas por microscopía confocal. En línea con estos resultados, demostramos por primera vez que la estimulación hormonal induce la expresión de la proteína mitofusina 2 (Mfn2), involucrada en fusión entre mitocondrias y mitocondria-RE. La disipación del potencial de membrana mitocondrial por el ionóforo CCCP disminuye significativamente la formación de túbulo y la esteroidogénesis. Demostramos que el AMPc aumenta los niveles de proteínas claves para la esteroidogénesis como la acil-CoA sintetasa 4 en membrana de RE asociada a mitocondria y ERK en mitocondria y que CCCP disminuye este efecto. El knock down de la proteína tirosina fosfatasa SHP2, involucrada en la organización del citoesqueleto de actina, inhibe la fusión mitocondrial y translocación de ERK a mitocondria. Dado que ERK no tiene péptido señal a dicha organela, la fusión podría permitir la llegada de esta quinasa a su lugar de acción. Estos resultados demuestran que la estimulación hormonal aumenta la fusión de mitocondrias, mediada por SHP2, permitiendo la formación de un complejo multiproteico mitocondrial para la correcta síntesis de esteroides.

**430. (615) IMPORTANCIA FUNCIONAL DE HETEROCHROMATIN PROTEIN (HP) 1GAMA EN EL PROCESO DE MIOGÉNESIS**

Charó N.<sup>1</sup>; Galigniana N.<sup>2</sup>; Susperreguy S.<sup>3</sup>; Toneatto J.<sup>4</sup>; Piwien-Pilipuk G.<sup>5</sup>  
IBYME, CONICET<sup>1,2,3,4,5</sup>  
nancycharo@hotmail.com

En estudios recientes demostramos que al inducir la diferenciación de preadipocitos 3T3-L1, la proteína nuclear no histónica HP1 $\gamma$  se concentra transitoriamente en el polo opuesto al MTOC. Nos preguntamos entonces si la polarización nuclear de HP1 $\square$  ocurría en otros procesos de diferenciación celular, y para ello analizamos la distribución subcelular de HP1 $\gamma$  durante el proceso de miogénesis. 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 diferenciación, HP1 $\gamma$ , una proteína sólo descripta en el núcleo hasta el presente, se localiza mayoritariamente en el citoplasma de los miotubos. HP1 $\gamma$  colocaliza parcialmente con fibras de actina y una fracción se detecta en la región del sarcolema. En cambio, HP1 $\alpha$ , otro miembro de la familia de las HP1 altamente homóloga, se encuentra presente en el núcleo tanto de mioblastos como de miotubos. Análisis por Western blot de las fracciones nucleares y citoplasmáticas de miotubos C2C12 demuestra que HP1 $\gamma$  se encuentra en ambas fracciones. En miofibrillas aisladas así como en cortes histológicos de músculo estriado de ratón, observamos que HP1 $\gamma$  se localiza en las bandas Z y en el sarcolema. Para investigar la importancia funcional de HP1 $\gamma$  durante el proceso de miogénesis, se generaron mioblastos C2C12 en los que se interfirió la expresión de HP1 $\gamma$  de manera estable empleando shRNA. Las C2C12HP1 $\gamma$ -/- no se diferenciaron o dieron origen a miosacos, células en las que las fibras de actina no se han formado apropiadamente y los núcleos se acumulan perdiendo la distribución organizada que se observa en el miotubo normal. En

síntesis, HP1 $\gamma$  experimenta cambios dinámicos en su distribución subcelular durante el proceso de miogénesis cumpliendo un rol esencial en la correcta formación del miotubo.

**431. (654) IDENTIFICACIÓN DE TRANSCRIPTOS ANTISENTIDO NATURALES (NATS) DE LA ENZIMA ACIL-COA SINTETASA 4 (ACSL4), CLAVE EN LA REGULACIÓN DE LA PROTEÍNA STAR Y LA ESTEROIDOGÉNESIS**

Castillo A.<sup>1</sup>; Podestá E.<sup>2</sup>

INBIOMED, Depto. de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>1,2</sup>

castillofernanda@yahoo.com

Los NATs son ARNs endógenos complementarios a los ARNm, que pueden tener acción en transcripción, maduración, transporte, estabilidad y traducción de su contraparte. Hemos descrito la presencia de un NAT de la proteína StAR (steroidogenic acute regulatory protein) que regula la expresión de la misma. StAR es clave en el transporte de colesterol en células esteroideogénicas y está regulada por la acción de Acsl4. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la presencia de este mecanismo en la regulación de la expresión de Acsl4. Para predecir NATs in silico, se comparó el ARNm murino de Acsl4 con la base de datos EST de ratón, obteniéndose secuencias cortas homólogas a este transcripto. Empleando Vector NTI Suite 8 y Unigene se determinaron cuales de estas secuencias demostraban una transcripción antisentido. Experimentalmente, a partir de ARN de células murinas de Leydig MA-10 se identificó la presencia de NATs para Acsl4 utilizando el método de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Se identificaron y secuenciaron al menos tres transcriptos antisentido totalmente complementarios al ARNm de Acsl4. Su existencia fue verificada por RT-PCR específica de secuencia. La expresión de estos transcriptos fue corroborada en tejidos de ratón. Se aisló un transcripto (NAT-1) de 1986 pb complementario a una variante de splicing alternativo del ARNm de Acsl4, sugiriendo un posible papel de este NAT en una regulación diferencial de las variantes de ARNm. El segundo transcripto (NAT-2) de 925 pb es complementario a una región del 3'UTR que contiene un sitio de unión para el microRNA-34a, un blanco transcripcional de p53. Este hallazgo es importante dado que describimos previamente el rol de ACSL4 en la progresión tumoral. El tercer transcripto (NAT-3) de 320 pb es complementario a una región del 3'UTR río arriba del anterior. Estos resultados demuestran por primera vez la existencia de NATs para Acsl4 abriendo un nuevo camino en el estudio de la expresión de esta enzima.

## METABOLISMO Y NUTRICIÓN 4

**432. (140) PREDOMINIO DE VLDL GRANDES EN SÍNDROME METABÓLICO, DETECTADO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.**

Lucero D.<sup>1</sup>; López G.<sup>2</sup>; Zago V.<sup>3</sup>; Cacciagiù L.<sup>4</sup>; López G.<sup>5</sup>; Wikinski R.<sup>6</sup>; Schreier L.<sup>7</sup>

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, INFIBIOC, FFyB, UBA<sup>1,3,4,5,6,7</sup>; Bioanalítica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS, Bahía Blanca<sup>2</sup>

diego.martin.lucero@gmail.com

En la hipertrigliceridemia del síndrome metabólico (SM), la heterogeneidad de las partículas lipoproteicas es de importancia fisiopatológica por su variable rol aterogénico. Objetivo: estudiar el tamaño de lipoproteínas ricas en triglicéridos (LRT) en relación a los parámetros clínico-metabólicos del SM. Estudiamos 30 pacientes con SM (ATPIII) y 14 controles sanos. En suero en ayunas se midieron perfil lipídico, ácidos grasos libres (AGL) y adiponectina. Se aislaron LRT por ultracentrifugación ( $d < 1,006$  g/ml), que fueron sometidas a HPLC de exclusión molecular. De los cromatogramas se reconocieron: un pico a  $9,95 \pm 0,10$  min [diámetro:  $90 \pm 3$  nm] (quilomicrones remanentes (QR)), otro pico a  $12,46 \pm 0,48$  min [diámetro:  $60 \pm 4$  nm] (VLDL grande) y un pico mayoritario a  $22,35 \pm 0,05$  min [diámetro:  $37,3 \pm 0,1$  nm] (VLDL

típica), expresándose como proporciones respecto del área total. Ambos grupos presentaron diferencias esperables en los parámetros característicos del SM y HOMA ( $p < 0,01$ ). Pacientes con SM presentaron reducción de adiponectina ( $6,6 \pm 3,0$  vs.  $15,7 \pm 7,0$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0,01$ ), independiente de la insulino-resistencia, aumento de AGL ( $0,55 \pm 0,19$  vs.  $0,37 \pm 0,15$  mmol/l;  $p < 0,05$ ) y mayor proporción de VLDL grande, mediana(rango):  $23,0\%$ ( $2,1-57,4$ ) vs.  $9,6\%$ ( $1,0-26,5$ );  $p = 0,045$  y QR ( $18,6\%$ ( $0,6-36,9$ ) vs.  $9,2\%$ ( $0,4-24,0$ );  $p = 0,039$ ), con disminución en la proporción de VLDL típica:  $62,5\%$ ( $27,2-98,2$ ) vs.  $90,3\%$ ( $72,2-98,9$ )  $p = 0,020$ . AGL correlacionó con VLDL grande ( $r = 0,58$ ;  $p = 0,003$ ), aun ajustando por HOMA y cintura ( $F = 5,9$ ;  $p = 0,03$ ) y QR se asoció con la cintura ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,026$ ); incluso después de ajustar por HOMA ( $F = 3,9$ ;  $p < 0,05$ ). Adiponectina se asoció negativamente con la proporción de VLDL grande ( $r = -0,44$ ;  $p = 0,04$ ). En el SM, el flujo de AGL desde el tejido adiposo estaría conectado con la producción de partículas de VLDL grandes, independientemente del grado de insulino-resistencia y la obesidad abdominal. La disminución en adiponectina se vincularía con el aumento en el tamaño de las VLDL circulantes.

**433. (143) ATEROGENICIDAD DE VLDL EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA TERMINAL**

Cacciagiù L.<sup>1</sup>; Lucero D.<sup>2</sup>; Meroño T.<sup>3</sup>; Miksztoiwicz V.<sup>4</sup>; De'ariziani G.<sup>5</sup>; Elbert A.<sup>6</sup>; Gonzalez A.<sup>7</sup>; Brites F.<sup>8</sup>; Berg G.<sup>9</sup>; Schreier L.<sup>10</sup>

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Departamento de Bioquímica Clínica, FFyB, INFIBIOC, UBA<sup>1,2,3,4,7,8,9,10</sup>; Centro de Enfermedades Renales e Hipertensión Arterial, CEREAH<sup>5,6</sup>

leodamian2000@hotmail.com

En pacientes con enfermedad renal crónica terminal (ERCT), la mortalidad por causas cardiovasculares se encuentra marcadamente elevada, aun en aquellos bajo tratamiento sustitutivo de hemodiálisis (HD). La moderada hipertrigliceridemia es una de las características de la dislipemia en esta patología. Alteraciones en las lipoproteínas ricas en triglicéridos, entre ellas la VLDL, aumentarían su aterogenicidad. Nuestro objetivo es evaluar las características de las VLDL circulantes de pacientes con ERCT en HD. Se estudiaron 70 pacientes en HD y 30 controles sanos (C), ambos sexos, edad HD:  $61,2 \pm 17,3$  años y C:  $32,0 \pm 10,9$ ;  $p < 0,0001$ ). En suero en ayunas se midió el perfil lipídico-lipoproteico, actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) y se aisló VLDL por ultracentrifugación que se caracterizaron en su composición química y se determinó su tamaño por cromatografía líquida de exclusión molecular-HPLC. CETP en pacientes HD fue mayor que en controles ( $247 \pm 73$  mL/h vs  $207 \pm 65$ ;  $p = 0,0065$ ). Partículas de VLDL en HD presentaron mayor contenido de colesterol, proteínas y fosfolípidos, mg/dL suero ( $15,5 \pm 9,8$ ;  $22,7 \pm 10,8$ ;  $19,7 \pm 11,3$  vs  $9,4 \pm 6,2$ ;  $11,1 \pm 8,1$ ;  $13,1 \pm 6,0$ ; respectivamente  $p < 0,001$ ), índice COL/TG: HD:  $0,42 \pm 0,13$  y C:  $0,28 \pm 0,06$ ;  $p < 0,001$ . Además presentaron más Apo-B ( $10,3 \pm 4,8$  vs  $4,9 \pm 2,6$ ;  $p < 0,0001$ ), indicando mayor número de partículas. Con respecto al tamaño de VLDL, en HD hay mayor proporción de VLDL pequeñas ( $5,2 \pm 5,0\%$  vs  $2,2 \pm 1,5$ ;  $p = 0,037$ ) a expensas en una disminución de VLDL2 o típica ( $80,3 \pm 11,2$  vs  $88,2 \pm 7,4$ ;  $p = 0,020$ ). CETP correlacionó con COL-VLDL,  $r = 0,32$   $p = 0,0029$ , justificando el enriquecimiento en colesterol de las VLDL y por otro lado CETP correlacionó negativamente con %VLDL2  $r = -0,40$ ;  $p = 0,0473$  sugiriendo su conversión en VLDL más pequeñas. Las VLDL de los pacientes con ERCT en HD presentaron características estructurales compatibles con mayor poder aterogénico.

**434. (527) EL EJERCICIO MODERADO PREVIENE ALTERACIONES CORTICOADRENALES EN RATAS CON INSULINORRESISTENCIA (IR) INDUCIDA POR UNA DIETA RICA EN SACAROSA (DRS)**

Martinez Calejman C.<sup>1</sup>; Di Gruccio J.<sup>2</sup>; Jaume D.<sup>3</sup>; Sanchez R.<sup>4</sup>; Mercou M.<sup>5</sup>; Astort F.<sup>6</sup>; Arias P.<sup>7</sup>; Cymeryng C.<sup>8</sup>

Facultad de Medicina, UBA, CEFYBO, CONICET<sup>1,2,3,4,5,6</sup>

<sup>8</sup>; Facultad de Ciencias Médicas Universidad del Litoral<sup>7</sup> camilamartinez@hotmail.com

Introducción: Evaluamos previamente el impacto de la IR inducida por una DRS sobre función y morfología corticoadrenales. La actividad física reduce la IR tanto en pacientes como en modelos animales con esta alteración. Por ende, quisimos estudiar los efectos del ejercicio físico (EF) moderado sobre las alteraciones corticoadrenales presentes en ratas con IR inducida por una DRS. Metodología: Ratas Wistar macho adultas recibieron sacarosa al 30% con el agua de bebida (DRS) o su dieta habitual (C) por un período de 9 semanas. Un grupo tratado con dieta (DRSE) y a un grupo control (CE) fueron sometidos gradualmente a EF moderado en cinta continua (hasta alcanzar 0.8 km/h durante 6 min, 5 días por semana). Tras 9 semanas medimos sensibilidad a la insulina (prueba de tolerancia con 0.75 U/kg i.p. de insulina) y función adrenal (secreción de corticosterona tras estimulación aguda con ACTH 7 UI/kg) y, en tejido adrenal, niveles de TG y colesterol, expresión de proteínas involucradas en la esteroidogénesis (CYP11A1) y en su regulación (COX-2, receptor de ACTH MCR2), así como de marcadores inflamatorios (TNF- $\alpha$ ). Evaluación estadística: pruebas paramétricas y no paramétricas para datos no apareados. Resultados: en los animales sometidos a EF detectamos una reducción de la IR (índice k: DRSE 1.88  $\pm$  0.22, vs. DRS 1.68  $\pm$  0.12 mg\*ml/min, p <0.05; media  $\pm$  SEM), cambios favorables en los niveles de TG adrenales (0.13  $\pm$  0.04 vs 0.39  $\pm$  0.08 g x prot/l, P<0,001) y en la expresión de CYP11A1, COX-2, MCR2 y TNF- $\alpha$ , así como una restauración de la respuesta aguda a ACTH. Discusión: La implementación de un protocolo de EF moderado en animales tratados con DRS aumentó su insulinosensibilidad y previno la aparición de alteraciones bioquímicas en la corteza adrenal. Asimismo mejoró la funcionalidad adrenal corrigiendo la respuesta aguda a la ACTH.

**435. (555) EFECTO PROTECTOR DEL ÁCIDO LIPOICO SOBRE EL DESARROLLO DE ESTRÉS OXIDATIVO Y LAS ACCIONES METABÓLICAS INDUCIDAS POR DIETA RICA EN FRUCTOSA (DRF)**

Castro M.<sup>1</sup>; Francini F.<sup>2</sup>; Schinella G.<sup>3</sup>; Castrogiovanni D.<sup>4</sup>; Gagliardino J.<sup>5</sup>; Massa M.<sup>6</sup>  
*Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada*<sup>1,2</sup>; *Cátedra de Farmacología (Facultad de Ciencias Médicas UNLP)*<sup>3</sup>; *IMBICE (CIC-CONICET)*<sup>4</sup>; *Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada*<sup>5,6</sup>  
 mcastro05@yahoo.com.ar

La administración de DRF a ratas normales se acompaña de aumento de marcadores de estrés oxidativo (EO). Objetivo: evaluar el efecto del ácido lipoico sobre a) marcadores de EO, b) el sistema antioxidante hepático y c) los cambios endocrino-metabólicos inducidos por DRF. Metodología: alimentamos ratas macho Wistar normales (180-200 g) con: a) dieta comercial estándar y agua corriente sin (control [C]) y b) con fructosa al 10% (DRF) y c) C y DRF más ácido lipoico (35 mg/kg peso corporal/día) inyectado durante los últimos 5 días de tratamiento (C-L y DRF-L). A los 21 días de tratamiento se midió: glucemia (G) (GOD-PAP), trigliceridemia (TG) (Kit comercial) e insulínemia (In) (RIA). En hígado se determinó: a) GSH y proteínas carboniladas, b) expresión de SOD, catalasa y GPx (qPCR), c) expresión proteica de UCP2 y PPARs, y d) actividad de enzimas y metabolitos hepáticos. Resultados: (\*p<0.05 vs. C; D p<0.05 vs. F; DD p<0.05 vs. C)

	C	DRF	C-L	DRF-L
In (ng/ml)	0,76 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,05*	0,6 $\pm$ 0,08	0,74 $\pm$ 0,08D
G (mg/dl)	114 $\pm$ 5	110 $\pm$ 4	104 $\pm$ 4	115 $\pm$ 3
TG (mg/dl)	96,5 $\pm$ 5,2	163 $\pm$ 12*	45 $\pm$ 9DD	71 $\pm$ 6,2D
GSH ( $\mu$ mol/g tejido)	3,2 $\pm$ 0,1E-4	2,0 $\pm$ 0,1E-4*	2,9 $\pm$ 0,15E-4	2,5 $\pm$ 0,2E-4D
Carbonilos (nmol/mg proteína)	1,1 $\pm$ 0,1E-2	1,9 $\pm$ 0,1E-2*	1,2 $\pm$ 0,01E-2	0,96 $\pm$ 0,3E-2D
GQ (mU/mg proteína)	3,3 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,2*	2,6 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,1D
G6P DH (mU/mg proteína)	4,5 $\pm$ 0,1E-2	9,6 $\pm$ 0,2E-2*	6 $\pm$ 0,1E-2	5,3 $\pm$ 0,03E-2D
Glucógeno ( $\mu$ g/mg tejido)	7,7 $\pm$ 0,3	14,8 $\pm$ 0,6*	6,0 $\pm$ 0,9	6,1 $\pm$ 0,9D
UCP2 (%)	103 $\pm$ 3	147 $\pm$ 11*	121 $\pm$ 1	80 $\pm$ 1D
PPARs (%)	91 $\pm$ 8	50 $\pm$ 5*	100 $\pm$ 15	72 $\pm$ 4

Asimismo el ácido lipoico corrige los cambios inducidos por la DRF sobre la expresión génica de las enzimas antioxidantes. Conclusión: el ácido lipoico previene la insulinoresistencia e hipertrigliceridemia, los cambios endocrino-metabólicos y el aumento de marcadores hepáticos de EO inducidos por la DRF. El hecho sugiere que el EO es el mediador de los cambios inducidos por el aumento de la ingestión de fructosa.

**436. (677) RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE METALO-PROTEASAS Y DENSIDAD VASCULAR EN TEJIDO ADIPOSO EN UN MODELO DE INSULINO-RESISTENCIA TEMPRANA.**

Miksztołowicz V.<sup>1</sup>; Zago V.<sup>2</sup>; Lucero D.<sup>3</sup>; Fernandez Machulsky N.<sup>4</sup>; Schreier L.<sup>5</sup>; Morales C.<sup>6</sup>; Berg G.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto de Bioquímica Clínica, FFyB, UBA*<sup>1,2,3,4,5,7</sup>; *Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, UBA*<sup>6</sup>  
 veronicamik@ffybu.uba.ar

Las metaloproteasas (MMPs) intervienen en la remodelación de la matriz extracelular y en la angiogénesis durante el desarrollo del tejido adiposo (TA). Si bien en animales alimentados con dietas ricas en grasas (DRG) se observa aumento en la actividad de MMPs asociadas a mayor expresión de PPARs en TA, aun existen controversias respecto al comportamiento de las mismas en situaciones de insulino-resistencia (IR). Objetivo: evaluar la actividad de MMP-2 y -9 y la densidad vascular en TA de un modelo animal en estadio temprano de IR inducida por dieta rica en sacarosa (DRS). Ratas macho Wistar adultas subdivididas en 2 grupos recibieron 12 semanas dieta estándar (Control n=5) y DRS (n=5) al 30% en agua de bebida. Se determinaron parámetros metabólicos como indicadores de IR. Se removió y pesó TA visceral (perirrenal, intestinal y epididimal) y se midió actividad gelatinolítica y expresión de PPAR $\gamma$  en TA epididimal. Se evaluó densidad vascular (cantidad de vasos/campo) en un total de 30 campos a X 400. DRS vs C presentó aumento de insulina: 15,6 (0,8-31) vs 0,76 (0,04-6,1) ng/ml p<0,002, manteniendo glucemias sin diferencias, aumento de triglicéridos: 140 $\pm$ 82 vs 54 $\pm$ 14 mg/dl p<0,05 y ácidos grasos libres: 0,7 $\pm$ 0,2 vs 0,5 $\pm$ 0,1 mM p<0,04. DRS mostró aumento de TA visceral 15,1 $\pm$ 2,8 vs 8,4 $\pm$ 2,3 g p<0,008, y disminución de MMP-2: 0,60 $\pm$ 0,09 vs 1,10 $\pm$ 0,27 p<0,01 y MMP-9: 1,14 $\pm$ 0,57 vs 4,03 $\pm$ 2,55 p<0,032 (Unidades Arbitrarias). Por inmunohistoquímica se evidenció en ambos grupos presencia de MMP-9 en capilares (células endoteliales), estroma conectivo perivascular, fibroblastos y macrófagos. En DRS se observó menor densidad vascular: 2,53 (1,48-2,71) vs 3,24 (2,57-3,33) p<0,03 y expresión de PPAR $\gamma$  (p<0,04). A diferencia de lo observado en obesidad inducida por DRG, en etapas tempranas de IR/hiperinsulinemia por DRS, la menor actividad de ambas MMPs estaría modulada negativamente reflejándose en una disminución de la densidad vascular, independientemente de la expresión de PPAR $\gamma$ .

**437. (684) EFECTO BENEFICIOSO DE DIETAS SUPLEMENTADAS CON ACEITE DE GIRASOL ALTO OLEICO SOBRE EL COLESTEROL-HDL EN UN MODELO ANIMAL.**

Macri E.<sup>1</sup>; Lucero D.<sup>2</sup>; Cacciagiú L.<sup>3</sup>; Suarez C.<sup>4</sup>; Friedman S.<sup>5</sup>; Schreier L.<sup>6</sup>; Zago V.<sup>7</sup>  
*Cátedra de Bioquímica General y Bucal, Fac. Odontología, UBA*<sup>1,4,5</sup>; *Lab. de Lípidos y Lipoproteínas, Depto. Bioquímica Clínica INFIBIOC, FFyB, UBA*<sup>2,3,6,7</sup>  
 vanesamacri@gmail.com

El aceite de girasol alto oleico (AGAO) se promociona como una buena opción nutricional para el reemplazo de grasas saturadas y trans. Sin embargo, son pocos los estudios realizados que demuestren sus beneficios sobre las lipoproteínas plasmáticas. En estudios previos vimos que la dislipemia aterogénica asociada a la insulino-resistencia (IR) se caracteriza por una sobreproducción de VLDL sobrecargadas en triglicéridos (TG) y disminución de colesterol-HDL. Objetivo: estudiar el efecto del consumo de AGAO (83% de 18:1  $\omega$ -9) sobre el perfil lipídico y el tipo de VLDL producidas en un modelo de IR. Se estudiaron ratas wistar macho, 180-200g, n=20. Se dividieron al azar en 4 grupos que recibieron diferentes



dietas durante 12 semanas: dieta suplementada con AGAO + 30% sacarosa en el agua de bebida (AGAO-S, n=5), dieta estándar + 30% sacarosa (DE-S, n=5) y los controles AGAO-C (n=5), y DE-C (n=5). Se midió en suero: perfil lipídico, glucosa, insulina, ácidos grasos libres (AGL). Se aisló VLDL (d=1,006 g/ml) y se determinó su composición química porcentual. El grupo AGAO-S en comparación con DE-S mostró: aumento de colesterol-HDL (29±4 vs 22±1 mg/dl, p<0,001), sin cambios en el colesterol-no HDL y disminución de AGL (0,46±0,06 vs 0,74±0,20 mmol/l; p<0,05), sin embargo, se mantuvo el contenido de TG en VLDL (64±5% y 67±7%, p=0,56). AGAO-C respecto a DE-C también presentó aumento de colesterol-HDL (35±7 vs 26±4 mg/dl, p<0,05) y disminución de colesterol-no HDL (17±7 vs 27±6 mg/dl, p<0,05). La dieta suplementada con AGAO produce un perfil lipoproteico más favorable con respecto al riesgo cardiovascular, aunque la disminución de los AGL no logró mejorar las características cualitativas de las VLDL secretadas.

#### 438. (686) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LIPASA HEPÁTICA EN LA ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA.

Miksztoiwicz V.<sup>1</sup>; Lucero D.<sup>2</sup>; Zago V.<sup>3</sup>; Cacciagiú L.<sup>4</sup>; Lopez G.<sup>5</sup>; Gonzalez Ballera E.<sup>6</sup>; Sordá J.<sup>7</sup>; Fassio E.<sup>8</sup>; Schreier L.<sup>9</sup>; Berg G.<sup>10</sup>

Laboratorio de Lípidos y Lipoproteínas, Dpto de Bioquímica Clínica, FFyB, UBA<sup>1 2 3 4 5 9 10</sup>; División de Gastroenterología Hospital de Clínicas, UBA<sup>6 7</sup>; Servicio de Hepatología, Hospital Muñiz<sup>8</sup>  
veronicamik@ffybu.uba.ar

La Lipasa Hepática (LH) es una enzima lipolítica sintetizada por los hepatocitos y localizada en los capilares de los sinusoides hepáticos. Interviene en el catabolismo de distintas lipoproteínas como triglicérido (TG)-hidrolasa. La actividad de la LH se encuentra aumentada en situaciones de Insulino Resistencia (IR). La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) esta caracterizada por IR, y hasta hoy no se conoce el comportamiento de la LH en EHGNA. Objetivos: Evaluar actividad de LH como TG-hidrolasa en plasma postheparinico (PPH) de pacientes con y sin EHGNA. Se estudiaron 56 pacientes con EHGNA y 47 controles. En suero se evaluó perfil lipídico-lipoproteico, glucosa, insulina, adiponectina, PCRhs, por ultracentrifugación se aisló y caracterizó la lipoproteína de densidad intermedia (IDL) y LDL pequeña y densa (LDLpyd). Se obtuvo PPH 10 minutos post-inyección endovenosa de 60UI heparina/Kg y se midió actividad de LH. Los pacientes con EHGNA presentaron mayor HOMA [3,4 (0,5-21,9) vs 1,2 (0,4-9);p<0,001], %LDLyd (29±5 vs 11±6;p<0,001), PCRhs [3,4 (0,3-31,8) vs 1,3 (0,01-11,7) mg/l;p<0,001] y actividad de LH [13,8 (5,7-31,3) vs 10,9 (3,9-20,5) umolAG/mlPPH.h;p<0,01], y menor col-HDL (1,0±0,2 vs 1,5±0,4 mmol/l), ApoAI (143±24 vs 169±41mg/dl) y adiponectina (5,5±3,1 vs 12,9±10,4 µg/ml) p<0,001. La actividad de LH correlacionó positivamente con BMI (r=0,29;p<0,023), insulina (r=0,41;p<0,003), HOMA (r=0,45;p<0,001), %LDLpyd (r=0,46;p<0,04), apoB (r=0,29;p<0,01) y negativamente con col-IDL (r=-0,32;p<0,004), col-HDL (r=-0,35;p<0,003), apoA (r=-0,32;p<0,05) y adiponectina (r=-0,31;p<0,008). El aumento de LH se mantuvo aun después de ajustar por HOMA (F=5,36;p<0,03) y sexo (F=5,36;p<0,03). La mayor actividad de LH sería responsable del perfil lipoproteico mas aterogénico en EHGNA, aumentando el riesgo cardiovascular, independientemente de la IR y de la disminución de adiponectina. Por lo tanto, otros factores modularían la síntesis y/o la actividad de la enzima.

### ENDOCRINOLOGÍA 5

#### 439. (607) INFLAMACIÓN EN CORAZÓN DE RATA HIPOTIROIDEA PREÑADA

Carmona Vigilanco Y.<sup>1</sup>; Oliveros L.<sup>2</sup>; Gimenez M.<sup>3</sup>  
IMIBIO-UNSL-San Luis<sup>1 2 3</sup>  
yami.cv@hotmail.com

Previamente comunicamos que el hipotiroidismo en corazón de rata virgen produce una disminución de los receptores tiroideos

(TR-α y TR-β), aumento de la concentración proteica de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), sin cambios en NOS endotelial (eNOS), y en la expresión del ARNm de receptor activador de la proliferación de peroxisomas-γ (PPAR-γ) y factor de necrosis tumoral-α (TNF-α). Hasta el presente no se conoce el efecto del hipotiroidismo sobre el perfil inflamatorio del corazón en ratas preñadas. En este trabajo estudiamos si el hipotiroidismo afecta la expresión de receptores nucleares e induce inflamación en el corazón de ratas preñadas. El modelo de hipotiroidismo fue inducido por 6-n-propil-2-tiouracilo (100 mg/g de peso corporal) en el agua de bebida de ratas Wistar (200-230 g de peso corporal) a partir de 8 días antes del apareamiento hasta el sacrificio, el día 21 de preñez. Ratas preñadas eutiroides se utilizaron como controles. En ventrículo de corazón, se determinó el nivel de las proteínas COX-2, iNOS y eNOS por Western blot, y la expresión del ARNm de los receptores de las hormonas tiroideas (TR-α y TR-β), de PPARγ y TNF-α, por RT-PCR, usando β-actina como control interno. Los niveles de ARNm de TR-α y TNF-α disminuyeron significativamente en el corazón de las ratas hipotiroideas p<0,05, mientras que la expresión de PPAR-γ y TR-β no mostraron diferencias, respecto al corazón eutiroides. La expresión de las proteínas iNOS y COX-2 disminuyeron, sin cambio en la expresión de eNOS. Nuestros resultados sugieren que el hipotiroidismo afecta el perfil inflamatorio en el corazón de rata preñada. Asimismo, las diferencias observadas respecto al corazón de rata virgen podrían atribuirse a los cambios hormonales propios de la preñez.

#### 440. (557) CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTROGENOS ASOCIADOS A MEMBRANA EN CELULAS ADENOHIPOFISARIAS

Zárate S.<sup>1</sup>; Jaita G.<sup>2</sup>; Ferraris J.<sup>3</sup>; Eijo G.<sup>4</sup>; Magri M.<sup>5</sup>; Pisera D.<sup>6</sup>; Seilicovich A.<sup>7</sup>

Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>  
szarate@fmed.uba.ar

En la adenohipofísis, los estrógenos regulan diversas funciones celulares mediante mecanismos clásicos y no clásicos. Estos últimos involucran la activación de receptores de estrógenos (ERs) asociados a la membrana plasmática. Previamente hemos demostrado que tanto el estradiol (E2) como conjugados de E2 y macromoléculas, los cuales no difunden hacia el interior de la célula, inducen una rápida respuesta apoptótica en células adenohipofisarias, lactotropos y somatotropos. El antagonista de ERs clásicos, ICI 162,780, revierte completamente este efecto, indicando que la activación de estos receptores asociados a la membrana plasmática estaría involucrada en el efecto proapoptótico del E2. En el presente trabajo, determinamos las variantes del receptor de estrógenos alfa (ERα) asociadas a la membrana plasmática de células adenohipofisarias. A partir de cultivos primarios de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembras Wistar adultas, obtuvimos extractos enriquecidos en proteínas de membrana por biotilación de la superficie celular, los cuales fueron analizados por Western Blot. Utilizando un anticuerpo dirigido hacia el dominio carboxilo-terminal del ERα, identificamos la presencia de tres isoformas del receptor, una de 67 kDa (mERα67), otra de 39-41 kDa y otra de 21-22 kDa. También evaluamos si el E2 regula esta asociación entre el receptor y la membrana de manera dependiente del tiempo. Incubamos cultivos primarios de células adenohipofisarias provenientes de ratas ovariectomizadas con E2 1 nM durante 0-120 min, realizando un análisis similar de biotilación de superficie celular y Western Blot. El E2 aumentó la expresión de mERα67 en forma transitoria, observándose niveles máximos a los 30 min de incubación (ANOVA de una vía, p<0,05). Estos resultados sugieren que el E2 podría afectar de forma rápida la respuesta de las células adenohipofisarias mediante cambios en la expresión de los ER asociados a la membrana celular.

#### 441. (16) DETECCIÓN DE SINDROME DE CUSHING SUBCLÍNICO EN PACIENTES AMBULATORIOS ASISTIDOS EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO

Cardoso E.<sup>1</sup>; Arregger A.<sup>2</sup>; Dorado E.<sup>3</sup>; Zucchini A.<sup>4</sup>; Sanchez R.<sup>5</sup>; Contreras L.<sup>6</sup>

IDIM A. Lanari, UBA, CONICET<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
endoexp2000@yahoo.com

El síndrome de Cushing Subclínico (SCS) es un estado bioquímico de exceso de cortisol en ausencia del cuadro clínico clásico de hipercorticismos manifiesto, siendo un desafío su diagnóstico. Se investigó SCS en una población de riesgo constituida por 90 pacientes ambulatorios con: diabetes mellitus y mal control metabólico (n=63); tumores adrenales incidentales (n=12); hipertensión arterial con obesidad central (n=10); hirsutismo (n=5) y litiasis renal (n=10). El grupo de referencia incluyó 100 voluntarios sanos y 21 pacientes con Síndrome de Cushing manifiesto (SC). El estudio fue autorizado por el Comité de Ética de la Institución y los participantes dieron su consentimiento por escrito. Todos recolectaron orina de 24 hs para cortisol libre urinario (CLU); saliva a las 23 hs para cortisol (SAF23) y obtuvieron saliva y sangre matutinas para cortisol post 1 mg de dexametasona oral nocturna (SAFdex y Fdex, respectivamente). Ningún sujeto recibía drogas que afectaran la función adrenal. Se determinó cortisol en saliva, suero y orina por RIA. En los pacientes con un resultado patológico se midió ACTH pl. (IRMA). El análisis estadístico se realizó con SPSS, definiéndose sensibilidad (S) y especificidad (E). Resultados: para descartar SC (análisis ROC) el grupo de referencia definió CLU  $\leq 248,0$  nM/d (S: 95,2% E:100%); SAF23  $\leq 3,8$  nM (S:100%, E: 97,5%); SAFdex  $\leq 2,0$  nM (S:100%, E: 100%) y Fdex  $\leq 50,0$  nM (S: 100%, E:100%). La dependencia de ACTH en SC se asoció a ACTH pl.  $> 10,0$  pg/ml. Se diagnosticó SCS en 3 pacientes (#1 y 2: hipertensos; # 3 tumor adrenal incidental) (tabla):

Paciente #	CLU (nM/d)	SAF23(nM)	SAFdex(nM)	Fdex(nM)	ACTH(pg/ml)
1	363,0; 240,0	5,0; 4,5	7,0	414,0	20,0
2	2004,0; 650,0	13,0; 12,0	6,0	275,0	27,0
3	200,0; 190,0	1,5 ; 0,8	2,2	63,0	5,0

Conclusión: se confirmó SCS en el 3,3% de la población de riesgo estudiada. El hallazgo de parámetros bioquímicos normales no excluyó la presencia de SCS.

#### 442. (90) LA ESTIMULACIÓN SENSORIAL Y LA ACTIVIDAD FÍSICA VOLUNTARIA MODULAN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA SÍNTESIS DE NEUROESTEROIDES EN EL HIPOCAMPO

Rossetti M.<sup>1</sup>; Varayoud J.<sup>2</sup>; Moreno-piovano G.<sup>3</sup>; Muñoz-toro M.<sup>4</sup>; Luque E.<sup>5</sup>; Ramos J.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
mfrossetti@fcb.unl.edu.ar

La exposición de animales de laboratorio a una variedad de estímulos sensoriales parecería contribuir a un mejoramiento de la memoria y el aprendizaje, incluso en situaciones como el estrés, el envejecimiento y los procesos neurodegenerativos. Sumado a ello, se ha postulado el efecto beneficioso de algunos esteroides sintetizados en el cerebro (como el 17 $\beta$ -estradiol y la progesterona) sobre diferentes estructuras cerebrales. El objetivo de este trabajo fue conocer la influencia de ambientes con estimulación sensorial y estimulación motora sobre la expresión de las enzimas esteroideogénicas (Cyp11a, 3 $\beta$ -HSD y Cyp19a) y los receptores de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ) y progesterona (RP) en el hipocampo de la rata hembra. Para ello, ratas Wistar de 3 meses de edad fueron colocadas en jaulas con estimulación motora (AE.1), en jaulas con un ambiente sensorialmente enriquecido (AE.2) y en jaulas con un ambiente estándar utilizado como control (AS) durante 10 días. Para lograr la estimulación motora se emplearon ruedas giratorias; mientras que para la estimulación sensorial se utilizaron juguetes y túneles de diferentes formas y tamaños. Los hipocampos se disecaron y almacenaron a -80°C para posterior extracción de ARN y RT-PCR en tiempo real. En el grupo AE.1, los niveles de ARNm correspondientes a Cyp11a (Control: 1,00  $\pm$  0,16; AE.1: 0,67  $\pm$  0,12; p< 0,05) y Cyp19a (Control: 1,00  $\pm$  0,13; AE.1: 0,67  $\pm$  0,10; p<0,05) disminuyeron significativamente. De igual manera, Cyp11a (Control: 1,00  $\pm$  0,18, AE. 2: 0,63  $\pm$  0,10; p< 0,05) y Cyp19a (Control: 1,00

$\pm$  0,13, AE. 2: 0,31  $\pm$  0,04; p<0,05) se encontraron disminuidas en el grupo AE.2 con respecto a los controles. Adicionalmente, la expresión del ARNm de RE $\alpha$  y RP fue menor en los grupos AE.1 y AE.2 (p<0,05). Estos resultados muestran que la estimulación sensorial y la actividad física voluntaria modulan la expresión de enzimas esteroideogénicas y RE $\alpha$  y RP en el hipocampo, modificando posiblemente la síntesis de neuroesteroides en el cerebro.

#### 443. (94) EFECTO DE LA ENZIMA GALACTOSA 3 O SULFO-TRANSFERASA 2 RECOMBINANTE SOBRE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN UN MODELO DE ADIPOCITOS IN VITRO

Cosentino S.<sup>1</sup>; Calzadilla P.<sup>2</sup>; Calvo J.<sup>3</sup>; Guerra L.<sup>4</sup>  
*Dep. Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 4</sup>; IByME<sup>3</sup>.*  
solecosen@hotmail.com

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar proteínas que medien la interacción entre epitelio y tejido adiposo en la glándula mamaria. Estudiamos la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, evaluando acumulación de triglicéridos (Tg) y expresión del factor de transcripción adipogénico C/EBP $\beta$ . Previamente mostramos que una proteína purificada TgIF (Tg inhibitory factor), secretada por células mamarias murinas (NMMG), inhibe un 70% tanto la acumulación de lípidos como la expresión de C/EBP $\beta$  en adipocitos de ratón (cultivos primarios y línea 3T3-L1). Con MALDI demostramos que TgIF sería la enzima galactosa 3-O-sulfotransferasa 2 (GST). Ahora, nuestro objetivo es evaluar el efecto de GST recombinante sobre los parámetros descriptos. cDNA de GST clonado en pSVK 3 se amplificó utilizando como marcador de selección ampicilina, y se confirmó su presencia con enzimas de restricción. Se obtuvo GST por transfección de células BHK21 (que no producen esta proteína). Los preadipocitos 3T3-L1 se diferenciaron a adipocitos con agentes inductores, en presencia o ausencia de GST recombinante. Realizamos un estudio temporal (1, 2 y 4 días) de la expresión de C/EBP $\beta$  durante la diferenciación en: células control no diferenciada (CC), células diferenciadas (CD) y células diferenciadas tratadas con GST (DC + GST). La expresión de C/EBP $\beta$  se relativizó por actina y por CC. Su expresión mostró un máximo al día 4, observando en CD una expresión 3 veces mayor que en CC, mientras que GST provocaría una inhibición, al día 4, mayor al 50% (CD: 2.73 UA; CD + GST: 1.32 UA). GST también inhibió la acumulación de Tg en CD, disminuyendo un 31% la media obtenida (CD: 420 + 36 ug Tg/ ug ADN; CD + GST: 288 + 101 ug Tg/ ug ADN). Estos primeros resultados muestran que GST inhibiría acumulación de Tg y expresión de C/EBP $\beta$ . Otros autores mostraron relación entre sulfataciones y la diferenciación de preadipocitos; postulamos que la enzima GST podría tener un papel todavía no descripto.

#### 444. (104) EL EFECTO ANTI-MITOGÉNICO DEL TGF-BETA1 EN CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS TUMORALES ES POTENCIADO POR INHIBIDORES DE LAS VÍAS PI3K/AKT Y MEK/ERK1/2

Petiti J.<sup>1</sup>; Sabatino E.<sup>2</sup>; Gutiérrez S.<sup>3</sup>; Sosa L.<sup>4</sup>; Vaca A.<sup>5</sup>; De Paul A.<sup>6</sup>; Torres A.<sup>7</sup>  
*Centro de Microscopía Electrónica, Fac. Cs. Médicas, UNC<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
jpetiti@cmefcm.uncor.edu

TGF- $\beta$ 1 es un supresor tumoral y la pérdida genética o epigenética de su señalización induciría la formación y progresión de tumores. Uno de los mecanismos por el cual TGF- $\beta$ 1 actúa como inhibidor de la proliferación es induciendo el arresto del ciclo celular en la fase G1. TGF- $\beta$ 1 ejerce su acción a través de la activación de Smads, aunque existen evidencias que involucran otras vías de señalización. Nuestro objetivo fue determinar la contribución de PKCs, la vía PI3K/Akt y MEK/ERK1/2 como moduladores de la respuesta anti-proliferativa inducida por TGF- $\beta$ 1 en células adenohipofisarias tumorales. Cultivos de células GH3B6 se trataron con TGF- $\beta$ 1 (4ng/ml, 24h) sólo o con una pre-incubación de 30 min con los inhibidores: LY294002 (PI3K 10 $\mu$ M) y PD98059 (MEK1/2; 50 $\mu$ M). Se analizó el ciclo celular por citometría de flujo y la expresión de p-Smad2/3, PKC $\alpha$ , p-Akt y p-ERK1/2 por WB. La translocación

subcelular de p-Smad2/3 y PKC $\alpha$  se observó por microscopía confocal. Estadística: ANOVA-Fisher. El tratamiento con TGF- $\beta$ 1 indujo un aumento de células en fase G0/G1 ( $p < 0.05$ ), efecto que fue potenciado por los inhibidores de PI3K y MEK1/2 ( $p < 0.05$ ). En forma paralela TGF- $\beta$ 1 indujo fosforilación de Smad2/3 la cual se incrementó luego del pre-tratamiento con LY294002 y PD98059. Por el contrario, TGF- $\beta$ 1 disminuyó la expresión de PKC $\alpha$  y la fosforilación de ERK1/2, previamente relacionadas con la inducción del ciclo de células GH3B6. La microscopía confocal reveló translocación de Smad2/3 desde el citosol al núcleo y una redistribución de PKC $\alpha$  desde el citosol a la membrana plasmática luego del tratamiento con TGF- $\beta$ 1. Estos resultados demuestran que el efecto anti-mitogénico del TGF- $\beta$ 1 en células adenohipofisarias tumorales es mediado por la activación de Smad2/3 y potenciado por la inhibición de las vías PI3K/Akt y PKC $\alpha$ /MEK/ERK1/2. La identificación de mediadores intracelulares no clásicos que participan en el efecto inhibitorio de TGF- $\beta$ 1 permitiría postular nuevos blancos terapéuticos.

**445. (114) REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS ALFA (ERA) EN EL HIPOCAMPO MEDIADA POR ESTRADIOL**

Moreno-piovano G.<sup>1</sup>; Varayoud J.<sup>2</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>3</sup>; Luque E.<sup>4</sup>; Ramos J.<sup>5</sup>

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL<sup>1 2 3 4 5</sup>

gmoreno@fbc.unl.edu.ar

Se ha demostrado que los estrógenos influyen sobre funciones neurobiológicas asociadas al hipocampo siendo el receptor de estrógenos alfa (ERA) el principal mediador. El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar las modificaciones en la expresión del ERA en el hipocampo de ratones hembra ovariectomizadas (OVX) a los 3 meses de edad luego de la administración de 17beta-estradiol (E2). A los 10 días post OVX los animales fueron tratados con una única dosis de 2 mcg de E2 (grupo tratado; E; n=6) o con 100 mcl de aceite de sésamo (grupo control C; n=6). El sacrificio de los animales se realizó a las 4 hs post inyección. Mediante microcirugía se extrajeron los hipocampos completos los cuales fueron procesados en forma individual. La expresión del ARNm del ERA y la actividad transcripcional de sus promotores A, B, C y F se evaluaron por RT-PCR en tiempo real. Seguidamente, en los promotores que mostraron cambios en su actividad relativa estudiamos el nivel de acetilación de histonas H3 y H4 por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Los animales tratados con E2 mostraron una disminución significativa en la expresión del ARNm del ERA al compararlo con los controles ( $p < 0.001$ ). Al estudiar la actividad relativa de cada uno de los promotores del gen ERA se observó que los animales E presentaban una disminución en la actividad de los promotores A y C ( $p < 0.001$ ), en tanto que la actividad del promotor F se encontró aumentada ( $p < 0.05$ ) y la del B no presentó cambios ( $p = 0,7$ ). El análisis por ChIP de los promotores A y C no reveló cambios en el patrón de acetilación de las histonas H3 y H4 de los animales experimentales. Los datos recopilados hasta el momento indicarían que la down-regulation de la expresión del ERA sería mediada, al menos en parte, por una disminución de la actividad de los promotores A y C del receptor. Los procesos de desacetilación de histonas no explicarían la menor expresión de las variantes A y C en las regiones evaluadas.

**446. (217) CAMBIOS DE LA CAPACIDAD ADIPOGÉNICA IN VITRO EN UN MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR DIETA RICA EN FRUCTOSA**

Zubiría M.<sup>1</sup>; Fariña J.<sup>2</sup>; Gagliardino J.<sup>3</sup>; Spinedi E.<sup>4</sup>; Giovambattista A.<sup>5</sup>

Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CONICET, CICPBA<sup>1 4 5</sup>; Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada, CONICET, UNLP<sup>2 3</sup>  
guillerminazubiría@imbice.org.ar

La obesidad central y el Síndrome Metabólico (SM) se caracterizan por aumento del tamaño y la masa de adipocitos y un perfil de secreción de adipocinas alterado. El aumento del consumo

de fructosa favorece el desarrollo de dichas alteraciones. Nuestro objetivo fue estudiar los cambios inducidos por la administración durante 3 semanas, de una dieta rica en fructosa (DRF; 10 % p/v en el agua de bebida) a ratas macho adultas normales sobre la adipogénesis in vitro del tejido adiposo retroperitoneal (TARP). Para ello se aislaron células de la Fracción Estroma Vascular (FEV) del TARP de ratas alimentadas con dieta normal (CTR) o DRF, evaluándose su capacidad proliferativa. Luego de inducida la diferenciación de pre-adipocitos, las células se cultivaron durante 10 días determinándose: contenido intracelular de lípidos (Oil Red O) y liberación de leptina (LEP) (RIA) al medio de cultivo. Al día 10 post-diferenciación se cuantificó: expresión celular de marcadores adipocitarios (PPAR- $\gamma$ , LEP, Adiponectina e IRS-1), porcentaje de diferenciación (presencia de vacuolas lipídicas) y el grado de maduración de los adipocitos obtenidos (posición nuclear luego de PAP). La capacidad proliferativa de las células de la FEV fue similar en ambos grupos. En cambio la liberación de LEP (días 8-10), el contenido lipídico (días 4-10) y la expresión de ARNm (día 10) de LEP, Adiponectina e IRS-1, fueron significativamente mayores en los adipocitos del grupo DRF ( $p < 0,05$  vs. CTR). El porcentaje de diferenciación resultó similar en ambos grupos pero el grado de maduración adipocitaria fue significativamente mayor en el grupo DRF ( $p < 0,05$  vs. CTR). Nuestros resultados sugieren que el consumo de DRF induce un incremento de la masa de TARP debido a una hipertrofia celular y un incremento de la capacidad adipogénica. El aumento del IRS-1 en esta etapa sugeriría una mayor respuesta a la insulina, actividad que favorecería los cambios mencionados. (PICT 2007-1051)

**447. (254) TIROTROFINA Y PERFIL LIPÍDICO EN LA MENOPAUSIA**

Melillo C.<sup>1</sup>; Prener P.<sup>2</sup>; Cabral A.<sup>3</sup>; Suescun M.<sup>4</sup>

Cátedra de Endocrinología, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP<sup>1 2 3 4</sup>; Instituto Médico Mater Dei, La Plata<sup>1</sup>; HIEAyC San Juan de Dios, La Plata<sup>2</sup>; Instituto Multidisciplinario de Biología Celular, CIC/CONICET, La Plata<sup>3 4</sup>  
claudiamelillo@gmail.com

El establecimiento de la menopausia es una etapa fisiológica en la que ocurren profundos cambios endocrinos y metabólicos. Por otra parte, la disfunción tiroidea afecta a una considerable franja de la población y es más frecuente en la mujer adulta. Ambas entidades se asocian a enfermedad cardiovascular y aterosclerosis. Objetivo: Comparar la relación entre Tirotrofina (TSH) y perfil lipídico en mujeres menopáusicas con y sin hipotiroidismo. Se estudiaron 70 pacientes menopáusicas hipotiroideas sin tratamiento (G1) y 130 bajo tratamiento con Levotiroxina (G2). Como grupo control se evaluaron 80 mujeres menopáusicas sin patología tiroidea (G3). Se determinaron los niveles de TSH sérica por Quimioluminiscencia, el perfil lipídico en autoanalizador (Beckman) así como los parámetros antropométricos (IMC y perímetro de cintura). Resultados: Se observaron diferencias en la proporción de mujeres con perfil lipídico normal, aumento de colesterol, aumento de triglicéridos o aumento de ambos lípidos entre los tres grupos (G1: 15, 64, 1 y 20%; G2: 40, 45, 1 y 15%; G3: 48, 35, 2 y 15% respectivamente). En todos los grupos, el valor medio de colesterol total resultó mayor al rango de referencia en adultos y aumentó significativamente en G1 vs G2 y G3 ( $p < 0.05$ ), reflejando una correlación directa con la TSH sérica. Las pacientes se sub-agruparon según cuatro intervalos en los niveles de TSH: 0.4-3.5, 3.5-5, 5-10 y >10 ng/mL. Se constató que para cada rango de TSH las concentraciones medias de colesterol, triglicéridos y LDL-col resultaban en G1>G2>G3. Asimismo se observó un aumento, relativo a la edad, en el IMC y el perímetro de cintura muy similar en G1, G2 y G3.

Estos resultados confirman que menopausia e hipotiroidismo contribuyen a alterar el perfil lipídico, acentuándose en las pacientes sin terapia sustitutiva tiroidea, determinando el deterioro de la calidad de vida y el aumento de morbi-mortalidad en la mujer.

**448. (331) EFECTOS IN VIVO E IN VITRO DEL TRATAMIENTO CON SAXAGLIPTINA SOBRE EL METABOLISMO ÓSEO DE RATAS**

Sbaraglini M.<sup>1</sup>; Mccarthy A.<sup>2</sup>; Cortizo A.<sup>3</sup>; Schurman L.<sup>4</sup>; Sedlinsky C.<sup>5</sup>; Molinuevo M.<sup>6</sup>  
*Grupo de Investigación en Osteopatías y Metabolismo Mineral, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
*mlsbaraglini@biol.unlp.edu.ar*

La Diabetes mellitus (DM) se puede asociar con osteoporosis, y consecuentemente con un incremento en la incidencia de fracturas de bajo estrés. Los pacientes con DM tipo 2 son frecuentemente tratados con inhibidores de la dipeptidilpeptidasa-4 como Saxagliptina, que mejoran el control glucémico post-prandial al incrementar la vida media de incretinas. En este trabajo estudiamos la acción in vivo en in vitro de Saxagliptina (Saxa) sobre el metabolismo óseo. Para los estudios in vivo utilizamos ratas Sprague Dawley machos jóvenes, divididas en dos grupos: sin tratamiento [C], y tratadas con Saxagliptina [S] (2mg/kg/día) durante 21 días. Los animales se sacrificaron y se diseccionaron los fémures y/o tibias para estudios histomorfométricos de la región metafisaria. Encontramos una disminución en la densidad osteocítica del hueso trabecular (73 %,  $p < 0,001$ ) para S respecto de C. Asimismo, el tratamiento con Saxa alteró la celularidad de las columnas de condrocitos en los cartílagos de crecimiento: disminuyó la zona de reserva (74% vs C,  $p < 0,01$ ), y aumentó las zonas de proliferación (167% vs C,  $p < 0,01$ ) e hipertrófica (121% vs C,  $p < 0,01$ ). Para los estudios in vitro incubamos osteoblastos MC3T3E1 con o sin 15uM de Saxagliptina, y en presencia o ausencia de diferentes mitógenos (1% suero fetal bovino [SFB], 5ng/ml insulina o 10-8M IGF-1). La Saxa no ejerció efectos directos sobre la proliferación osteoblastica. Sin embargo, la co-incubación de Saxa con los mitógenos, disminuyó el efecto proliferativo de estos últimos. Esto se observó para SFB (30% de inhibición,  $p < 0,05$ ), insulina (12%,  $p < 0,05$ ) e IGF-1 (20%,  $p < 0,05$ ). Luego de 10 días de diferenciación osteogénica, Saxa inhibió la producción de colágeno tipo 1 (79% vs Basal,  $p < 0,05$ ). Estos resultados muestran que la Saxagliptina in vivo puede alterar la micro-arquitectura y celularidad de huesos que soportan carga, e in vitro inhibir la proliferación y maduración de osteoblastos inducida por diferentes factores osteogénicos.

#### 449. (356) REGULACIÓN ESTROGÉNICA DE LA EXPRESIÓN DE C-FLIP EN LA ADENOHIPOFISIS

Jaita G.<sup>1</sup>; Zárate S.<sup>2</sup>; Ferraris J.<sup>3</sup>; Pisera D.<sup>4</sup>; Seilicovich A.<sup>5</sup>  
*Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*gjaita@fmed.uba.ar*

Nuestros resultados previos demuestran que los estrógenos incrementan la expresión de los receptores de muerte TNFR1 y Fas en la adenohipofisis. La proteína cFLIP interacciona con las procaspasas 8 y 10, modulando la activación de los receptores de muerte. Han sido identificadas tres isoformas de cFLIP, las isoformas cortas (cFLIPs y cFLIPr) y la isoforma larga (cFLIPL). Las isoformas cortas presentan una función anti-apoptótica en diversos tejidos mientras que la isoforma c-FLIPL tiene una acción antiapoptótica, pro-apoptótica o proliferativa de acuerdo al tejido y a su nivel de expresión. Aunque el NFkB, la vía de MEK/ERK y los andrógenos han sido sugeridos como factores moduladores de la expresión de cFLIP, no ha sido esclarecido aún el mecanismo que regula la expresión de cFLIP. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de las isoformas cFLIP en la adenohipofisis de ratas hembras Wistar e investigar la acción de los estrógenos sobre dicha expresión. Tanto cFLIPs como cFLIPL, identificadas por Western blot, están presentes en la adenohipofisis. En cultivos celulares de adenohipofisis provenientes de ratas ovariectomizadas (OVX), el 17 $\beta$ estradiol (E2, 10-9M) incrementó la expresión de cFLIPL (OVX: 1.50; E2: 1.91,  $p < 0,05$ , test t) pero no modificó la expresión de la isoforma cFLIPs (OVX: 0.33; E2: 0.46, ns). Por otra parte, la administración de E2 (i.p., 20 mg/100g de peso corporal) a ratas hembras OVX incrementó la expresión de cFLIPL en la adenohipofisis (OVX: 5.7; E2: 6.8,  $p < 0,05$ , test t). Estos resultados indican que ambas isoformas de cFLIP están presentes en la adenohipofisis y sugieren que los estrógenos podrían ser parte del mecanismo de regulación de la expresión de cFLIP, incrementando la expresión sólo de la isoforma larga.

#### 450. (397) COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE SISTEMAS ADENOVIRALES BIDIRECCIONALES REGULABLES MONO Y BIVECTORIALES QUE EXPRESAN SIMULTÁNEAMENTE TIMULINA Y GFP

Poch B.<sup>1</sup>; Costa M.<sup>2</sup>; Goya R.<sup>3</sup>; Regianni P.<sup>4</sup>  
*Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata<sup>1 2 3 4</sup>*  
*brendapoch@yahoo.com.ar*

Una de las cuestiones clave en la implementación de terapia génica radica en la capacidad de regular la expresión consistentemente. Con este propósito, y a fin de ampliar nuestros estudios sobre el rol de la hormona tímica timulina en el desarrollo del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico, construimos dos sistemas regulables Tet-Off, uno monovectorial y otro bivectorial, que expresan simultáneamente los transgenes para la green fluorescent protein (GFP) y el metFTS (análogo de timulina). Dichos sistemas constan de dos componentes: la unidad de respuesta, en la cual la transcripción de los transgenes se encuentra controlada por un promotor bidireccional regulado negativamente por doxiciclina (DOX), y la unidad transactivadora, que expresa la proteína regulatoria tTA. El sistema monovectorial contiene ambos componentes en un único adenovector recombinante (RAd), mientras que en el bivectorial cada componente es aportado por un RAd independiente. Nuestro objetivo fue determinar, in vitro, la eficiencia de ambos sistemas, comparando su funcionalidad y regulabilidad. Para el estudio de funcionalidad se utilizaron tres líneas celulares (CHO-K1, B92 y C2C12) y 5 MOI diferentes en el rango de 12 a 1000. Para evaluar la regulabilidad se emplearon 5 concentraciones de DOX de 0.01 a 100 ng/ml. Ambos sistemas mostraron ser activos en las tres líneas celulares, observándose diferencias significativas en la expresión de los transgenes a partir de MOI 12 ( $P < 0,001$ ) en el sistema monovectorial y 36 (CHO-K1:  $P < 0,05$ ; C2C12:  $P < 0,001$ ) o 100 (B92:  $P < 0,01$ ) en el bivectorial. La exposición a bajas concentraciones de DOX (0.1 ng/ml) fue suficiente para inhibir la expresión de GFP en ambos sistemas, la cual se determinó por microscopía y fluorimetría. La timulina bioactiva fue medida por un bioensayo de rosetas. El sistema monovectorial resultó ser más eficiente en las células estudiadas. El uso del gen de la GFP servirá para comprobar sencilla y rápidamente la expresión del gen de la timulina.

#### 451. (423) LA ACTIVIDAD DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISO-TESTICULAR REGULA LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS HIPOFISARIAS INVOLUCRADAS EN LA N-GLICOSILACIÓN.

Ambao V.<sup>1</sup>; Nairn A.<sup>2</sup>; Rulli S.<sup>3</sup>; Moremen K.<sup>4</sup>; Loreti N.<sup>5</sup>; Calandra R.<sup>6</sup>; Campo S.<sup>7</sup>  
*CEDIE/CONICET, Hospital de Niños Dr R. Gutiérrez<sup>1 5 7</sup>;*  
*Complex Carbohydrate Research Center and Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Georgia, Athens, USA<sup>2 4</sup>;*  
*IBYME/CONICET<sup>3 6</sup>*  
*vambao@cedie.org.ar*

Hemos demostrado que cambios en la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-testicular (H-H-T) modifican la estructura de los oligosacáridos presentes en la FSH hipofisaria. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la expresión génica de las enzimas que determinan el grado de complejidad de los oligosacáridos de glicoproteínas hipofisarias en distintas etapas del desarrollo sexual y en ratas macho adultas luego de la castración. Se utilizaron ratas de 10, 15, 25, 45 y 60 días de edad. Animales adultos fueron divididos en 5 grupos: control (C); castrado (Cx); Cx + andrógenos (Cx+And), Cx + antagonista de GnRH (Cx+antGnRH) y combinación de ambos (Cx+And+antGnRH). Se analizó en hipofisis la expresión génica de: Manosidasa II (ManII); N-Acetilglucosaminiltransferasa I (Mgat1), II (Mgat2) y IV (Magat4a);  $\beta$ -galactosiltransferasa polipéptido 1 ( $\beta$ -4gal1) y 3 ( $\beta$ -4gal13), y fucosiltransferasa 8 (Fut8) por RT-PCR en tiempo real. La expresión de ManII presentó una disminución progresiva con la edad a partir de los 25 días ( $p < 0,001$ ). La Cx indujo un aumento significativo en su expresión ( $p < 0,001$ ) la cual recuperó su valor C luego de los tratamientos. La expresión de las glicosiltransferasas Mgat1, Mgat2, Mgat4,  $\beta$ -4gal1,  $\beta$ -4gal13 y Fut8,

si bien presentó una disminución en los animales adultos con respecto a los de menor edad ( $p < 0.05$ ), no se alteró significativamente con la Cx ni luego de los tratamientos. En conclusión, estos resultados sugieren que en la rata macho, las variaciones en la actividad del eje H-H-T modulan en forma diferencial la expresión génica de las enzimas hipofisarias involucradas en la N-glicosilación. Los cambios en el entorno hormonal en la rata macho durante el desarrollo sexual y en ausencia de gonada en la edad adulta, afectarían marcadamente el inicio de la síntesis de los oligosacáridos con estructuras complejas regulado por ManII; otras glicosiltransferasas estudiadas permanecerían sin cambios cuando se alcanza la edad adulta.

**452. (465) IDENTIFICACIÓN DE UNA MUTACIÓN NUEVA EN EL GEN MEN1, S555I, EN UNA PACIENTE CON NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLE TIPO 1.**

Viale M.<sup>1</sup>; Díaz A.<sup>2</sup>; Serra M.<sup>3</sup>; Fernandez Gianotti T.<sup>4</sup>; Kozak A.<sup>5</sup>; Balzaretto M.<sup>6</sup>; Bruno O.<sup>7</sup>; Fainstein Day P.<sup>8</sup>  
Hospital Italiano Buenos Aires<sup>1 3 4 5 6 8</sup>; Hospital de Clínicas José de San Martín<sup>2 7</sup>  
maria.viale@hospitalitaliano.org.ar

La neoplasia endócrina múltiple tipo 1 (NEM1) es un síndrome de herencia autosómica dominante caracterizado por presentar al menos 2 de los 3 principales tumores endócrinos: hiperplasia paratiroidea, tumor entero-pancreático y adenoma hipofisario. El gen asociado está localizado en el cromosoma 11q13 y codifica para una proteína nuclear, menina, inhibidora de la proliferación celular. El diagnóstico genético está indicado en los casos índice y sus familiares directos. En portadores de mutaciones se deben realizar estudios bioquímicos y de imágenes periódicos. Objetivo: Investigar una nueva mutación en el gen MEN1 y demostrar su carácter patogénico. Métodos: Paciente de sexo femenino, 30 años, que presenta HPT, gastrinoma e insulinoma. Se secuenció la región codificante del gen MEN1 a partir de ADN genómico de leucocitos de sangre periférica. La mutación encontrada se estudió en sus hijos (M 7 años; F 12 años) y una media hermana. Se verificó que esta mutación no fuera un polimorfismo por la secuenciación de 104 alelos de una población control normal. Se realizó un alineamiento múltiple de la secuencia de la proteína para observar la conservación del sitio de mutación mediante ClustalW2 EMBL-EBI. Resultados: Se encontró una nueva mutación germinal heterocigota en el exón 10 del gen MEN1, S555I. Los familiares estudiados no presentaron la mutación. Esta mutación no se encontró en la población control normal. El alineamiento múltiple de la proteína, mostró la conservación de este aminoácido en varias especies. Conclusión: Esta variación en la secuencia de la menina es patogénica. El cambio de un aa hidrofílico(S) por uno hidrofóbico(I) en la menina podría alterar el plegamiento de la proteína modificando los dominios de señalización nuclear localizados en el extremo C-terminal. Se sugiere realizar controles clínicos, bioquímicos e imágenes cada 6 a 12 meses por el posible desarrollo de tumores asociados a la NEM1. Los familiares no necesitarán ningún tipo de control.

**453. (484) ROL DEL TGFβ SOBRE EL METABOLISMO DE LOS ROS EN TIROIDES NORMALES Y PATOLÓGICAS.**

Oglio R.<sup>1</sup>; Thomasz L.<sup>2</sup>; Rossini A.<sup>3</sup>; D'addino J.<sup>4</sup>; Juvenal G.<sup>5</sup>; Pisarev M.<sup>6</sup>  
Comisión Nacional de Energía Atómica<sup>1 2 3 5 6</sup>; Servicio de Cirugía, Hospital B.A. Houssay, V. López<sup>4</sup>; Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>6</sup>  
oglio@cnea.gov.ar

El factor de crecimiento transformante (TGFβ) aumenta las especies reactivas del oxígeno (ROS) en varios tejidos. Previamente hemos demostrado que TGFβ eleva los niveles de ROS en células WRO (carcinoma tiroideas), disminuye la viabilidad celular y el que el tratamiento con Selenio revierte este efecto. En vista del rol que cumple el sistema redox en la glándula tiroidea y del papel del Selenio en su patología, el objetivo del trabajo es estudiar los efectos del TGFβ sobre el metabolismo de los ROS en cultivos primarios de tiroides humanas y en las líneas FRTL-5 (normal) y WRO. Para el estudio, los cultivos primarios de Bocio

Multinodular (BMN), Bocio Nodular (BN), Bocio Hipertiroides (BH), Graves (G) y Carcinoma Papilar (CP) fueron obtenidos con el aval del Comité de Ética del Hospital Houssay. Luego de tratar 24h con TGFβ (5ng/mL) se detectó un incremento en los niveles de ROS (sonda DCFH-DA) de: 2,8 veces en FRTL-5 ( $p < 0.001$ ); 1,5 en BMN y BN ( $p < 0.05$ ); 1,1 para BH, G y CP ( $p < 0.05$ ). Luego de 48h de tratamiento se observó la disminución en la viabilidad celular (MTT) en FRTL-5 (35%;  $p < 0.001$ ) y en BMN, BN, BH y CP (18%;  $p < 0.01$ ). El tratamiento con Selenio (0,01 uM) solo modificó el efecto de TGFβ sobre la viabilidad celular en BMN y BH (50%;  $p < 0.05$ ). La actividad de Caspasa3 no arrojó resultados significativos con la dosis estudiada. Al analizar la actividad de catalasa (48h) se observó una disminución en FRTL-5 y WRO (40%;  $p < 0.01$ ) mientras que aumentó en BH (33%;  $p < 0.01$ ) y en CP (28%;  $p < 0.01$ ). No se detectaron cambios en los demás cultivos. En cuanto a la actividad de GPx (48h) se observó un incremento en la actividad en BMN (80%;  $p < 0.01$ ), BH (50%,  $p < 0.01$ ) y G (30%,  $p < 0.01$ ) mientras que en FRTL-5 no se detectó actividad basal. La disminución de la viabilidad celular inducida por TGFβ estaría correlacionada con el aumento en los niveles de ROS.

**454. (566) EFECTO COOPERATIVO DEL 17β-ESTRADIOL Y FGF-2 SOBRE LA PROLIFERACION DE CÉLULAS LACTOTROPAS INICIADO POR LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES DE MEMBRANA**

Sosa L.<sup>1</sup>; Gutierrez S.<sup>2</sup>; Petiti J.<sup>3</sup>; Vaca A.<sup>4</sup>; De Paul A.<sup>5</sup>; Torres A.<sup>6</sup>  
Centro de Microscopía Electrónica, Fac de Ciencias Médicas, UNC<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
ldvsosa@gmail.com

En estudios previos demostramos que 17β-estradiol (E2) a través de receptores estrogénicos asociados a la membrana plasmática (RE m) modula la actividad metabólica de células lactotropas. Considerando que este tipo celular posee una alta tasa de recambio en la adenohipófisis, nuestro objetivo fue analizar la participación de los RE m sobre la proliferación de lactotropas en respuesta a E2 y FGF-2 analizando la vía de señalización involucrada. Para evaluar acciones iniciadas en la membrana que desencadenan efectos genómicos, cultivos primarios adenohipofisarios de rata Wistar hembra fueron tratados con: E2 (10nM); E2-BSA (forma impermeable a membrana, 10nM); solos o combinados con FGF2 (0,6nM) por 30min, cuantificando la proliferación de lactotropas por incorporación de BrdU y posterior inmunodetección de PRL y BrdU. La translocación subcelular de PKCα y ε en lactotropas fue visualizada por microscopía confocal y la expresión de Akt y ERK1/2 total y fosforilada en extractos totales de células adenohipofisarias fue determinada por WB. Se realizó análisis estadístico: ANOVA-Tukey. El tratamiento con E2, E2-BSA o FGF-2 no incrementó el número de lactotropas, mientras que la combinación de E2/FGF-2 o E2-BSA/FGF-2 aumentó significativamente la proliferación de estas células. La distribución subcelular de PKC α y la expresión de Akt fosforilada no mostró variaciones en ninguno de los tratamientos aplicados. Sin embargo, la co-incubación con E2 o E2-BSA con FGF-2 indujo translocación de PKC ε a la membrana plasmática de lactotropas con un aumento significativo de la fosforilación de ERK1/2 comparado con sus controles. Estos resultados revelan una acción cooperativa del E2 y FGF-2 sobre la proliferación de lactotropas inducida por señales iniciadas en la membrana plasmática con la activación de la vía PKC ε/ERK1/2. Este efecto regulatorio del E2 en interacción con FGF-2 estaría involucrado en la homeostasis celular de la adenohipófisis en respuesta a factores de crecimiento.

**455. (547) PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR NOTCH3 EN LOS TUMORES HIPOFISARIOS EXPERIMENTALES DE RATAS TRATADAS CON ESTRÓGENOS**

Baricalla A.<sup>1</sup>; Demarchi G.<sup>2</sup>; Recouvreux V.<sup>3</sup>; Díaz-torga G.<sup>4</sup>; Becú-villalobos D.<sup>5</sup>; Cristina C.<sup>6</sup>  
Laboratorio de Fisiopatología de la Hipófisis, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires<sup>1 2 6</sup>; IBYME-CONICET<sup>3 4 5</sup>  
agustinbaricalla@yahoo.com.ar

La vía de señalización de los receptores Notch regula diversos procesos durante el desarrollo de células eucariotas como proliferación, migración, diferenciación y apoptosis. Notch se encuentra involucrado en la autorrenovación de células madre determinando el destino celular. En mamíferos la familia de Notch se compone de 4 miembros: Notch1-4, proteínas de un paso transmembrana con un dominio extracelular, uno transmembrana y uno intracelular (NICD). Cuando se activa la vía por ligando, el NICD transloca al núcleo y activa factores de transcripción que llevan a la expresión de genes blanco. No se ha esclarecido el rol de Notch en los tumores pero existen reportes que lo establecen como oncogen debido a su función en el mantenimiento de células madre y regulación del destino celular. En el presente trabajo estudiamos la expresión de Notch en el modelo de prolactinoma generado por tratamiento crónico con estrógenos. Se generaron prolactinomas implantando un pellet subcutáneo de 20mg del estrógeno sintético dietilstilbestrol (DES) en ratas hembra Sprague Dawley durante 4 semanas y se utilizaron hembras en diestro como control. Los niveles de expresión de Notch3 determinados por western blot en homogenatos de hipófisis con un anticuerpo específico para el NICD, resultaron significativamente mayores en ratas DES ( $P < 0,05$  DES vs. controles  $N= 8$  y  $9$  respectivamente). Por inmunohistoquímica determinamos una localización de Notch3 predominante en membrana pero también citoplasmática difusa en ambos grupos, con un mayor nivel de expresión en las hipófisis de ratas DES, si bien las diferencias no resultaron estadísticamente significativas al expresarlo como número de células positivas sobre células totales ( $N=3$  y  $2$  para DES y controles). Nuestros resultados describen por primera vez un incremento de Notch3, marcador de células progenitoras, en los prolactinomas inducidos por estrógenos en rata, lo que indicaría la participación de esta vía en el desarrollo de los mismos.

## NEUROCIENCIAS 5

### 456. (31) ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DIFERENCIAL CAUSADA POR PÉPTIDOS AMILOIDES ASOCIADOS A DEMENCIAS HUMANAS EN DROSOPHILA MELANOGASTER.

Marcora M.<sup>1</sup>; Avendaño Vazquez L.<sup>2</sup>; Ceriani M.<sup>3</sup>; Castaño E.<sup>4</sup>  
Fundación Instituto Leloir; IIBBA-CONICET<sup>1,2,3,4</sup>  
mmarcora@leloir.org.ar

Un grupo creciente de enfermedades neurodegenerativas está asociado a la acumulación de péptidos amiloides en el cerebro adulto. En la enfermedad de Alzheimer se encuentran depósitos del péptido A $\beta$  y en las demencias de tipo Británico y Danés se acumulan los péptidos ABri y ADan, respectivamente. Estos se generan por mutaciones en el gen BRI, cuya forma salvaje produce un péptido no tóxico, p23. Trabajos previos indican que A $\beta$  causa neurodegeneración en el cerebro de *Drosophila melanogaster* (Dm). Con el objetivo de comparar las toxicidades causadas por A $\beta$ , ABri y ADan, se generaron líneas transgénicas de Dm mediante la inserción sitio-dirigida del transgén. Para su expresión tejido-específica usamos el sistema UAS-Gal4. Se clonaron en el vector pUAST atb las secuencias de A $\beta$ , ABri, ADan y p23 río abajo de la secuencia de secreción del gen necrotic de Dm para dirigir los péptidos a la vía secretoria. Su expresión en el ojo (GMR) y en el SNC (elav) mediada por drivers específicos se corroboró por inmunofluorescencia y Western blot. No se observó toxicidad en animales expresando 1 copia de cada transgén. Sin embargo, con 2-3 copias se evidenció toxicidad, desde el típico ojo rugoso (degeneración de omatidas, desaparición de quetas sensoriales, etc) en los ojos de moscas A $\beta$  (85% vs p23  $p<0,01$ ), hasta desarreglos en parches para ABri y ADan (30-40%). Estas observaciones se correspondieron con defectos en la estructura de la retina analizadas mediante cortes histológicos. Llamativamente, en las líneas ABri y ADan, la toxicidad fue mayor con 2 copias que con 3. Nuestros resultados indican una mayor toxicidad por parte de A $\beta$ , mientras que la sobre-expresión alta de ABri y ADan podría estar favoreciendo una mayor agregación a expensas de formas solubles más tóxicas. Este modelo permitirá estudiar y comparar

los mecanismos subyacentes a las toxicidades diferenciales y realizar un "screen" de genes que modulen la vulnerabilidad neuronal a los distintos péptidos.

### 457. (46) PROGESTERONA PREVIENE LA ALODINIA Y REDUCE LA ACTIVACIÓN GLIAL Y LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS PROINFLAMATORIAS EN ANIMALES CON DOLOR NEUROPÁTICO

Coronel M.<sup>1</sup>; Labombarda F.<sup>2</sup>; De Nicola A.<sup>3</sup>; González S.<sup>4</sup>  
IBYME - CONICET<sup>1</sup>; IBYME - CONICET; Facultad de Medicina - UBA<sup>2,3,4</sup>

fcoronel@cas.austral.edu.ar

Las lesiones de la médula espinal producen dolor neuropático refractario a los tratamientos disponibles. La progesterona (PG), esteroide neuroactivo, resultaría promisorio como estrategia terapéutica. Dado que la activación glial y la producción de factores proinflamatorios son clave en los mecanismos del dolor crónico, evaluamos el efecto de PG sobre la conducta nociceptiva, la activación glial y la expresión de dos enzimas proinflamatorias, la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2), en la médula dorsal de animales con injuria espinal. Se emplearon ratas macho controles (C  $n=8$ ) o con hemisección espinal, inyectadas diariamente con PG (16 mg/kg sc; HX+PG  $n=12$ ) o vehículo (HX  $n=10$ ) durante 28 días. La conducta nociceptiva se evaluó periódicamente utilizando los tests de von Frey y Choi. Los animales fueron sacrificados en el período agudo (día 1) o crónico (día 28). Los ARNm de iNOS y COX-2 se determinaron por PCR en tiempo real. La activación glial se evaluó cuantificando el número de células inmunoreactivas para marcadores astrocitarios (GFAP) y microgliales (OX42). En las médulas lesionadas se detectó un incremento del ARNm de ambas enzimas en el período agudo ( $p<0.001$  vs C), coincidiendo con niveles elevados de nitritos y nitratos (NOx), productos de oxidación de NO e indicativos de la actividad de iNOS ( $p<0.001$  vs C), así como un aumento en el número de células GFAP y OX42 positivas ( $p<0.001$  vs C). En los animales tratados con PG se previno el incremento de los ARNm de ambas enzimas ( $p<0.001$  vs HX,  $p>0.05$  vs C), con una disminución significativa de NOx ( $p<0.01$  vs HX) y del número de células GFAP y OX42 positivas ( $p<0.01$  vs HX). En concordancia, PG previno el desarrollo de alodinia mecánica y térmica ( $p<0.01$  vs HX,  $p>0.05$  vs C). Mediante la modulación aguda de la activación glial y la disminución de la expresión de enzimas proinflamatorias, PG podría constituir una opción eficaz para prevenir el dolor neuropático (UBACYT 200126).

### 458. (49) PARÁMETROS COGNITIVOS LATERALIZADOS EN RATAS PREPUBERALES EXPUESTAS A DOSIS SUBTÓXICAS DE ZNTE.

Alvarez Toro E.<sup>1</sup>; Ratti S.<sup>2</sup>; Gaglio E.<sup>3</sup>

Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCUYO<sup>1,2,3</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. Trabajos previos de nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento con ZnTe en una dosis baja modificó la exploración motivada y ciertas conductas sociales en ratas prepuberales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si los elementos traza en las mismas condiciones además afectan otras conductas relacionadas con la cognición en la rata. Para ello, se trabajó con crías provenientes de parejas expuestas a 0.03, 0.3 y 3  $\mu\text{g/L}$  de ZnTe disueltos en el agua de beber. Ratas que ingieren agua corriente se consideraron control. Se dispuso de 4 grupos: [1] Control ( $n=20$ ); [2] 0.03  $\mu\text{g/L}$  de ZnTe ( $n=12$ ); [3] 0.3  $\mu\text{g/L}$  de ZnTe ( $n=11$ ) y [4] 3  $\mu\text{g/L}$  de ZnTe ( $n=10$ ). Todos los animales fueron expuestos al tratamiento desde su nacimiento hasta el día 30, donde se testaron en el Laberinto Doble Hole-Board Lateral que mide exploración preferencial izquierda/derecha.

Los resultados mostraron que las ratas controles invierten más tiempo explorando el lado izquierdo del pasillo que el derecho ( $61.5 \pm 6.2$  Cuentas/3 min, lado izquierdo Versus  $40.5 \pm 4.3$  Cuentas/3 min, lado derecho,  $p < 0.05$ ). El tratamiento con ZnTe en todas las dosis, anuló esta exploración diferencial ( $38.5 \pm 4.6$  Cuentas/3 min, lado izquierdo Versus  $33 \pm 7$  Cuentas/3 min, lado derecho, grupo  $0.3 \mu\text{g/L}$  de ZnTe). Igualmente, la proporción de animales que exploran más el lado izquierdo que el derecho (75% en los controles) también fue afectada por este tratamiento disminuyendo la proporción a  $33.3 - 50 \%$  (n.s.). Los resultados encontrados apoyan la idea que los elementos traza afectan conductas lateralizadas sin mostrar una relación aparente dosis-efecto.

**459. (58) VARIACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A ELEMENTOS TRAZA EN RATAS ADULTAS EN SU DESCENDENCIA HASTA LA ETAPA PREPUBERAL.**

Alvarez Toro E.<sup>1</sup>; Ratti S.<sup>2</sup>; Gaglio E.<sup>3</sup>;

Laboratorio de Neuropsicofarmacología Experimental, Área de Farmacología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCUIYO<sup>1,2,3</sup>

ealvarez@fcm.uncu.edu.ar

Los "elementos trazas" han llamado la atención en biología molecular y neurofarmacología por intervenir en sistemas enzimáticos y regulación de la expresión génica en la célula. Nuestro laboratorio encontró que el tratamiento con  $0.3 \mu\text{g/L}$  de ZnTe durante la preñez, lactancia y período prepupal en las crías modificó varios parámetros conductuales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar si una exposición previa de los padres al ZnTe hasta la concepción es tiempo suficiente para inducir cambios en las crías, como se encontró en experimentos anteriores. Se utilizaron parejas expuestas a  $0.3 \mu\text{g/L}$  de ZnTe disueltos en el agua de beber durante 10 días previos al apareamiento. Ratas que ingieren agua corriente se consideraron control. Se dispuso de 3 grupos: [1] Control ( $n=22$ ), padres tratados con agua; [2]  $0.3 \mu\text{g/L}$  de ZnTe ( $n=10$ ), padres tratados con ZnTe 10 días antes del apareamiento y con agua después de la concepción; [3]  $0.3 \mu\text{g/L}$  de ZnTe ( $n = 11$ ), tratados continuamente con ZnTe durante la preñez, lactancia y etapa prepupal. Todas las crías en el día 30, fueron testeadas en un aparato de detección automática de actividad motora y 24 h después en el Laberinto Doble Hole-Board Lateral (LDHB) que mide exploración preferencial izquierda/derecha. Los resultados mostraron que tanto en el grupo [2] como en el [3] aumentaron significativamente las conductas no exploratorias ( $770.4 \pm 60.9$  Cuentas/5 min;  $686.9 \pm 55$  Cuentas/5 min versus  $458.9 \pm 22$ ,  $p < 0.05$ ; Grupo [2] y Grupo [3] versus Control). En el LDHB, igualmente en los grupos [2] y [3] la exploración lateralizada del laberinto fue anulada, comparada con el control ( $40 \pm 6.5$  Cuentas/3 min, Izquierda y  $43 \pm 10$  Cuentas/3 min, Derecha, n.s.;  $61.5 \pm 6.2$  Cuentas/3 min, Izquierda y  $40.5 \pm 4.3$  Cuentas/3 min, Derecha,  $p < 0.05$ ; Grupo [2] versus Control). Los resultados apoyan la hipótesis que la exposición de los padres al ZnTe en un período crítico es suficiente para inducir cambios comportamentales en las crías.

**460. (62) LA PROGESTERONA PREVIENE ANORMALIDADES DEL HIPOCAMPO EN EL RATÓN MUTANTE WOBBLER (WR)**

Meyer M.<sup>1</sup>; González Deniselle M.<sup>2</sup>; Gargiulo G.<sup>3</sup>; Garay L.<sup>4</sup>; Lima A.<sup>5</sup>; Roig P.<sup>6</sup>; De Nicola A.<sup>7</sup>

IBYME-CONICET<sup>1,3,5,6</sup>; IBYME-CONICET, Facultad de Medicina-UBA<sup>2,4,7</sup>

mariameyer1981@gmail.com

Recientemente se demostró la participación del hipocampo (HC) en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) humana y en sus modelos animales: ratón Wr y transgénico SOD1. Así, la ELA se considera una enfermedad degenerativa sistémica y no focalizada a las motoneuronas del sistema nervioso central. En este trabajo estudiamos el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP) en HC de Wr, parámetros regulados por progesterona (PROG) en

médula espinal. Se emplearon Wr, genotipificados de 5-8 meses en período sintomático y, Wr+PROG, con un tratamiento realizado por un pellet s.c. de  $20 \text{ mg} \times 15$  días. El ARNm se estudió por hibridación in situ isotópica y cuantificó por autorradiografía cuantitativa. Los resultados demostraron disminución del % DO en Wr en la región piramidal CA3 ( $p < 0.001$ ) y giro dentado (GD) ( $p < 0.01$ ) vs controles (Ctl), con aumento significativo en ambas regiones en Wr PROG (CA3:  $p < 0.001$  y GD:  $p < 0.01$ ). La densidad de astrocitos GFAP+ se determinó en el stratum radiatum (SR) subyacente a las regiones CA1, CA2 y CA3. Comprobamos intensa astrogliosis GFAP+ por inmunofluorescencia en Wr no tratados en las 3 regiones ( $p < 0.001$ ) vs Ctl, parámetro disminuido significativamente por PROG (CA1, CA2:  $p < 0.001$  y CA3:  $p < 0.01$ ). Mediante inmunomarcación con NeuN+ e inmunofluorescencia doble: NeuN/Gaba estudiamos las interneuronas del SR y stratum lacunosum-moleculare. Se observó anormal hiperdensidad y redistribución hacia SR de células NeuN+ en Wr (Wr vs Ctl:  $p < 0.001$ ), proceso revertido por PROG ( $p < 0.05$ ). De estas células, un bajo % fueron GABA+ en Wr, sugiriendo reducción del sistema gabaérgico inhibitorio en Wr no tratados. Sin embargo, PROG lo aumentó en Wr. Conclusión: La baja en GABA podría relacionarse a la hiperactividad del eje hipotálamo hipófisis adrenal en Wr. PROG no sólo moduló interneuronas hipocámpicas, sino también tuvo efectos protectores sobre BDNF y astrogliosis similar a su acción sobre médula espinal.

**461. (64) LAS RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS DESARROLLAN ATROFIA NEURONAL DEL HIPOCAMPO: ESTUDIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE GOLGI**

Brocca M.<sup>1</sup>; Pietranera L.<sup>2</sup>; Beauquis J.<sup>3</sup>; Labombarda F.<sup>4</sup>; Roig P.<sup>5</sup>; De Nicola A.<sup>6</sup>

IBYME<sup>1,5</sup>; IBYME, Dpto Bioquímica Humana, Fac Med, UBA<sup>2,4,6</sup>; IBYME, Dpto Química Biológica FCEN, UBA<sup>3</sup> mebrocca@gmail.com

La hipertensión arterial se asocia a una importante encefalopatía que afecta al hipocampo. Un modelo de elección es la rata espontáneamente hipertensa (SHR), cuya encefalopatía cursa con atrofia cerebral y del hipocampo, hidrocefalia y pérdida de sustancia blanca, disminución de la génesis de nuevas neuronas y pérdida neuronal en el hilio del giro dentado y astrogliosis. En el presente trabajo empleamos ratas macho SHR y sus controles Wistar Kyoto (WKY) de 16 semanas (PA:  $174.9 \pm 3.4$  y de  $108.0 \pm 3.6$  mmHg, respectivamente). En cortes de cerebro, procesados según la técnica de impregnación argéntica de Golgi y posterior análisis de Sholl, estudiamos la morfología de las neuronas piramidales de la región CA1 y determinamos: 1) la longitud total, apical y basal del árbol dendrítico; 2) la densidad de espinas dendríticas totales, apicales y basales. Los resultados demostraron: menor longitud del árbol dendrítico total en SHR ( $708.0 \pm 55.5 \mu\text{m}$ ) vs WKY ( $923.2 \pm 31.4 \mu\text{m}$ ;  $p < 0.01$ ) a todas las distancias del soma neuronal (20-100, 100-200 y 200-300  $\mu\text{m}$ ); menor longitud de dendritas apicales en SHR vs WKY ( $p < 0.01$ ); menor longitud de dendritas basales en SHR vs WKY ( $p < 0.05$ ) en la región de 20-100  $\mu\text{m}$ . La densidad de espinas dendríticas totales y apicales fue menor en SHR que en WKY ( $p < 0.01$ ). Datos anteriores del laboratorio apoyaban que el cerebro de SHR se asemejaba en términos neuroquímicos al cerebro del envejecimiento. El concepto actual considera que en animales envejecidos la pérdida neuronal irreversible por apoptosis no tiene la magnitud anteriormente otorgada, y que prevalentemente ocurre atrofia neuronal con retracción de procesos neuríticos, menor número de espinas dendríticas e hipofunción neuronal. Los parámetros estudiados en el hipocampo de SHR reflejan que la atrofia neuronal se produce precozmente (16 semanas de vida), sugiriendo que la hipertensión no controlada adelanta considerablemente el envejecimiento del encéfalo.

**462. (93) RELACIONES FUNCIONALES ENTRE BRACHYURY Y HAIRY2 EN EL DESARROLLO DEL EJE DORSO-VENTRAL DE XENOPUS LAEVIS**

Aguirre C.<sup>1</sup>; Murgan S.<sup>2</sup>; Carrasco A.<sup>3</sup>; López S.<sup>4</sup>

Laboratorio de Embriología Molecular, Instituto de Biología

*Celular y Neurociencias Prof. E. De Robertis, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
cecie\_aguirre@hotmail.com*

Hairy2 es un represor transcripcional de la familia HES, es un efector de Notch y está involucrado en el establecimiento de límites en tejidos neurales. La sobreexpresión de hairy2 reprime la expresión de marcadores de la línea media dorsal (DML) como chordin y foxA4a y promueve su expresión ectópica en la zona marginal ventrolateral (VLMZ). Sin embargo, reprime la expresión del marcador panmesodérmico brachyury (bra) en todas las localizaciones. El bloqueo de hairy2 produce un aumento en los niveles de transcritos de bra. Bra es un activador transcripcional de la familia T-box que activa a genes específicos del mesodermo y promueve su movimiento de convergencia y extensión. Para investigar las relaciones funcionales existentes entre bra y hairy2 en el desarrollo del eje dorso-ventral, realizamos experimentos de ganancia o pérdida de función y análisis morfológicos y de marcadores moleculares por medio de hibridación in situ (ISH). Nuestros resultados indican que la sobreexpresión dorsal de bra reprime a hairy2. En cambio, la interferencia de su función por medio de la inyección de ARNm de bra-EnR (una construcción que transforma a Brachyury en un represor activo) expande el dominio de hairy2 vegetalmente en regiones correspondientes a la VLMZ. Notablemente, al igual que la sobreexpresión de hairy2, bra-EnR promueve la expresión ectópica de marcadores de DML en esta región. Esto resulta en la formación de ejes secundarios que poseen tubo neural (sox2; nrp1) con cerebro medio y posterior (en2; krox20) pero que carecen de cerebro anterior (no expresan otx2). En conjunto, nuestros datos indican que hairy2 y bra estarían involucrados en un mecanismo regulatorio de represión mutua. La expresión de bra en la VLMZ es necesaria para impedir la expansión de hairy2 vegetalmente, inhibiendo la aparición de ejes secundarios. Este control a nivel cigótico a cargo de bra asegura el desarrollo normal del embrión.

**463. (107) LA GALECTINA 3 DISMINUYE LA DESMIELINIZACIÓN DEL SNC INDUCIDA POR CUPRIZONA.**

Hoyos H.<sup>1</sup>; Pasquini L.<sup>2</sup>; Rabinovich G.<sup>3</sup>; Pasquini J.<sup>4</sup>  
Cát. de Qca Biol. Patol., FFyB-UBA IQUIFIB-CONICET<sup>1 2 4</sup> ; FCEN-UBA IBYME-CONICET<sup>3</sup>  
hchoyos@ffyb.uba.ar

La Galectina 3 se encuentra ampliamente distribuida en diferentes células y tejidos. Hemos demostrado que la galectina-3 regula la diferenciación de los oligodendrocitos (OLG). El tratamiento con galectina-3 recombinante promueve la maduración de los OLG evidenciado por un aumento del número de células MBP+ y una disminución en las células A2B5+. En concordancia, medios de cultivo condicionados a partir de microglía que secreta galectina-3, promueven con éxito la diferenciación oligodendroglial. La microglía aislada de un ratón KO (Lgals3<sup>-/-</sup>) no tiene dicho efecto. La Cuprizona (CPZ) induce una desmielinización reproducible en cerebro del ratón. El alcance de la desmielinización inducida por CPZ se caracteriza por la pérdida de OLGs, la degeneración de la vaina de mielina y el reclutamiento de astrocitos y microglía en el área lesionada. Hipotetizamos que la Galectina-3 protege contra el daño generado por la desmielinización inducida por CPZ. Los ratones Lgals3<sup>-/-</sup> tratados con CPZ, a partir de la 8va semana de vida, mostraron una disminución de la mielinización evaluada por la inmunotinción para MBP en el cuerpo estriado (St), cuerpo calloso (CC), el cíngulo (CG) y la corteza cerebral (CX), acompañado de un aumento en la activación de astrogliosis en el CC y una respuesta de activación microglial en el CC y el CG. A las 5 semanas de tratamiento de CPZ, se da el punto máximo de injuria, a este tiempo ratones Lgals3<sup>-/-</sup> muestran un 55% de sus tractos mielinizados vs el 75% de los ratones control (p<0.01). Para el caso de la respuesta astrogliosis, los ratones Lgals3<sup>-/-</sup> superan en un 152% a sus controles (p<0.01). Nuestros resultados indican que la galectina-3 participa protegiendo a las células OLGs contra la desmielinización inducida por la CPZ, ya que la severidad del daño observado en los ratones Lgals3<sup>-/-</sup> es superior que sus respectivos controles.

**464. (145) EL ACETATO DE GLATIRAMER PROMUEVE LA OLIGODENDROGÉNESIS Y LA REMIELINIZACIÓN EN UN MODELO DE DESMIELINIZACIÓN INDUCIDO POR CUPRIZONA.**

Badaracco M.<sup>1</sup>; Rosato Siri M.<sup>2</sup>; Pasquini J.<sup>3</sup>  
Cátedra de Química Biológica Patológica, FFyB, UBA,  
IQUIFIB CONICET<sup>1 2 3</sup>  
mebadaracco@yahoo.com.ar

La desmielinización inducida por cuprizona (CPZ) produce apoptosis de los oligodendrocitos (OLG) maduros con una participación de la respuesta inflamatoria autoinmune. El acetato de glatiramer (GA), un polímetro de aminoácidos sintéticos, ha demostrado ser efectivo en suprimir la Encefalomiélitis Autoinmune Experimental, un modelo de esclerosis múltiple. Los estudios sobre el mecanismo de acción del GA se han centrado sobre sus efectos inmunomoduladores sobre los linfocitos T y células presentadoras de antígeno. Nuestro objetivo es estudiar el efecto directo del GA sobre la microglía y sobre la proliferación/diferenciación de células oligodendrogliales. Se alimentaron ratas Wistar con una dieta control y se inyectaron en forma intraperitoneal (ip) diariamente con solución salina (C) o con 0.5mg/ml de GA (C-GA) desde P21 a P35. Otro grupo fue alimentado con una dieta que contiene 0.6% de CPZ durante dos semanas desde P21 hasta P35. Los animales intoxicados con CPZ fueron también diariamente inyectados ip con solución salina (CPZ) o previo y concomitantemente con la CPZ con GA: (CPZ-GAp y CPZ-GAc, respectivamente). La desmielinización y el efecto del GA fue ensayado por técnicas de tinción de mielina, estudios inmunohistoquímicos, Microscopia Electrónica (ME) y WB. Nuestros resultados demuestran que los animales CPZ que fueron inyectados con GA presentan un aumento de células PDGFR $\alpha$ + así como también de CC1. Las imágenes de ME muestran una disminución del daño axonal y aumento de la mielinización. Por otro lado cultivos primarios de microglía fueron tratados con GA y estudiados por inmunocitoquímica con CD11b y ED1 así como también la secreción de citoquinas por dichas células. Demostramos in vitro, que células microgliales, en presencia de GA, proliferan y secretan IL-10 e IL-4 que contribuyen a la diferenciación/maduración de los OLG quienes participan activamente en la reparación de la mielina.

**465. (160) ANÁLISIS NO LINEAL DE LA VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDÍACA EN SUJETOS CON PARÁLISIS CEREBRAL**

Castro M.<sup>1</sup>; Maxit C.<sup>2</sup>; Pozzo A.<sup>3</sup>; Agosta G.<sup>4</sup>; Guinjoan S.<sup>5</sup>; Cardinali D.<sup>6</sup>; Vigo D.<sup>7</sup>  
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, CONICET, FLENI<sup>1</sup>; AEDIN<sup>2 3 4</sup>; Departamento de Salud Mental, Facultad de Medicina y Departamento de Neurofisiología, Facultad de Psicología, UBA, CONICET, Sección de Neurología Cognitiva, FLENI<sup>6</sup>; Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, CONICET<sup>5 7</sup>  
mcastro@fmed.uba.ar

Introducción: La parálisis cerebral (PC) se asocia a alteraciones del sistema nervioso autónomo (SNA). La variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC) es una herramienta que permite evaluar la actividad del SNA. Indicadores que cuantifican entropía (SampEn) y fractalidad (alfa1) permiten describir las características no lineales de la VFC y no han sido evaluados en estos pacientes. Objetivo: caracterizar el perfil autonómico lineal y no lineal en pacientes con PC. Diseño del estudio: Se evaluaron 10 pacientes con PC y 10 controles, con edades entre 13 y 18 años. Se realizó un registro electrocardiográfico de dos horas en reposo durante la proyección de un film y se extrajeron muestras de 512 latidos a los 10, 30, 50 y 70 minutos, para el análisis lineal y no lineal de la VFC. Los datos obtenidos fueron ajustados a la frecuencia cardíaca (fc). Resultados: Los individuos con PC presentaron mayor fc (p<0.001), menor VFC de baja frecuencia (LF%, p<0.05), mayor VFC de alta frecuencia (HF%, p<0.05) y menor exponente de correlación fractal (alfa1, p<0.05). Conclusiones: El aumento de la fc en la PC podría vincularse a la hiperactividad simpática descrita en estos



pacientes. La disminución de alfa1 y LF% es similar a la observada en pacientes coronarios y aporta evidencia que puede contribuir a explicar la fisiopatología del riesgo cardíaco aumentado en PC.

- 466. (192) LA AUSENCIA DE LUZ FAVORECE LA RECUPERACIÓN DE LA RESACA ALCOHÓLICA EN EL RATÓN**  
Boncagni M.<sup>1</sup>; Karadayián A.<sup>2</sup>; Mac Laughlin M.<sup>3</sup>; Cutrera R.<sup>4</sup>  
*Laboratorio de Neurobiología y Ritmos, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4</sup>*  
celiu86@hotmail.com

La resaca alcohólica se define como el período que tiene lugar luego de una ingesta copiosa de alcohol, cuando éste desaparece de la circulación sanguínea (alcoholemia=0). El consumo agudo de etanol reduce la coordinación neuromuscular e induce un comportamiento de ansiedad en distintas especies, incluido el hombre. La luz es reconocida al presente como el principal sincronizador sobre el reloj endógeno (NSQ) a un periodo cercano a las 24 horas. Se sabe que una dosis aguda de alcohol es capaz de alterar el "turn-over" de varios neurotransmisores como el GABA y glutamato, implicados en los efectos fóticos sobre el reloj. Por el contrario, no se conoce si la luz modifica la coordinación motora y/o el nivel de ansiedad en presencia y ausencia de etanol en plasma. Por lo tanto, los objetivos fueron a) estudiar a lo largo del tiempo los posibles cambios en el comportamiento motor junto con la ansiedad en las etapas de alcoholización y resaca, b) evaluar el posible efecto del reloj en condiciones de oscuridad constante. Ratonos machos adultos de la cepa Swiss recibieron una inyección i.p. de etanol (3,8 g/kg) (n=20) o salina (grupo control, n=20). A su vez, se subdividieron en dos grupos: 12:12 L:O (encendido de la luz 7 AM) y oscuridad continua durante 5 días. Se evaluó la coordinación neuromuscular (Tightrope test) y el comportamiento símil-ansiedad (EPM test) en 8 horarios determinados, finalizando a las 26 hs post-inyección (p.i.). Los resultados obtenidos muestran que en L:O se observó un efecto deletéreo tanto del etanol como de la resaca en la coordinación neuromuscular y en los niveles símil-ansiedad hasta las 24 hs p.i. (P<0.05, ANOVA-Bonferroni). La recuperación se alcanzó recién a las 26 hs p.i. En cambio, en oscuridad continua la recuperación fue más rápida: 8 hs p.i. para tightrope test y 14 hs. p.i. para EPM. Se plantea la posible participación del reloj en la dinámica de la recuperación alcohólica.

- 467. (194) PAPEL ANTIOXIDANTE DEL ALFATOCOFEROL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE MIGRAÑA CRÓNICA**  
Signorini F.<sup>1</sup>; Bilbao J.<sup>2</sup>; Baez M.<sup>3</sup>; Tarán M.<sup>4</sup>; Becerra F.<sup>5</sup>; Buonanotte F.<sup>6</sup>; Blencio S.<sup>7</sup>; Moya M.<sup>8</sup>; Balceda A.<sup>9</sup>  
*Cátedra de Física Biomédica, FCM, UNC<sup>1 2 4 5 7</sup>; Cátedra de Física Biomédica, FCM, UNC, IICSHUM (UNLaR)<sup>3 8 9</sup>; Becaría SECYT<sup>4</sup>; Cátedra de Neurología, FCM, UNC; Hospital Nacional de Clínicas<sup>6</sup>*  
fransign@hotmail.com

En los últimos años algunos autores han destacado el papel de la inflamación vascular y el estrés oxidativo (EO) en la fisiopatología de la Migraña Crónica (CM), estudiando los posibles efectos beneficiosos de los tratamientos antioxidantes. Se analizó en un modelo experimental de migraña crónica, los efectos de Vitamina E (VE) sobre el componente epiinflamatorio y oxidativo, analizando el comportamiento del fibrinógeno plasmático (FP), óxido nítrico (NO) y L-Citrulina. La migraña se indujo mediante activación trigeminal (AT). Se utilizaron ratas cepa Wistar divididas en 3 grupos: control (I) (n=6); AT (II) (n=6) inducida con capsaicina 25 µl de solución 10 µM/día/rata durante 3 días en el interior de las articulaciones temporomandibulares y un grupo tratado con VE post AT (III) (n=6); en dosis de 150 UI/kg/día/oral por 45 días. FP, NO y L-Citrulina se cuantificaron por espectrofotometría, AT se comprobó mediante la medición de albúmina teñida con Azul de Evans en duramadre. Se analizó estadísticamente con MANOVA. En el grupo (II) se observó un aumento significativo de FP (300 mg/dL), NO (33 µM) y L-Citrulina (4,2 µM) con respecto al control (I) FP (175 mg/dl), NO (27 µM) y L-Citrulina

(3 µM) (p<0,001) en todos los casos). El tratamiento con VE (III) normalizó significativamente los valores de FP (200 mg/dl), NO (17 µM) y L-Citrulina (1,5 µM) con respecto al grupo (II) (p < 0,01). No se observó diferencia significativa entre el control y las ratas con AT + VE (III), mostrando que la administración de VE normaliza los marcadores de migraña inducida. Quizás los efectos protectores de la VE se deban a su capacidad de remover intermediarios oxidativos reduciendo así los niveles de los radicales libres protegiendo de esa manera el microambiente trigeminal, pudiendo ser empleada en la prevención y tratamiento de la migraña crónica.

- 468. (208) EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN MATERNA AL LPS DURANTE LA GESTACIÓN EN RATA. IMPLICANCIAS EN LA RESPUESTA FEBRIL DE LA DESCENDENCIA**  
Pecoraro F.<sup>1</sup>; Carreras M.<sup>2</sup>; Hudson T.<sup>3</sup>; de Tumilasci G.<sup>4</sup>; Cutrera R.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Neurobiología y Ritmos, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 5</sup>; Laboratorio de Glándulas Salivales, Depto de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA<sup>4</sup>*  
peco\_sparrer@hotmail.com

El estrés materno durante la gestación ha sido asociado a alteraciones en la descendencia, que pueden extenderse aún en la vida adulta. El lipopolisacárido bacteriano (LPS) induce un estado de estrés inflamatorio denominado síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS). Uno de los componentes característicos del SIRS es la fiebre. El objetivo de este trabajo fue estudiar la respuesta térmica de las crías frente a la exposición al LPS en la vida adulta. Ratas hembras SD de dos meses fueron mantenidas en un ciclo 12-12 L:O (Encendido 7 AM) y de 22 +/- 2 °C. El día 0 de preñez fue determinado por la presencia de tapón vaginal. El día 15, las preñadas fueron divididas en dos grupos al azar: el inyectado intraperitonealmente (i.p.) con 50µg/kg LPS y su control con un volumen equiparable de salina (SS). La progenie masculina fue implantada el día 90 de vida postnatal con un emisor i.p. (Mini-mitter Inc. MN, USA) que registró la temperatura corporal cada 5 min durante las 24 hs. Una semana después, los hijos fueron inyectados en tres días alternos sucesivos (1, 3 y 5) con 50µg/kg de LPS i.p. o salina, obteniéndose de esta manera cuatro grupos según el tratamiento pre- y postnatal (lps-lps, lps-ss, ss-lps, y ss-ss). Los resultados demuestran que los animales del grupo lps-lps alcanzaron temperaturas significativamente más elevadas durante la respuesta febril aguda (más evidentes durante las dos primeras horas post-inyección) en comparación con las del grupo ss-lps en diferentes intervalos de tiempo (ANOVA-Tukey p<0,05-p<0,001), respuesta que se atenuó tras las inyecciones sucesivas (ANOVA medidas repetidas - Bonferroni p<0,05). Por otra parte, la exposición materna al LPS no alteró la inducción de tolerancia al mismo en los adultos (ss-lps vs lps-lps). Los resultados sugieren que la exposición materna al LPS durante la gestación induciría una sensibilización de la respuesta febril en la progenie, que se prolonga hasta la vida adulta.

- 469. (213) EFECTO DE LA INOSINA SOBRE LOS RECEPTORES DE ADENOSINA A3 EN SINAPSIS NEUROMUSCULAR DE RATÓN**  
Cinalli A.<sup>1</sup>; Guarracino J.<sup>2</sup>; Palma A.<sup>3</sup>; Muchnik S.<sup>4</sup>; Losavio A.<sup>5</sup>  
*Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, IDIM, CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
idimneurofisio@gmail.com

El ATP que se secreta junto a la acetilcolina (ACh) desde las terminales nerviosas motoras es degradado en el espacio sináptico a ADP, AMP y adenosina (AD) a través de una cascada de eiconucleotidasas. ATP y AD son importantes moduladores de la liberación de ACh al activar receptores P2 y P1 respectivamente. AD luego se degrada a inosina (IN), al tiempo que AMP se desamina a IMP y éste pasa a IN. El nucleósido clásicamente fue considerado un metabolito inactivo. Sin embargo, en trabajos previos encontramos que IN (100 µM) disminuye la secreción espontánea de ACh al activar receptores A3. Nuestro propósito

fue evaluar el efecto de IN sobre la liberación evocada de ACh en preparaciones frénico-diafragma de ratones CF1 y estudiar el mecanismo de su función moduladora. Encontramos que IN redujo la amplitud de los potenciales de placa (EPPs) (IN 64.3 ± 2.8% de los valores controles, n=7, p< 0.05) así como el contenido cuántico del EPP (49.8 ± 9.1%, n=4, p<0.05). El antagonista de los receptores A3 MRS1191 previno el efecto de IN sobre la amplitud del EPP (MRS1191 97.8 ± 5.3%, MRS1191 + IN 97.3 ± 0.5%, n=3). Para investigar si la inhibición presináptica inducida por IN se debe a la modulación de los canales de calcio voltaje dependiente (CCVD) relacionados a la secreción espontánea (CCVD tipo L y N) y evocada (CCVD tipo P/Q) de ACh, estudiamos su efecto en presencia del antagonista universal de los CCVD, Cd2+. Además de reducir la frecuencia de los potenciales de placa miniatura en solución control (SC) y en preparaciones despolarizadas por 15 mM K+, Cd2+ ocluyó el efecto de IN (SC: Cd2+ 50.4 ± 2.6%, Cd2+ + IN 57.4 ± 1.9%, n=4, p< 0.05; K+ 15: 780.0 ± 40.1%, K+ 15 + Cd2+ 131.8 ± 31.0%, K+ 15 + Cd2+ + IN 145.1 ± 42.4%, n=4, p< 0.05). Estos resultados sugieren que, en sinapsis neuromuscular de mamífero, la activación de los receptores A3 por la IN induce inhibición presináptica de la secreción espontánea y evocada de ACh por un mecanismo que involucra a los CCVD presinápticos.

**470. (214) PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE EN LA SECRECIÓN DE TNF-ALFA DE ASTROCITOS DE RATA ESTIMULADOS POR LIPOPOLISACÁRIDO**

Luce V.<sup>1</sup>; Caruso C.<sup>2</sup>; Carniglia L.<sup>3</sup>; Lasaga M.<sup>4</sup>; Rettori V.<sup>5</sup>; De Laurentis A.<sup>6</sup>  
*CEFYO, Facultad de Medicina<sup>1 5 6</sup>; Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina<sup>2 3 4</sup>*  
*valeria\_luce@yahoo.com.ar*

Los astrocitos liberan mediadores proinflamatorios en respuesta a numerosos estímulos nocivos como la endotoxina bacteriana. El TNF-alfa es fundamental en el inicio de la respuesta inflamatoria, la cual puede causar daño cerebral. El sistema endocannabinoide se encuentra en células gliales, ya que tanto astrocitos como microglía están provistos de receptores cannabinoides y de enzimas para producir e inactivar endocannabinoides. Algunos estudios consideran que los endocannabinoides gliales ejercen una acción antiinflamatoria y neuroprotectora, mientras que otros indican que participarían promoviendo el inicio de la respuesta inflamatoria. Nuestro objetivo fue determinar la participación del sistema endocannabinoide en la secreción de TNF-alfa inducida por lipopolisacárido bacteriano (LPS) junto con interferon gama (IFN) en cultivos primarios de astrocitos de rata. La exposición de los astrocitos al LPS (1ug/ml) + IFN (50ng/ml) durante 90 min aumentó la secreción de TNF-alfa (ELISA). Tanto el agregado de anandamida (AEA, 10-11-10-7M) como del análogo sintético no hidrolizable metanandamida (metAEA, 10-9M) no modificaron el efecto del LPS+IFN sobre la liberación de TNF-alfa. El aumento de los niveles de anandamida endógena inducido por la presencia de URB (1.8uM), un inhibidor de la enzima amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) que degrada AEA, incrementó la secreción de TNF-alfa inducida por LPS+IFN. Determinamos la presencia de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 (inmunohistoquímica) en los astrocitos y su participación en el aumento de secreción de TNF-alfa inducida por el LPS+IFN. Los antagonistas de los receptores CB1 (AM251, 10-5M) y CB2 (AM630, 10-5M) bloquearon el efecto estimulador de la AEA endógena sobre la secreción de TNF-alfa inducida por LPS+IFN. En conclusión el sistema endocannabinoide actuaría favoreciendo la respuesta inflamatoria de los astrocitos al estímulo nocivo en nuestras condiciones de estudio. (CONICET PIP 02546, ANPCyT PICT 06-258).

**471. (215) EFECTO MODULADOR DEL SISTEMA GABAERGICO SOBRE EL COMPORTAMIENTO SIMIL ANSIEDAD INDUCIDO POR LA EXPOSICIÓN POSTNATAL AL DI-2(ETHYLHEXYL PHTHALATE) EN RATAS MACHO**

Carbone S.<sup>1</sup>; Gobetto M.<sup>2</sup>; Scacchi P.<sup>3</sup>; Ponzio O.<sup>4</sup>; Reynoso R.<sup>5</sup>; Cardoso N.<sup>6</sup>; Mogulievsky J.<sup>7</sup>; Cutrera R.<sup>8</sup>

*Laboratorio de Neurobiología y Ritmos, Departamento de Fisiología, UBA<sup>1 2 8</sup>; Laboratorio de Neuroendocrinología. Depto. de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA – CONICET.<sup>3 4 5 6 7</sup>*  
*silviacarbone1@hotmail.com*

Di-2(ethyl hexyl phthalate) (DEHP), usado para conferir flexibilidad al PVC que se emplea para fabricar productos de uso cotidiano e insumos médicos, es considerado un disruptor endocrino. En estudios previos demostramos el efecto ansiogénico de la exposición postnatal al DEHP (F). El mismo sería mediado por su acción fundamentalmente antiandrogénica, ya que fue revertido por la administración de testosterona, cuyo efecto ansiolítico a nivel del SNC es conocido. Por otra parte, se sabe que los agonistas GABA tienen efecto ansiolítico. El objetivo fue investigar si la activación del sistema GABAérgico modifica el comportamiento similar- ansiedad producida por la exposición postnatal al DEHP. Se usaron ratas Wistar macho (n=8-10/grupo) expuestas a DEHP (30 mg/kg en agua de bebida) desde el nacimiento hasta el sacrificio a los 60 días de edad. Los controles recibieron agua libre de DEHP (C). Ambos grupos fueron inyectados 1 hora antes del sacrificio con salina (S) y los agonistas tipo A: Muscimol (M) 1 mg/kg i.p y tipo B: Baclofen (B) 10 mg/kg i.p. Para evaluar el comportamiento similar ansiedad se usó el laberinto elevado en cruz (Elevated-plus maze test), midiendo la permanencia del animal en los brazos abiertos del laberinto (%TSO) y la frecuencia de entrada a los mismos (%FEO). Este test considera mayor ansiedad a menor permanencia y frecuencia en los brazos abiertos. El DEHP disminuyó significativamente el % TSO (C+S: 15.4±4.2; F+S: 2.0±0.7; p<0.05) y el % FEO (C+S: 39.8±3.7; F+S: 10±4.3; p<0.001). Los agonistas Muscimol y Baclofen bloquearon este efecto en % TSO (F+S: 2±0.7; F+M: 16.6±3.7, P<0.05; F+B: 32± 7.5, P< 0.001) y en el % FEO (F+S: 10.1±4.3; F+M: 31.4±1.7, p<0.05; F+B: 48.1±5, p<0.001). Los resultados sugieren que la el efecto ansiogénico inducido por el DEHP en ratas macho de 60 día, estaría modulado por la activación por ambos tipos de receptores de GABA.

**MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR 1**

**472. (54) ESTUDIO DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS TGF-BETA/SMAD EN LA REGULACIÓN DE EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN ESTADOS DE PLURIPOTENCIALIDAD DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y TUMORALES**

Galian E.<sup>1</sup>; Parra G.<sup>2</sup>; Rorr C.<sup>3</sup>; Yumoto M.<sup>4</sup>; Derynck R.<sup>5</sup>; Perez Castro C.<sup>6</sup>  
*IBioBA-CONICET-Partner Institute of the Max Planck Society; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1</sup>*  
*6; Laboratorio de Fisiología de Proteínas, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>2</sup>; Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Ingeniería<sup>3</sup>; Departamento de Biología Celular y de Tejido, UCSF, USA<sup>4 5</sup>*  
*evange13@gmail.com*

Las células madre embrionarias (ESCs) se caracterizan por su capacidad de autoperpetuación y de pluripotencialidad bajo determinadas condiciones de cultivo in vitro. Tanto en ESCs humanas como de ratón, un grupo de factores de transcripción conservado denominado Core constituidos por los factores Oct-4, Sox-2 y Nanog sería responsables en parte de mantener las propiedades de ESCs. Al mismo tiempo, la actividad de algunos de los miembros de la familia de proteínas TGFβ/Smad (TGFβ-Activina; BMPs) contribuyen en sostener estados de pluripotencialidad, mediante la inducción y/o represión de genes clave como Nanog. Numerosas evidencias sugieren la existencia de factores adicionales aunque se desconocen los mecanismos moleculares a través de los cuales estas regulaciones ocurren. Nuestro objetivo es determinar si las proteínas TGFβ/Smad coregulan la actividad de genes blanco del Core transcripcional y de qué manera influencia en el comportamiento celular. Mediante el diseño de nuevos algoritmos bioinformáticos y el uso PSSM (Position Specific Scoring Matrixes), identificamos en silico genes

candidatos potencialmente co-regulados por proteínas del Core y Smads. Analizamos la expresión y la modulación de un grupo de genes blanco candidatos, mediante RT-qPCR e inmunofluorescencia bajo estimulación (TGFβ/Activina y BMP-4) y bajo inhibición farmacológica (SB 431542 y Noggin respectivamente), en medios pluripotentes tradicionales y definidos. Los genes seleccionados, presentaron en su mayoría, modulación por la vía de señalización de citoquinas TGFβ tanto en células pluripotentes humanas y murinas en estado indiferenciado así como bajo eventos de diferenciación temprana. Nuestros resultados, luego de ser integrados, aportarían datos para generar un mapa de circuitos de regulación génica en ESCs. La identificación de estos factores/genes podrían tener roles importantes para la modulación de la plasticidad celular y resultar crítica para el derivación de las células pluripotentes en aplicaciones de medicina regenerativa.

**473. (368) EMPLEO DE LÁMINAS CELULARES DE MIOBLASTOS ESQUELÉTICOS AUTÓLOGOS PARA LA REMODELACIÓN CARDIACA POST INFARTO EN UN MODELO OVINO**

Sepulveda D.<sup>1</sup>; Dulbecco E.<sup>2</sup>; De Lorenzi A.<sup>3</sup>; Locatelli P.<sup>4</sup>; Olea D.<sup>5</sup>; Cabeza Meckert P.<sup>6</sup>; Besanson M.<sup>7</sup>; Crottogini A.<sup>8</sup>; Laguens R.<sup>9</sup>  
*Universidad Favoloro<sup>1 4 5 6 7 8 9</sup>, Fundación Favoloro<sup>2 3</sup>*  
*sepulvedadianaa@gmail.com*

Uno de los mayores problemas de la terapia celular cardiaca radica en la escasa o nula retención en el órgano de la suspensión de células a implantar, inclusive cuando se recurre a la inyección. Para resolver ese problema se establecieron cultivos de mioblastos esqueléticos de diafragma ovino sobre macrófagos autólogos de sangre periférica. Se indujo infarto de miocardio por ligadura de una rama diagonal de la arteria DA en ocho ovejas. Se sembraron 1x10<sup>7</sup> células en placas de cultivo termosensibles (UPCELL, Nunc) de 60 mm de diámetro. Luego de 24 horas, se las expuso a 20°C para despegar las células en monocapa, que se recogieron sobre parches cardiovasculares Hemashield® de 2,5cm X 2,5cm. Treinta días después los animales fueron reoperados para colocar el parche en la zona del borde del infarto. Un mes después las ovejas se sacrificaron (Grupo A: parche + células (n=4), B: parche sólo (n=2) C: control sin parche(n=3)). En el estudio histológico del grupo A se comprobó la presencia y supervivencia de los mioblastos esqueléticos colocados sobre los parches. A ese nivel el pericardio adyacente mostró ausencia de reacción inflamatoria o de formación de tejido de granulación, los que estaban presentes en las áreas del pericardio opuestas al parche pero libre de mioblastos, y en el grupo B. Si bien el número de animales no permite obtener conclusiones acerca de la acción de esas células sobre la remodelación cardiaca post infarto, en este estudio preliminar, además de introducir un método para asegurar su persistencia después del implante, se comprueba la factibilidad de producir láminas de mioblastos esqueléticos mediante el empleo de placas termosensibles, la viabilidad de las células durante un mes, y la ausencia de efectos adversos, proveyendo la base para estudiar su acción sobre la remodelación cardiaca, ya sea por su acción mecánica como para la elaboración de factores de crecimiento utilizando láminas con células transfectadas con los genes correspondientes.

**474. (389) TERAPIA DE REEMPLAZO CELULAR EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON: OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE DIFERENCIACIÓN NEURAL DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS POR EL USO DE INHIBIDORES DE SMADS.**

Riva D.<sup>1</sup>; Fernández Espinosa D.<sup>2</sup>; Dimopoulos N.<sup>3</sup>; García C.<sup>4</sup>; Scassa M.<sup>5</sup>; Sevlever G.<sup>6</sup>  
*LIAN, FLENI<sup>2 3 4 5 6</sup>*  
*diegoarielriva@gmail.com*

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa causada por la pérdida de neuronas dopaminérgicas (ND), para la cual se propone el uso de terapias de reemplazo celular. La diferenciación neural (DifN) de células madre embrionarias humanas (CMEh) se

ría útil como fuente de ND o de precursores aptos para la terapia. Utilizando el protocolo de Zhang y col (P1), hemos diferenciado CMEh a neuronas que poseen actividad electrofisiológica y marcadores de ND. Dado que P1 resulta caro, extenso y poco eficiente, nos planteamos reducir los tiempos de DifN mediante el uso de dos inhibidores de las proteínas Smad (factores de transcripción de las vías de señalización de TGFβ y BMP). Los inhibidores Noggin (P2) y Dorsomorfin (P3) favorecen una rápida y eficiente conversión de CMEh a neuroectodermo (NE). En este contexto, se estudió la participación de las Smad en el proceso de DifN en base a los distintos protocolos (P1, P2 y P3). Para ello, se utilizó la línea de CMEh H9 y se estudió la expresión de marcadores de diferenciación (Oct-4), de NE (Pax-6, MAP-2), y de la vía de Smad mediante PCR en tiempo real, inmunofluorescencia (IF) y western blot (WB). Según los resultados, los protocolos P2 y P3 redujeron los tiempos de inducción neural temprana con respecto a P1: la expresión de Pax-6 y de MAP-2 aumentó significativamente (40 y 10 veces respectivamente) a partir del día 6 en P2 y P3, mientras que en P1 se obtuvo un resultado similar a partir del día 18. Al analizar las Smad, en los tres protocolos se observó un descenso marcado y sostenido de la proteína Smad7 desde el primer día de diferenciación estudiado (2-10 veces vs día 0). Si bien en P1 Smad8 y el receptor BMPRI1B aumentaron en paralelo al Pax-6, esto no ocurrió en P2 o P3. Como conclusión podemos confirmar que el uso de inhibidores de Smad dentro del protocolo de DifN disminuye los tiempos y costos de cultivo. Asimismo, se plantea un posible rol de Smad7 dentro de la diferenciación neural estudiada.

**475. (425) "OBTENCIÓN DE UNA BIOPRÓTESIS XENOGÉNEICA (CERDO-HUMANO), PARA POTENCIAL APLICACIÓN QUIRÚRGICA EN DEFECTOS DE LA PARED ABDOMINAL"**

Ambrosio M.<sup>1</sup>; Brandi C.<sup>2</sup>; Argibay P.<sup>3</sup>  
*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, ICBME, Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1 2 3</sup>*  
*mariambrosio@hotmail.com*

Introducción: En el campo de la reparación de los defectos herniarios de la pared abdominal, la ingeniería de tejidos busca superar las limitaciones asociadas con el uso de biomateriales sintéticos. Por esto surgen las bioprótesis elaboradas con matrices de colágenos desnaturalizados y las prótesis híbridas xenogéneas compuestas de matrices de colágeno y células humanas. Objetivo: Desarrollar una bioprótesis xenogénea (cerdo-humano) derivada de submucosa de intestino delgado recelularizada con células madre de tejido adiposo humano. Materiales y métodos: La matriz se obtuvo de un cerdo macho de 15 kg al cual, previa asepsia y anestesia, se le realizó la resección del intestino delgado. El intestino reseccionado fue descelularizado a través de procedimientos mecánicos y con el uso de un detergente no iónico. La recelularización se efectuó a través del cocultivo con células madre (1x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> de matriz), de tejido adiposo humano obtenidas de muestras de liposucción de pacientes de cirugía plástica. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por un comité de ética independiente. Resultados: El procedimiento de descelularización y posterior recelularización fue efectivo observándose en cortes histológicos la integración de las células humanas vitales a la matriz porcina. El promedio total de células madre integradas en el SIS fue de 0,23 células/10-6cm<sup>2</sup>. Conclusión: Es factible recelularizar con células madre de tejido adiposo humano una matriz xenogénea derivada de submucosa de intestino delgado de cerdo. Las ventajas biológicas serán evaluadas en futuros experimentos.

**476. (456) EFECTO DE TGFβ1, DE DISTINTOS SUEROS Y DE VECTORES LENTIVIRALES SOBRE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS ESTIMULANTES DE LA HEMATOPOYESIS, EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO.**

Rodríguez T.<sup>1</sup>; Carrea A.<sup>2</sup>; Saldías A.<sup>3</sup>; Irigo M.<sup>4</sup>; Gallo R.<sup>5</sup>; Perone M.<sup>6</sup>; Dewey R.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Terapia Génica y Células Madre, Instituto de Investigaciones IIB INTECH, Chascomús, CONICET,*

UNSAM<sup>1,2,7</sup>; Servicio de Cirugía Plástica, Estética y Reparadora, Hospital Italiano de La Plata<sup>3,4,5</sup>; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires CONICET Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>6</sup> [taniamr@intech.gov.ar](mailto:taniamr@intech.gov.ar)

Las células madre hematopoyéticas (HSCs) poseen un gran potencial terapéutico, aunque su cultivo *ex vivo* requiere de citoquinas que favorezcan su proliferación. Una de las estrategias para expandir HSCs se basa en el cocultivo de éstas con células madre mesenquimales provenientes del tejido adiposo (ASC). Estas, secretan citoquinas hematopoyéticas (CH) que contribuyen a la multiplicación de las HSCs. Se sabe que TGFβ1, secretado por la mayoría de las células, inhibe la multiplicación de HSC mediante la disminución de factores de crecimiento hematopoyético. Aquí estudiamos en ASCs el efecto de distintos sueros, tales como suero humano (HS), suero bovino fetal (FBS) y seroalbúmina bovina (BSA), en presencia de TGFβ1, sobre la expresión de un panel de CH formado por TPO, SCF, Flt3-ligand (FL), IL-6, IL-3, G-CSF, LIF y GM-CSF, mediante PCR cuantitativa. Por último, analizamos el efecto de la modificación genética con vectores lentivirales, sobre el mismo panel de CH, en presencia y ausencia de TGFβ1. Para ello, utilizando un vector lentiviral que codifica para la proteína GFP, se transdujeron ASCs. De esta manera pudimos documentar que los patrones de expresión de las citoquinas en estudio varían significativamente en presencia de los distintos sueros ( $p < 0.01$ ), siendo BSA la mejor condición encontrada. Además en ASC, TGFβ1 modula la expresión de varias de las CH analizadas ( $p < 0.01$ ), mientras que la expresión de otras parece no ser alterada. Por último observamos que, la modificación genética de ASCs con vectores lentivirales, altera significativamente ( $p < 0.01$ ) los niveles de expresión de los genes analizados. En conclusión, pudimos establecer el efecto de TGFβ1 sobre la expresión de CH en ASCs, y que la modificación genética con vectores lentivirales altera los patrones de secreción de citoquinas de modo no deseado. El estudio de los factores solubles y de las células presentes en el microambiente permitirá desarrollar sistemas más efectivos de expansión de HSC.

- 477. (479) AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, MODIFICACIÓN GENÉTICA Y RASTREO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DE TEJIDO ADIPOSO DE CONEJO PARA SU USO EN MODELOS DE ENFERMEDAD VASCULAR PERIFÉRICA.** Olea F.<sup>1</sup>; Locatelli P.<sup>2</sup>; Hnatiuk A.<sup>3</sup>; Sepúlveda D.<sup>4</sup>; Ramirez R.<sup>5</sup>; Perez Saez J.<sup>6</sup>; Bercovich A.<sup>7</sup>; Crottogini A.<sup>8</sup> *Universidad Favaloro*<sup>1,2,3,4,5,8</sup>; *Bio Sidus*<sup>6,7</sup> [dolea@favaloro.edu.ar](mailto:dolea@favaloro.edu.ar)

Las células mesenquimales de tejido adiposo (ASCs) han demostrado tener efectos beneficiosos en modelos de enfermedades cardiovasculares por liberación de factores de crecimiento, entre ellos VEGF. Por otra parte, hemos demostrado que la administración de un plásmido que contiene el gen de VEGF (pVEGF165) en conejos con enfermedad vascular periférica (EVP) induce angiogénesis disminuyendo las lesiones musculares. Por lo tanto, la utilización de ASCs transfectadas con pVEGF165 podría tener efectos terapéuticos aun más beneficiosos. Como primer paso, nuestro objetivo fue aislar, identificar y transfectar con pVEGF165 ASCs de conejos y luego rastrear su permanencia *in vivo* a diferentes tiempos post-inyección. Células adherentes provenientes de la digestión de grasa inguinal fueron expandidas hasta pasaje 4. Éstas fueron sometidas a citometría de flujo con anticuerpos anti-CD44, CD90, CD105, CD45, a ensayos de diferenciación celular a osteocitos y condrocitos, y a ensayos de transfección con diversas cantidades de lipofectamina 2000 y plásmidos que contienen GFP, luciferasa y VEGF165. En 2 conejos en los que se indujo EVP por extirpación de la arteria femoral izquierda se inyectó  $1 \times 10^7$  ASCs teñidas con PKH26 en el músculo isquémico y se tomaron biopsias a 7, 15 y 30 días para rastrear las células inyectadas. Las ASCs fueron exitosamente aisladas, expandidas e identificadas como mesenquimales por su perfil inmunológico (CD44+, CD90+, CD105+, CD34- y CD45-) y por su diferenciación

a osteocitos y condrocitos. La eficiencia de transfección máxima (10%) se logró con 3 µl de lipofectamina 2000/µg de plásmido/4 cm<sup>2</sup>. Las ASCs marcadas fueron localizadas en el músculo isquémico a los 7, 15 y 30 días post-inyección. Las ASCs de conejo pueden ser satisfactoriamente identificadas, replicadas y transfectadas, y persisten viables a largo plazo en músculo isquémico. Sin embargo, la eficiencia de transfección deberá ser optimizada.

- 478. (635) POTENTIAL OF MAGNETIC FIELD-ASSISTED GENE THERAPY ON SKELETAL MUSCLE C2C12 CELL LINE.**

Pereyra A.<sup>1</sup>; Goya R.<sup>2</sup>; Morel G.<sup>3</sup>; Mykhaylyk O.<sup>4</sup>; Delbono O.<sup>5</sup>; Taylor J.<sup>6</sup>; Hereñu C.<sup>7</sup>

*INIBIOLP-CCT La Plata-CONICET, Cátedra B de Histología, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP*<sup>1,2,3,7</sup>; *Klinikum rechts der Isar der TUM, Institute of Experimental Oncology and Therapy Research, München, Germany*<sup>4</sup>; *Wake Forest University, School of Medicine, North Caroline, USA*<sup>5,6</sup> [andrepereyra@gmail.com](mailto:andrepereyra@gmail.com)

The association of viral vector-based gene delivery with nanotechnology offers the possibility to develop more efficient gene therapy strategies for a number of applications and pathologies. The magnetic field-assisted system combines Magnetic Drug Targeting (MDT) and Magnetofection, both based on the use of magnetic nanoparticles (MNP). The goal of MDT is to concentrate magnetically responsive therapeutic complexes in target areas of the body by means of external magnetic fields. Magnetofection is a methodology based on the association of MNP with nonviral or viral vectors in order to optimize gene delivery in the presence of a magnetic field. Development of reliable techniques for manipulation of gene expression in mature skeletal muscle fibers is critical for understanding molecular mechanisms involved in both physiology and pathophysiology. Although skeletal muscle cells can be transfected *in vivo* by either direct injection of naked plasmids, cationic lipids and neutral polymers or, in a better approach, by electroporation none of these techniques has the potential displayed by viral vectors infection specially regarding undifferentiated C2C12 cells (myoblasts). However, differentiated myotubes are refractory to standard protocols for gene transfer *in vitro* and the use of viral vectors offers low efficiency. The aim of the present study was to determine whether magnetofection could provide an efficient alternative for gene delivery into mature C2C12 cells. The myoblasts culture was induced to differentiate and after 5 days the multinucleated myotubes were infected using Magneto-adenoviral vectors administrated with a magnetic field applicator. Screening for efficiency was performed using a fluorescent reporter protein (GFP) incorporated to the viral vector. Therefore, the present *in vitro* study validates the use of MNP-adenoviral vectors complexes assisted by magnetic field as a highly efficient approach for gene transfer into mature skeletal muscle.

- 479. (727) GENERACIÓN DE DISTINTAS LÍNEAS DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS HUMANAS**

Questa M.<sup>1</sup>; Bluguermann C.<sup>2</sup>; Fernández Espinosa D.<sup>3</sup>; Solari C.<sup>4</sup>; Romorini L.<sup>5</sup>; Scassa M.<sup>6</sup>; Cibelli J.<sup>7</sup>; Sevlever G.<sup>8</sup>; Guberman A.<sup>9</sup>; Miriuka S.<sup>10</sup>

*Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLENI, ARGENTINA*<sup>1,2,3,5,6,8,10</sup>; *Lab. de Reg. de Exp. Genética en Crecimiento, Supervivencia y Dif. Celular, FCEN, UBA*<sup>4,9</sup>; *Cellular Reprogramming Laboratory, Dept. of Animal Science, Michigan State University, USA*<sup>7</sup> [mariaquesta@gmail.com](mailto:mariaquesta@gmail.com)

La reprogramación de células somáticas a Células Madre Pluripotentes Inducidas (CMPI) es un recurso invaluable que permite la generación de células específicas de paciente de cualquier linaje, sin recurrir a material embrionario. Los criterios para su validez son: morfología de células pluripotentes, auto-renovación ilimitada, expresión de marcadores de pluripotencia, downregulación de marcadores de diferenciación, independencia de factores utilizados y conformidad con pruebas de diferenciación. El objetivo fue la reprogramación de fibroblastos a CMPI mediante distintas técnicas y condiciones, comparando eficiencias y caracterizando las líneas.

La reprogramación se realizó a través de la introducción de Factores de Transcripción embrionarios, Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc, mediante 2 sistemas lentivirales distintos. Se generaron 3 líneas de aparentes CMPi con colonias morfológicamente similares a células pluripotentes. Se caracterizaron para pluripotencialidad mediante microscopía de fluorescencia, encontrándose presencia de marcadores como Oct4, Nanog, Tra-1-60, Tra-1-81 y SSEA-4 y alta actividad de AP. Para las líneas iPSC1.5 e iPSC6.1 se realizó Real Time PCR de estos marcadores y diferenciación espontánea observándose la presencia de marcadores de las tres capas germinales, como alfa-fetoproteína, actina de músculo liso y Pax6, confirmando la pluripotencialidad in vitro. Para las CMPi iPSC6.1 diferenciadas se observaron zonas contráctiles, con expresión de marcadores cardiacos (cTnT, ANP, Nkx2.5) correspondiente a cardiomiocitos y se comprobó el cariotipo normal. Se compararon eficiencias en la generación de CMPi en distintas condiciones, comprobándose una eficiencia de reprogramación de 0,01% que aumenta cuando las células son neonatales y cuando los fibroblastos son mantenidos en un medio rico en SFB. En conclusión la generación de CMPi es posible a partir de distintas poblaciones celulares y con la utilización de distintos vectores.

#### 627a. (403) REGENERACIÓN TISULAR POR INGENIERÍA DE TEJIDOS CON MATRICES HÍBRIDAS (MH).

Goy D.<sup>1</sup>; Toledo J.<sup>2</sup>; Gorosito E.<sup>3</sup>; Mortarino P.<sup>4</sup>; Souza Costa H.<sup>5</sup>; Abranson D.<sup>6</sup>; Zingoni N.<sup>7</sup>; Acosta Pedemonte N.<sup>8</sup>; Cabello J.<sup>9</sup>; Dorming M.<sup>10</sup>; Bumaguin G.<sup>11</sup>; Jamin A.<sup>12</sup>; Sander Manzur H.<sup>13</sup>; Pereira M.<sup>14</sup>; Battagliano R.<sup>15</sup>; Feldman S.<sup>16</sup>  
 LABOATEM Laboratorio Biología Osteoarticular, Ing Tisular I y Terapias Emergentes, Fac Cs Médicas, UNR<sup>1 2 3 4 6 7 8 9 10 11 12 16</sup>; Dto Eng. Metalúrgica e de Materiais, Univ Bello Horizonte, Minas Gerais, Brasil<sup>5 13 14</sup>; Department of Cytokine Biology, The Forsyth Institute, Boston, Massachusetts, USA<sup>15</sup>  
 dantegoy@gmail.com

Investigamos si MH sintetizadas por nosotros promueven in vitro la proliferación de células óseas e in vivo la regeneración de hueso de novo mediante ensayos de implante de MH en lesiones ósea de nuestro modelo experimental. MH se prepararon con 30% vidrio bioactivo (composición nominal 58% SiO<sub>2</sub>-33 % CaO 9%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) y 70% PVA. La espuma se formó por proceso sol-gel, con lauril sulfato como agente formador, Ac. Fluorhídrico 10% (gelificante), ensayándose 3 cc de glutaraldehído. Scans de microscopía electrónica mostraron una directa relación entre el incremento de la concentración de Gt y la disminución en el tamaño de los poros, lográndose con Gt al 5% un poro de 150 nm, en el que se observó la mejor viabilidad celular (ensayos de cultivo de células in vitro). Conejos New Zealand se dividieron en 3 grupos; L (se practicó quirúrgicamente lesión ósea en epífisis distal lateral fémur derecho, y se subdividieron en 2 grupos según recibiesen (Limp) o no (L) implantes de cilindros de MH (6 mm diámetro, 3 mm espesor), control (C), n=5 p/c/grupo). Seguimientos clínicos no mostraron parámetros alterados de Limp ó de L vs C: nivel alimentación, Ta., hemogramas (p<0.01, ANOVA). Estudios radiológicos y tomográficos (Tomógrafo Toshiba multislice 16 detectores), día 0 (control quirúrgico) a los 45 días mostraron: todos los conejos Limp.; zonas implantadas, en sacabocado, de bordes netos en proyección femoral-no articular, en el interior imagen densa compatible con integración incipiente, mínimos signos de flogosis, sin signos de rechazo a nivel imagenológico, (nol: sin lesiones de bordes netos en ningún caso, debido a proceso de fibrosis incipiente.) Estudios anatomopatológicos mostraron en Imp, trabéculas dentro de los implante, con presencia de osteocitos, osteoblastos cuboidales y deposición de osteoide sin observarse en ninguno de los casos reacción inflamatoria. Se ha desarrollado un sistema promisorio para procesos de regeneración tisular ósea.

## REPRODUCCIÓN 5

#### 480. (435) LA DETECCIÓN DE LA INTEGRINA ALFA 5 (RECEPTOR DE FIBRONECTINA) Y EL RECEPTOR DE MEMBRA-

#### NA DE PROGESTERONA (MPR) AUMENTA DURANTE LA CAPACITACIÓN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

Pozo P.<sup>1</sup>; Martínez E.<sup>2</sup>; Morales P.<sup>3</sup>; Díaz E.<sup>4</sup>  
 Universidad Católica del Norte<sup>1</sup>; Universidad de Antofagasta<sup>2 3 4</sup>  
 ppozo@ucn.cl

Previamente hemos determinado que existen sub-poblaciones de espermatozoides humanos, que expresan integrina  $\alpha 5$  y mPr y que la estimulación de espermatozoides in vitro con progesterona y fibronectina provoca un aumento cooperativo, en el porcentaje de espermatozoides reaccionados. El espermatozoide no capacitado no es capaz reaccionar en respuesta a progesterona ni fibronectina. Objetivo: Determinar si la expresión diferencial de integrinas y mPr en espermatozoides humanos cambia durante la capacitación. Para ello, en alícuotas de espermatozoides móviles, seleccionados por Percoll, no capacitados y capacitados durante 5 y 18 hrs se determinó el porcentaje de detección de integrina  $\alpha 5$  y del mPr, además del estado acrosomal. Metodología: los espermatozoides fueron teñidos para citometría de flujo y microscopía de inmunofluorescencia, con anticuerpos anti- $\alpha 5$  y anti-mPr conjugados con diferentes fluorocromos. Otra alícuota fue estimulada con fibronectina o progesterona y se determinó el estado acrosomal (RA) a través de PSA-FITC. Resultados: expresados como % (Promedio  $\pm$  ES)

Espermatozoides	Fibronectina/ integrina $\alpha 5$ % de RA	Progesterona/mPr % de marca integrina $\alpha 5$	% de RA	% de marca mPr
No capacitados	5,25 $\pm$ 0,63	1,61 $\pm$ 0,17	7,4 $\pm$ 0,37	2,9 $\pm$ 0,26
Capacitados 5 hrs	10,8 $\pm$ 0,87	7,2 $\pm$ 0,49	13,8 $\pm$ 1,23	6,8 $\pm$ 0,68
Capacitados 18 hrs	31,8 $\pm$ 1,36	44,9 $\pm$ 3,15	34,2 $\pm$ 0,85	33,8 $\pm$ 3,24

El porcentaje de detección de la integrina  $\alpha 5$  y mPr cambia a medida que se capacita, lo que se relaciona con el aumento del porcentaje de espermatozoides reaccionados inducidos por fibronectina y progesterona. Teniendo en cuenta que en el espermatozoide los procesos de traducción y transcripción están inactivos, el cambio detectado podría adjudicarse a cambios conformacionales o variaciones en la distribución sub-celular de las proteínas detectadas. Financiamiento: Fondecyt 11070051 y 1080028

#### 481. (504) MECANISMOS OVÁRICOS ALTERADOS POR LA HIPERANDROGENIZACIÓN PRENATAL

Velez L.<sup>1</sup>; Amalfi S.<sup>2</sup>; Heber F.<sup>3</sup>; Motta A.<sup>4</sup>  
 CEFYBO, UBA, CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
 lean\_strummer@hotmail.com

Previamente demostramos que la hiperandrogenización prenatal (HA) induce durante la etapa puberal alteraciones en la esteroidogénesis, el estado inflamatorio e induce quistes foliculares en el ovario. Objetivo: evaluar algunas de las vías alteradas en el ovario como causa de la HA. Materiales y métodos: Se cuantificó por Western Blotting la expresión proteica de la enzima limitante de la síntesis de prostaglandinas (intervienen en procesos inflamatorios), la ciclooxigenasa 2 (COX2), de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR) y de la proteína correspondiente a los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales (PPAR $\alpha$ ) como reguladores de la transcripción de enzimas esteroidogénicas y de la síntesis de prostaglandinas. Asimismo se evaluó el balance oxidante-antioxidante del ovario. Ratas preñadas Sprague-Dawley se inyectaron entre los días 16 a 19 de gestación con 2 (T2) ó 5 mg (T5) de testosterona ó aceite (control: C), N=10 animales/determinación y por grupo. Las crías hembras se sacrificaron a los 60 días de edad. Resultados: La expresión de COX2 ovárica se incrementó en T5 (2,56+0,36) vs T2 (0,77+0,24) y C (0,93+0,29 unidades arbitrarias; ua) al igual que la de StAR (T5:2,37+0,18; T2:0,90+0,22; C:1,06+0,27 ua) y PPAR $\alpha$  (T5:1,73+0,22; T2:0,80+0,24; C:0,74+0,16 ua). El estrés oxidativo estaba controlado ya que la peroxidación lipídica (C:75+5; T2:69+4; T5:71+9nM/mg proteína) no varió entre los tres grupos a expensas del aumento del metabolito anti-oxidante; glutatión tanto en T2 como en T5 (C:0,24+0,04; T2:1,03+0,12; T5:1,2+0,3  $\mu$ M/

mg proteína). Concluimos que HA modifica la esteroidogénesis y establece un estado pro-inflamatorio en el ovario por alteración de los niveles proteicos de las enzimas limitantes de ambos procesos y del factor de transcripción PPAR $\alpha$ . Asimismo, el ovario responde a un estado pro-oxidante dado que incrementa la concentración del metabolito anti-oxidante glutatión.

**482. (506) UNA BREVE EXPOSICIÓN A UN GRADIENTE PICOMOLAR DE PROGESTERONA PROMUEVE LA CAPACITACIÓN EN ESPERMATOZOIDES HUMANOS**

Gatica L.<sup>1</sup>; Uñates D.<sup>2</sup>; Teves M.<sup>3</sup>; Guidobaldi H.<sup>4</sup>; Franchi N.<sup>5</sup>; Giojalas L.<sup>6</sup>

Centro de Biología Celular y Molecular-UNC<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
laura.gatica@gmail.com

**Introducción:** Para poder fecundar al ovocito, el espermatozoide (E) debe completar un proceso denominado capacitación. Recientemente desarrollamos un método (ESE) en el cual la exposición a un gradiente pM de progesterona (P) permite seleccionar y concentrar a los E capacitados (E cap), aquellos en condiciones de orientar su movimiento a favor del gradiente. Sin embargo, observamos que el número de E cap recuperado del ESE es mayor al que presenta la muestra antes del ensayo. Esto podría deberse a que el gradiente pM de P no sólo recluta a los E cap, sino que además promueve la capacitación de nuevos E. **Objetivo:** Evaluar si la exposición a un gradiente pM de P promueve la capacitación de los E. **Diseño del Estudio:** La muestra conteniendo E previamente incubados bajo condiciones capacitantes fue tratada con ionóforo de calcio con el fin de remover los E cap. A continuación, la muestra así tratada se expuso a un gradiente pM de P en la cámara del ESE. En los E recuperados del ESE se evaluaron dos parámetros indicadores del estado capacitado: %E con patrón de fosforilación de proteínas en tirosina (PY) y %E que realiza la RA inducida. **Resultados:** El tratamiento con ionóforo de calcio previo al ESE removió los E cap de la muestra espermática. Sin embargo, luego de la exposición al gradiente pM de P durante el ESE aumentó significativamente el %E que expresan el patrón de PY ( $p < 0.05$ ) y %E que realiza la RA inducida ( $p < 0.001$ ), indicando en ambos casos la presencia de nuevos E cap. Por el contrario, cuando los E se expusieron a una concentración 10 pM de P distribuida en forma homogénea, no se observaron cambios en estos parámetros. **Conclusión:** Una breve exposición a un gradiente pM de P permite que una nueva subpoblación espermática complete la capacitación.

**483. (522) EL PARTO PREMATURO INDUCIDO POR LA TOXINA SHIGA TIPO 2 EN RATAS EN ESTADIO TARDIO DE GESTACION ESTA MEDIADO POR EL TNF- $\alpha$**

Burdet J.<sup>1</sup>; Cella M.<sup>2</sup>; Zotta E.<sup>3</sup>; Franchi A.<sup>4</sup>; Ibarra C.<sup>5</sup>  
Laboratorio de Fisiopatogenia, Departamento de Fisiología,  
Facultad de Medicina, UBA<sup>1 3 5</sup>; CEFyBO, CONICET<sup>2 4</sup>  
julianaburdet@yahoo.com.ar

Infecciones asociadas con *Escherichia coli* enterohemorrágica productor de toxina Shiga (STEC) podrían ser causa de morbi-mortalidad fetal. El principal factor de virulencia de STEC es la toxina Shiga tipo 1 ó 2 (Stx1, Stx2 y sus variantes) aunque las cepas que producen Stx2 son las de mayor prevalencia en nuestro país. Stx2 inhibe irreversiblemente la síntesis de proteínas e induce apoptosis en los órganos blanco. Previamente hemos informado que la inyección intraperitoneal (i.p.) de un sobrenadante de cultivo de *E. coli* recombinante que expresa Stx2 y contiene LPS (sStx2) en ratas en estadio tardío de gestación induce parto prematuro. Estos efectos no se observan cuando se inyecta sobrenadante control que sólo contiene LPS (sControl). Se ha observado que Stx puede inducir la producción de distintos factores proinflamatorios, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que potencian su efecto. Nuestro objetivo fue evaluar la participación del TNF- $\alpha$  en el parto prematuro inducido por sStx2. La inyección i.p. de sStx2 (0,7-2 ng de Stx2 y 15-45 ng de LPS/g de peso) indujo parto prematuro de fetos vivos y/o muertos de manera dosis dependiente. Las placentas de las ratas tratadas con la menor dosis (0,7 ng de Stx2 y 15 ng

de LPS/g de peso) presentaron infiltración leucocitaria. Por medio de ensayos de ELISA observamos que el nivel de TNF- $\alpha$  sérico de las ratas tratadas con sStx2 fue significativamente mayor a las 2 hs post-inyección comparado con las ratas tratadas con sControl (15 ng LPS/g peso) ( $p < 0,05$ ). Un grupo de ratas fue tratado con Etanercept (ETA), un inhibidor del TNF- $\alpha$ , 6 hs antes de la inyección de sStx2. ETA (10  $\mu$ g/g de peso) produjo una disminución significativa de los niveles de TNF- $\alpha$  séricos ( $p < 0,05$ ) y revirtió en aproximadamente un 30% el parto prematuro. Las ratas que llegaron a término tuvieron crías vivas con un desarrollo normal. Nuestros resultados sugieren que el TNF- $\alpha$  cumpliría un rol importante en el parto prematuro inducido por Stx2.

**484. (599) ESTUDIO DE UNA POBLACIÓN RURAL EXPUESTA AMBIENTALMENTE A ORGANOFOSFORADOS: EVALUACIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL**

Quintana M.<sup>1</sup>; Rovedatti M.<sup>2</sup>; Vera B.<sup>3</sup>; Lopez Nigro M.<sup>4</sup>; Rios De Molina M.<sup>5</sup>; Magnarelli G.<sup>6</sup>

LIBIQUIMA-IDEPA CONICET- Universidad Nacional del Comahue<sup>1 2 3 6</sup>; CIGETOX- FFyB - UBA<sup>4</sup>; FCEN, UBA<sup>5</sup>  
quintana\_maru@hotmail.com

La exposición prenatal a plaguicidas puede afectar la salud a corto y largo plazo, por lo es relevante evaluar, mediante biomonitoreos, su potencial impacto en la salud de poblaciones vulnerables. Con el objetivo de identificar biomarcadores sensibles del estado redox del compartimiento fetal, se llevó a cabo un estudio en sangre de cordón umbilical (SCU) en población rural del Alto Valle de Río Negro, área de uso intensivo de organofosforados (OF). Se utilizaron criterios de inclusión/exclusión y consentimiento informado. Se colectaron muestras rurales ( $n=16$ ) de período de pulverización (PP), receso (PR) y de grupo control ( $n=17$ ) (PoC). La exposición a OF se evaluó en sangre de 3er trimestre de embarazo y en SCU determinando colinesterasas. Se observaron diferencias significativas ( $p \leq 0,001$ ) en colinesterasa plasmática materna en PP vs PR. No se hallaron diferencias en SCU. En esta matriz se determinó por métodos espectrofotométricos la actividad de catalasa (CAT) y niveles de peróxidos lipídicos (LPO) en eritrocito (ER) y plasma (PL) y actividad de superóxido dismutasa (SOD) en ER. Se evaluó daño genotóxico por ensayo cometa en linfocitos (ID). CAT de ER aumentó significativamente ( $p \leq 0,005$ ) en PP respecto a PoC ( $0,52 \pm 0,03$  vs.  $0,35 \pm 0,02$   $\mu$ moles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg prot x min). No se observaron diferencias para SOD y LPO. Los parámetros de PL no arrojaron diferencias entre grupos. El ID de linfocitos fue mayor en PP ( $271,88 \pm 17,70$ ) que en PoC ( $224,53 \pm 3,73$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Se encontró una correlación positiva entre CAT de ER e ID ( $p \leq 0,005$ ,  $r=0,52$ ). Si bien se requiere ampliar el muestreo, los resultados indican que la exposición ambiental a plaguicidas durante el embarazo afectó, en el compartimiento fetal, la defensa antioxidante en ER y produjo daño genotóxico. Dichas alteraciones se asociaron a cambios en el ambiente redox intrauterino. Autorización del Comité de Bioética de Salud Neuquén (CABISH). Agradecimientos: SACyT, UNCo, FONCyT y médicos Silvia Santa Cruz y Gabriel Álvarez.

**485. (598) EL SISTEMA OPIODE (SO) REGULA LA SECRECIÓN DE PROLACTINA (PRL) EN RESPUESTA A LA SUCCIÓN EN RATAS CON LACTANCIA DEFICIENTE (OFA HR/HR)**

Pennacchio G.<sup>1</sup>; Flores L.<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</sup>; IMBECU CCT-CONICET Mendoza; Instituto de Ciencias Básicas UNCuyo<sup>4</sup>; IMBECU CCT-CONICET Mendoza, Facultad de Ciencias Médicas UNCuyo<sup>5</sup>  
gpennacchio@mendoza-conicet.gob.ar

Los péptidos opioides modulan la actividad dopaminérgica y regulan la secreción de PRL en la lactancia normal. Las ratas de la cepa OFA hr/hr tienen lactancia deficiente y alta tasa de mortalidad neonatal. Se caracterizan por un tono dopaminérgico elevado y gran susceptibilidad al estrés durante la lactancia. **Objetivo:** evaluar el rol del SO en la secreción de PRL inducida por succión en ratas de la cepa OFA y su correlación con los niveles séricos de

PRL. Metodología: se usaron ratas en el día 10-12 de lactancia, con lactancia continua (LC), separadas de sus crías durante 12 h (S/ss) y separadas de sus crías por 12 h y sometidas a succión durante 2 h y 4 h. Se midió por PCR de tiempo real la expresión de encefalinas (ENK) y de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  opioides (RO $\mu$  y RO $\kappa$ ) y se correlacionaron los resultados con los niveles séricos de PRL medidos por RIA. Se cuantificó por el método comparativo de CT y la expresión del ARNm fue normalizada respecto al gen S16 (media $\pm$ SEM; n:8). Resultados: la ausencia de estímulo de succión y/o la disminución de la PRL sérica indujo una caída en los niveles de expresión de ENK comparadas con lactancia continua (LC: 1.61  $\pm$  0.18 vs S/ss: 0.99  $\pm$  0.18, p<0.05). La succión por 2 ó 4 h no fue suficiente para restablecer los niveles de ENK a valores similares a la LC. En correlación inversa con el aumento de PRL sérica inducida por 2 y 4 h de succión, la expresión de los RO $\mu$  y RO $\kappa$  disminuyó significativamente en ratas separadas de sus crías (p<0.01 vs S/ss). Conclusión: El SO es operativo en las ratas OFA y participa modulando la secreción de PRL durante la lactancia dado que la expresión de ENK, RO $\mu$  y RO $\kappa$  sería regulada por los niveles elevados de PRL y/o por el estímulo de la succión.

**486. (638) VIP MODULA LA EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS Y EL RECLUTAMIENTO DE LINFOCITOS T REGULADORES EN CÉLULAS ESTROMALES ENDOMETRIALES**

Grasso E.<sup>1</sup>; Fraccaroli L.<sup>2</sup>; Hauk V.<sup>3</sup>; Mor G.<sup>4</sup>; Perez Leiros C.<sup>5</sup>; Ramhorst R.P

Lab de Inmunofarmacología, Dpto de Química Biológica, FCEN UBA – CONICET<sup>1,2,3,5,6</sup>; Reproductive Immunology Unit, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, School of Medicine, Yale University<sup>4</sup> estebangrasso@gmail.com

La generación y mantenimiento de la interfase materno placentaria involucra la modulación de quimioquinas, receptores y el reclutamiento de distintas poblaciones leucocitarias como las células T regulatorias inducibles (iTreg). Por otra parte, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) es producido por células trofoblásticas y modula la respuesta inmune materna hacia un perfil tolerogénico. En este trabajo caracterizamos el sistema VIP y sus receptores VPAC y evaluamos el efecto de VIP en la modulación de la expresión de quimioquinas y en el reclutamiento de células iTreg en células estromales endometriales. Observamos que la línea celular HESC (human endometrial stromal cells) expresan VIP y su receptor VPAC1 en forma constitutiva, y la progesterona (10-6M) incrementa la expresión de VIP. Más aún, VIP induce la expresión de la metaloproteinasas MMP9. Por otra parte, cuando las HESC se estimularon en presencia de LPS 0.1ug-ml, VIP (10-7M) solo aumentó significativamente la expresión de RANTES, mientras IL-8 y MCP-1 no mostraron cambios (p<0.05). Para determinar más específicamente el efecto de VIP, se estimuló la expresión endógena de VIP con progesterona y se observó un aumento de la expresión de RANTES que revierte en presencia del péptido antagonista de VIP (p<0.05). Finalmente, a través de un modelo de diferenciación de iTreg in vitro a partir del LT CD4 vírgenes de mujeres fértiles cultivados 5 días en presencia de IL-2 y TGF $\beta$ , se evaluó la capacidad de LPS y de VIP de atraer iTregs hacia células HESC. Para esto se utilizaron sistemas de transwell (8um) y observamos que las HESC fueron capaces de reclutar selectivamente iTregs y LPS aumentó este efecto luego de 48h. Concluimos que VIP tendría un papel activo en el reclutamiento de iTreg hacia las células estromales endometriales a través de la modulación de la expresión de RANTES.

**487. (676) APOPTOSIS EN OVARIO INFANTO-JUVENIL Y ADULTO HUMANO: ANALISIS INMUNOHISTOQUIMICO DE LA EXPRESION DE BID CLIVADO, MCL-1 Y CASPASA 3 ACTIVA**

Meilerman A.<sup>1</sup>; Fraunhoffer N.<sup>2</sup>; Albamonte M.<sup>3</sup>; Albamonte M.<sup>4</sup>; Stella I.<sup>5</sup>; Galliano S.<sup>6</sup>; Vitullo A.<sup>7</sup>

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico –CEBBAD- Universidad Maimónides<sup>1,2,3,4,7</sup>; Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Israelita<sup>5</sup>; Servicio de Anatomía Patológica, Hospital de Merlo, Merlo<sup>6</sup> meilerman.analia@maimonides.edu

periodo fetal, al inicio de la pubertad quedarán 300.000 oocitos viables de los cuales alrededor de 400 sobrevivirán para ser liberados para su potencial fertilización. Más del 99,9% de la masa germinal habrá sido eliminada al final del periodo reproductivo por APOPTOSIS. El balance entre BCL-2 y BAX es responsable de sobrevivencia o muerte de célula germinal. Se sospecha la acción concertada de otros miembros de familia BCL-2. El objetivo del trabajo fue analizar el patrón de expresión espacial de las proteínas pro-apoptóticas BID CLIVADO y anti-apoptótica MCL-1, como así también la caspasa efectora, CASPASA-3 ACTIVA en 37 ovarios infanto-juveniles y adultos humanos con diagnóstico histológico normal de la masa germinal, entre 4 y 72 años mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. BID CLIVADO se detecta en citoplasma de oocitos y células de la granulosa de folículos primordiales y primarios. MCL-1 se expresa con localización citoplasmática en distintos estadios foliculares en estrato germinal y somático. CASPASA-3 ACTIVA se detecta en citoplasma de células de la granulosa y teca interna y en citoplasma de oogonias aisladas y oocitos contenidos en distintos estadios foliculares. En conclusión estos resultados sugieren el inicio de la actividad apoptótica en el estrato somático del folículo y ponen de manifiesto una participación concertada de diferentes miembros de la familia BCL-2 con efectos anti-apoptóticos (BCL-2 y MCL-1) y pro-apoptóticos (BAX y BID CLIVADO) con un patrón específico de manifestación espacial tanto en ovario infanto-juvenil como adulto.

**488. (272) EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA EN EL HIPOTÁLAMO DE LAGOSTOMUS MAXIMUS (VIZCACHA DE LAS LLANURAS) DURANTE LA GESTACIÓN Y CO-LOCALIZACIÓN CON GNRH**

Saucedo L.<sup>1</sup>; Inserra P.<sup>2</sup>; Willis M.<sup>3</sup>; Vitullo A.<sup>4</sup>; Dorfman V.<sup>5</sup>

Centro de Estudios Biomédicos Biotecnológicos Ambientales y Diagnóstico CEBBAD Universidad Maimónides<sup>1,2,3,4,5</sup> dorfman.veronica@maimonides.edu

La progesterona (Pg) actúa como organizador del ciclo estral a través del feedback negativo sobre la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH). Su interacción con los receptores media el efecto fisiológico. Previamente hemos localizado GnRH en el hipotálamo de la vizcacha durante la gestación. Este animal presenta polioovulación, neo-oogénesis a edad adulta y pseudo-ovulación durante la gestación. El objetivo fue caracterizar la expresión del Receptor de Progesterona (RPG) en el hipotálamo de este roedor para comprender el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) durante la gestación. Se utilizaron vizcachas adultas preñadas ovulando (PO) y sin ovular (PNO), no preñadas ovulando (NPO) y sin ovular (NPNO), y machos (M), (n=5 por grupo). El dosaje sérico de Pg mediante ELISA mostró mayor concentración en NPO vs NPNO (10 veces, p<0,05) y en PO vs PNO (3 veces, p<0,05). Mediante Western-Blot se determinó una expresión significativamente (s., p<0,05) mayor del RPG en hipotálamo de animales no ovulando que en ovulando (154% NPNO vs NPO, 98% PNO vs PO). Por inmunohistoquímica se localizó el RPG en citoplasma de neuronas del Área Preóptica del Hipotálamo (APO), Núcleo Supraóptico (NSO) y Eminencia Media (EM), con un área inmunorreactiva (AIR) s. menor en las ovulando que en las no ovulando (PNO vs PO 93%, NPNO vs NPO 55%) en el NSO, mientras que en el APO las NPO tienen mayor AIR que las NPNO (54%). En ME se observó que el AIR para RPG es menor en las no ovulando que en las ovulando (30%). Mediante microscopía confocal se determinó co-expresión de RPG y GnRH en neuronas del APO y NSO, mientras que en ME se observó RPG en células adyacentes a axones reactivos para GnRH. La presencia de RPG en el hipotálamo de vizcacha, con variaciones durante la gestación, indicaría el funcionamiento del eje aún en la preñez. Su co-localización con GnRH indicaría la acción directa sobre su síntesis y secreción. (PIP-CONICET 0225/2011).

**489. (326) DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN EMBRIO-TROFOBLÁSTICA IN VIVO E IN VITRO EN FASES IMPLANTATIVAS LUEGO DEL CONSUMO PERICONCEPCIONAL DE ALCOHOL, EN EL RATÓN.**

Perez Tito L.<sup>1</sup>; Bevilacqua E.<sup>2</sup>; Cebral E.<sup>3</sup>

Laboratorio de Reproducción y Fisiopatología Materno-Embrionaria, IFIBYNE-CONICET/DBBE-FCEUN-UBA<sup>1,2</sup>; Laboratório Biologia do Trofoblasto, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil<sup>3</sup>  
leticiaperezitto@yahoo.com.ar

En organogénesis, la ingesta periconcepcional de alcohol produce reabsorción relacionada con arresto peri-implantatorio. Analizamos: 1. El desarrollo y morfología embrio-trofoblástica (E-T) al día 4 y 5 de gestación (DG) (in vivo). 2. La dinámica del desarrollo E-T durante las fases implantativas (in vitro) (diferenciación, grado de invasividad y crecimiento de células trofoblásticas). Se trataron hembras murinas con 10% de etanol en agua de bebida desde 15 días previos a la fecundación y hasta el DG4 y 5 (Hembras Tratadas, HT, vs Hembras Controles, HC con agua). Los embriones de DG4 y 5 se analizaron morfológicamente y los de DG5 se cultivaron para análisis de la secuencia de diferenciación y de expansión/invasión trofoblástica (morfometría, Image Pro). Se identificaron tres poblaciones embrionarias según áreas de expansión: pequeños (P), medianos (M) y grandes (G). Se evaluó el N° de células trofoblásticas y la diferenciación. Al DG4, las HT presentaron aumento del % mórulas ( $p < 0.01$ ), disminución del % de blastocistos (Bl.) expandidos y del % de Bl. Hatched ( $p < 0.05$ ) y elevado % de embriones anormales ( $p < 0.05$ ) vs % de las HC. Al DG5, el % de Bl. implantativos tempranos fue mayor y el % de Bl. Avanzados menor ( $p < 0.05$ ). A las 24 hs-cultivo (fase de adhesión) y 48 hs-cultivo (fase de penetración) las HT tuvieron disminución del % de embriones P (levemente expandidos y sin CGT) y mayor % de embriones M (con expansión moderada y con CGT) vs % de HC ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). A las 48 hs, ambos P y M tuvieron mayor área de expansión media que las de las HC ( $p < 0.05$ ), y el N° de células trofoblásticas/embrión fue mayor ( $p < 0.001$ ). El consumo de alcohol peri-implantatorio induciría retraso de la diferenciación y anomalías embrionarias, perjudicaría el equilibrio del desarrollo embrionario poblacional, la dinámica de diferenciación durante las fases de la implantación, alteraría el crecimiento E-T y probablemente aumentaría tempranamente la invasividad de las células trofoblásticas.

**490. (137) TRATAMIENTOS MATERNO CON ÁCIDO FÓLICO Y ACEITE DE CÁRTAMO REGULAN LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS EN EL EMBRIÓN Y LA DECIDUA DE RATAS DIABÉTICAS**

Higa R.<sup>1</sup>; Fornes D.<sup>2</sup>; Kurtz M.<sup>3</sup>; Capobianco E.<sup>4</sup>; Jawerbaum A.<sup>5</sup>  
CEFYBO-CONICET-UBA, Facultad de Medicina<sup>1,2,3,4,5</sup>  
rominahiga@gmail.com

La diabetes materna induce un incremento de las malformaciones embrionarias relacionado con un ambiente proinflamatorio intrauterino. Previamente observamos que tratamientos maternos con ácido fólico (FOL) y aceite de cártamo conteniendo 75% de ácido linoleico (CAR) previenen las malformaciones embrionarias por mecanismos que aún no se conocen totalmente. Las metaloproteasas (MMPs) son enzimas proteolíticas involucradas en el desarrollo que pueden ser activadas en un entorno proinflamatorio. Objetivo: Analizar el efecto de tratamientos maternos con FOL y/o CAR sobre el estado oxidativo y la actividad de las MMPs en el embrión y la decidua de ratas sanas y diabéticas en día 10,5 de preñez. Métodos: Ratas sanas y diabéticas fueron tratadas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación con FOL (15 mg/kg) y/o CAR (6%, suplementación dietaria). Se dosaron isoprostanos y TBARS como índice del estado oxidativo y la actividad de las MMP2 y MMP9 por zimografía en embriones y deciduas. Resultados. Los embriones de ratas diabéticas mostraron un incremento en los niveles de isoprostanos ( $p < 0.01$ ) que se redujo con tratamientos con FOL y FOL+CAR (57%,  $p < 0.001$ ). TBARS se encontraron incrementados en la decidua de ratas diabéticas ( $p < 0.05$ ) y se redujeron con CAR, FOL y FOL+CAR (65%,  $p < 0.001$ ). En los embriones de ratas diabéticas la actividad de MMP2 y MMP9 se encontró incrementada ( $p < 0.05$ ) y CAR y FOL+CAR redujeron sus actividades (45-60%,  $p < 0.05$ ). La decidua de rata diabética mostró un incremento en la actividad de MMP2 y MMP9 ( $p < 0.001$ ) que se redujo con FOL+CAR (45%,  $p < 0.01$ ). La tasa de malformaciones

incrementada en las ratas diabéticas ( $p < 0.001$ ) se redujo con los tratamientos con FOL (62%,  $p < 0.05$ ), CAR (58%,  $p < 0.05$ ) y más aún con FOL+CAR (84%,  $p < 0.01$ ). Conclusiones. En los embriones y deciduas de ratas diabéticas los tratamientos con FOL y CAR reducen las malformaciones embrionarias y el mecanismo de acción involucraría la regulación del estado oxidativo y la actividad de MMPs.

**491. (197) EFECTO DEL NEUROESTEROIDE ALLOPREGNANOLONA SOBRE LA MORFO-FISIOLOGIA OVARICA DE LA RATA HEMBRA: POSIBLE INDUCTOR DE NUEVAS ENTIDADES QUISTICAS**

Chavez C.<sup>1</sup>; Bazzocchi V.<sup>2</sup>; Escudero C.<sup>3</sup>; Cabrera R.<sup>4</sup>; Laconi M.<sup>5</sup>  
INBIOMED-IMBECU-CONICET-Universidad de Mendoza<sup>1,2,3,4,5</sup>  
candemza@gmail.com

Allopregnanolona (Allo) es uno de los neuroesteroides más abundantes en el SNC. Se conoce que su concentración varía durante el ciclo estral, la preñez y situaciones de estrés. En trabajos previos demostramos que Allo induce inhibición de la ovulación y de la apoptosis en los cuerpos lúteos (CL). El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de una única dosis de Allo i.c.v en la rata hembra adulta en proestro, 24 hs posteriores a la administración, sobre: 1) la reactividad neuroendocrina expresada como la concentración sérica de Prolactina (PRL), Hormona Luteinizante (LH) y Progesterona (P4), 2) los cambios morfo-fisiológicos ováricos, mediante la evaluación histomorfométrica de estructuras ováricas, realizada por microscopía óptica y analizadores de imágenes, 3) variaciones metabólicas en la esteroidogénesis hipotalámica y ovárica, mediante la medición de la actividad de la enzima  $3\beta$  Hidroxiesteroide Deshidrogenasa ( $3\beta$  HSD). Los resultados obtenidos indicaron que la administración de Allo indujo: 1) un aumento significativo de los niveles de Pg ( $P < 0.001$ ) y PRL ( $P < 0.05$ ), y una disminución de los niveles de LH ( $P < 0.05$ ) con respecto al control, 2) la aparición de entidades quísticas (Q) con características citológicas semejantes a estructuras luteales. El número de folículos y CLs disminuyeron luego de la administración de Allo ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$ , respectivamente). No hubo diferencias significativas en las mediciones de los diámetros de CL y Q, y 3) un aumento de la actividad de la enzima  $3\beta$  HSD en ovario ( $P < 0.05$ ) y una disminución de la misma en HMB ( $P < 0.05$ ). En conclusión, la administración de una dosis única de Allo i.c.v induce modificaciones del eje neuroendócrino, las cuales impactan significativamente en la reactividad metabólica y celular a nivel ovárico. Este efecto agudo propone a los neuroesteroides como potentes modificadores de patrones biológicos reproductivos en la rata hembra.

**492. (179) EFECTO DEL EXCESO DE GRASAS SATURADAS EN LA DIETA MATERNA DE RATA SOBRE EL PERFIL LIPÍDICO Y LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE INSULINA Y LEPTINA EN PLACENTA E HÍGADO FETAL.**

Mazzucco M.<sup>1</sup>; Higa R.<sup>2</sup>; Martínez N.<sup>3</sup>; Jawerbaum A.<sup>4</sup>; White V.<sup>5</sup>  
CEFYBO-CONICET-UBA, Facultad de Medicina<sup>1,2,3,4,5</sup>  
m.bazzucco@yahoo.com.ar

En trabajos previos observamos macrosomía y placentomegalia así como hiperlipidemia en los fetos de ratas sometidas a una sobrecarga dietaria de grasas saturadas. La hiperleptinemia e hiperinsulinemia materna y fetal característica en estas ratas favorecen el crecimiento y podrían condicionar el metabolismo lipídico placentario y fetal. Objetivo: estudiar el efecto de una sobrecarga de grasas en la dieta materna sobre: 1) la expresión placentaria del receptor de leptina (ObR) y del receptor de Insulina (InsR), 2) la expresión de ObR en hígado fetal, 3) el perfil lipídico de los tejidos en estudio. Métodos: Ratas Wistar fueron alimentadas con dieta estándar (5% de lípidos) (grupo DS) o suplementada con un 25% de grasas saturadas (grupo DG), luego fueron apareadas con machos DS. La eutanasia se realizó en el día 21 de preñez. Se pesaron placentas, fetos y órganos fetales y se obtuvo plasma



fetal y materno. Se evaluó la expresión génica de ObR e InsR por PCR y el perfil lipídico por TLC. Resultados: La expresión de ObR fue menor en las placentas (20%  $p < 0,01$ ) y mayor en los hígados fetales (20%  $p < 0,05$ ) de las ratas DG en comparación con DS. La expresión placentaria de InsR mostró un aumento (35%  $p < 0,05$ ) en el grupo DG. Los niveles de colesterol, ésteres de colesterol, ácidos grasos libres y fosfolípidos no mostraron variaciones ni en placentas ni en hígados fetales al comparar los dos grupos, sin embargo se observó un incremento del 90% ( $p < 0,01$ ) en la acumulación de triglicéridos en el hígado fetal de las ratas DG. Conclusión: La hiperinsulinemia materna y fetal en combinación con la sobreexpresión de InsR en placenta, la expresión diferencial de ObR, y el exceso de lípidos maternos y fetales, estarían favoreciendo el excesivo crecimiento placentario observado en este modelo y la acumulación lipídica fetal hepática.

**493. (327) CAMBIOS EN EL ESTADO OXIDATIVO DEL TEJIDO TROFOBLÁSTICO-DECIDUAL DURANTE LA ORGANOGÉNESIS MURINA PROVOCADOS POR EL CONSUMO MATERNO DE ALCOHOL.**

Coll T.<sup>1</sup>; Chauhan G.<sup>2</sup>; Herrera C, Pérez Tito L.<sup>3</sup>; Ríos De Molina M.<sup>4</sup>; Cebral E.<sup>5</sup>

Laboratorio de Reproducción y Fisiopatología Materno-Embrionaria, DBBE - FCEYN - UBA, IFIBYNE - CONICET<sup>1 3 5</sup>; Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo, FCEN-UBA, CONICET<sup>2 4</sup>  
tamycoll@gmail.com

La ingesta perigestacional de alcohol induce anomalías embrionarias y afecta el tejido trofoblástico-decidual (T-D) durante la organogénesis. Si bien diversas moléculas, como el óxido nítrico (NO) y las especies reactivas del oxígeno, regulan la interacción materno-fetal, sus desbalances pueden conducir a un aumento de estrés oxidativo en el entorno materno. Con el fin de estudiar el efecto de la exposición materna a alcohol sobre el estado oxidativo del tejido T-D y la potencial asociación con la dismorfogénesis embrionaria, evaluamos las alteraciones en los niveles de Nitritos (NO<sub>2</sub>) (Reacción de Griess), de malondialdehído (MDA), de glutatión (GSH), de actividad Catalasa (CAT), de superóxido dismutasa (SOD) y de glutatión peroxidasa (GST). Se administró 10% de etanol en el agua de bebida a hembras murinas CF-1, 15 días antes de la preñez y hasta el día 10 de gestación (HT). Las hembras controles (HC) recibieron agua. Se extrajo el tejido T-D y se evaluó la diferenciación y la morfología embrionaria. El tejido T-D de las HT presentó aumento en el contenido de GSH (34% del control,  $p < 0,001$ ), de MDA (16% del control,  $p < 0,001$ ) y de NO<sub>2</sub> (24% del control,  $p < 0,05$ ). Los valores control de GSH, de MDA y de NO<sub>2</sub> fueron:  $0,0195 \pm 0,00201$  nmol/mg tej.,  $0,052 \pm 0,0096$  nmol/mg tej. y  $0,77 \pm 0,18$   $\mu$ mol/mg tej., respectivamente. La actividad CAT mostró una tendencia al aumento, aunque no significativa (HC:  $21,4 \pm 4,2$  vs HT:  $24,4 \pm 3,9$  U/mg tej.). En conclusión, la exposición murina perigestacional a alcohol hasta la organogénesis produjo estrés oxidativo moderado en el tejido decidual, incrementando la lipoperoxidación, los niveles de NO<sub>2</sub> y afectando la respuesta primaria de las defensas antioxidantes (GSH), sugiriendo que la dismorfogénesis embrionaria hallada podría relacionarse con alteración del estado oxidativo materno por exposición a alcohol en la mitad de la gestación.

**494. (384) DISFUNCIONES OVÁRICAS PRODUCIDAS POR LA EXPOSICIÓN PERINATAL (PRENATAL/POSTNATAL) A BISFENOL A (BPA) POR VÍA ORAL**

Santamaría C.<sup>1</sup>; Durando M.<sup>2</sup>; Jacob A.<sup>3</sup>; Abud J.<sup>4</sup>; Muñoz De Toro M.<sup>5</sup>; Luque E.<sup>6</sup>; Rodríguez H.<sup>7</sup>

Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>

clarisa\_santamaria@hotmail.com

Previamente demostramos que la exposición perinatal de ratas hembras Wistar a BPA altera el desarrollo folicular en la vida adulta y la sobrevida de los embriones implantados. El ob-

jetivo del presente trabajo es evaluar si estas alteraciones en la fertilidad de las hembras inducidas por el BPA están asociadas a otras disfunciones ováricas adicionales. Ratas Wistar preñadas fueron tratadas por vía oral desde el día 9 de gestación hasta el día posnatal 21 (DPN21) con 50  $\mu$ g/kg-día (BPA50), 0,5  $\mu$ g/kg-día (BPA0.5) o vehículo (Control). En el DPN90 ( $n=8$ ) se obtuvieron los ovarios y en cortes seriados se evaluó por inmunohistoquímica la expresión de receptor de estrógenos alfa (RE $\alpha$ ), y beta (RE $\beta$ ), de andrógenos (RA) y p27 (inhibidor de cdk asociado a activación folicular e inducción de atresia). A un grupo de hembras controles y de BPA50 se les realizó un tratamiento superovulatorio (SO), obteniéndose los ovarios a las 7 horas post-hCG. En cortes seriados se cuantificó el número de folículos antrales (FA) totales, sanos y atrésicos. A un grupo de crías de madres no tratadas se le extrajeron los ovarios en DPN0 para cultivo del órgano entero, expuestos a estradiol (E1:10-4M), BPA (10-3M) o medio basal (control). A los 7 días se evaluó el porcentaje de folículos no ensamblados (%FNE). RE $\alpha$ , RE $\beta$  y p27 no presentaron cambios en respuesta al BPA mientras que RA disminuyó en los folículos de BPA50 (primarios, preantrales y antrales) y BPA0.5 (primordiales y primarios). Se observó un menor número de FA totales y sanos en BPA50 en las hembras SO, mientras que los ovarios expuestos in vitro a E1 o BPA mostraron un mayor %FNE. Los resultados demuestran que la exposición perinatal por vía oral a dosis de BPA definidas como seguras altera la expresión de RA en el ovario y altera la respuesta per se de los folículos a gonadotropinas. Los resultados in vitro nos permiten concluir que el efecto del BPA sobre el ensamblado folicular es independiente del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

**495. (391) FIBRONECTINA (FN) Y ANANDAMIDA (AEA) INDUCEN LA CAPACITACIÓN DE ESPERMATOZOIDEOS HUMANOS**

Martínez E.<sup>1</sup>; Osycka-salut C.<sup>2</sup>; Morales P.<sup>3</sup>; Perez-martínez S.<sup>4</sup>; Díaz E.<sup>5</sup>

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile<sup>1 3 5</sup>; Laboratorio Biología de la Reproducción en Mamíferos-CEFYBO/CONICET<sup>2 4</sup>  
eduardo.martinez@uantof.cl

Se sabe que moléculas presentes en el fluido oviductal participan en la regulación de la capacitación espermática dentro del oviducto, y que AEA y Fn son sintetizadas por las células epiteliales oviductales de diferentes mamíferos. Recientemente se ha demostrado que la AEA, en concentraciones nanomolares, induce la capacitación espermática en bovinos. Por otro lado, hemos demostrado que se producen cambios en la exposición de integrinas que unen Fn en la membrana plasmática de los espermatozoides humanos durante la capacitación. Existen trabajos en la literatura que demuestran la activación del sistema endocannabinoide por Fn y la interacción entre integrinas y los componentes del sistema endocannabinoide. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de Fn y AEA durante la capacitación de espermatozoides humanos, y observar si existe interacción entre sus vías de acción. Para ello, alícuotas de espermatozoides móviles, seleccionados por Percoll, fueron capacitados por diferentes tiempos (0, 1, 3, 5 y 18 hrs) en las siguientes condiciones: 1) Medio no capacitante (MNC) 2) Medio capacitante reconstituido (MCR) 3) MCR + Met-AEA 1,4 nM 4) MCR + Fn 100  $\mu$ g/ml 5) MCR + Met-AEA + Fn. Luego los espermatozoides capacitados fueron evaluados mediante la técnica de Clortetraciclina (CTC). Además, se evaluó el grado de fosforilación de proteínas en residuos tirosina (p-Tyr) en espermatozoides capacitados por 0, 1 y 5 horas mediante Western blot. Los resultados indican que tanto Met-AEA como Fn inducen un aumento significativo en el patrón de espermatozoides capacitados a lo largo del tiempo ( $p < 0,05$ ) que coincide con un incremento en el grado de p-Tyr en espermatozoides a partir de la hora cero. Sin embargo, la co-incubación de Met-AEA y Fn no produjo un aumento del patrón de espermatozoides capacitados, sugiriendo una posible modulación de una de las vías sobre la otra. Fondecyt 11070051 y Fondecyt 1080028

## GASTROENTEROLOGÍA 2

### 496. (66) BIOSÍNTESIS DE 15N-UREA INDUCIDA POR GLUCAGON EN HEPATOCITOS DE RATA CON KNOCKDOWN DE AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL.

Soria L.<sup>1</sup>; Taborda D.<sup>2</sup>; Marinelli R.<sup>3</sup>  
*Instituto de Fisiología Experimental IFISE/CONICET<sup>1 2 3</sup>*  
*ele0ese@hotmail.com*

La destoxificación del amoníaco ocurre en el hígado, principalmente a nivel mitocondrial por ureagénesis. Estudios previos, en animal entero y cultivo primario de hepatocitos, sugieren que la Aquaporina-8 mitocondrial (mtAQP8) facilitaría la difusión del amoníaco abasteciendo el ciclo de la urea. Objetivo: evaluar la producción de 15N-Urea a partir de 15NH<sub>4</sub>Cl en hepatocitos con knockdown de mtAQP8. Metodología y Resultados: Hepatocitos controles y con expresión disminuida de mtAQP8 (-80 ± 10 %; p < 0,05; n=4) fueron incubados con 15NH<sub>4</sub>Cl (1 mM) y estimulados a sintetizar urea al ser expuestos a la hormona glucagon (1 µM) por 4 h. La aparición de 15N-Urea se determinó por Resonancia Magnética Nuclear. Los hepatocitos con knockdown de mtAQP8 mostraron una disminución significativa (-85 ± 2 %; p < 0,05; n=4) en la inducción de la síntesis de 15N-urea estimulada por glucagon. Por otro lado, el knockdown de mtAQP8 no alteró significativamente la expresión de las enzimas mitocondriales del ciclo de la urea: CPS1 y OTC, ni de la ATP sintetasa mitocondrial. El contenido de ATP celular se mantuvo estable entre los grupos en estudio. Tampoco resultó comprometida la viabilidad celular, evaluada por determinación de la actividad succinato deshidrogenasa mitocondrial (ensayo MTT), así como por la liberación de la enzima citosólica LDH. Conclusión: La disminución en la biosíntesis de 15N-Urea en hepatocitos con knockdown de mtAQP8 representa una evidencia directa que vincula a la AQP8 como transportador mitocondrial de amoníaco en el proceso de ureagénesis hepática.

### 497. (77) EL KNOCKDOWN DE AQUAPORINA-8 MITOCONDRIAL DISMINUYE LA LIBERACIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO, INDUCIENDO DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y MUERTE EN CÉLULAS HEPG2

Marchissio M.<sup>1</sup>; Francés D.<sup>2</sup>; Carnovale C.<sup>3</sup>; Marinelli R.<sup>4</sup>  
*Instituto de fisiología experimental - CONICET - UNR<sup>1 2 3 4</sup>*  
*mjuliam17@yahoo.com*

La aquaporina-8 (AQP8) humana tiene alta permeabilidad al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se expresa en la membrana interna mitocondrial del hepatocito; así, hipotetizamos que una expresión defectiva de AQP8 mitocondrial (mtAQP8) afectaría la normal liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causando disfunción mitocondrial y muerte celular. En nuestro modelo de knockdown de mtAQP8 por ARN de interferencia en células HepG2 derivadas de hepatoma humano, encontramos previamente una acumulación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en mitocondrias, además de una marcada disipación del potencial de membrana mitocondrial y pérdida de la viabilidad celular. A fin de avanzar en estos estudios, evaluamos el estado de la liberación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido en las mitocondrias utilizando la técnica de Amplex Red-HRP en mitocondrias aisladas. Las mitocondrias con reducida expresión de mtAQP8 mostraron una significativa disminución de la liberación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (-60%, p < 0,05), sin cambios en su producción. Por otro lado, el pre-tratamiento de las células con knockdown de mtAQP8 con el inhibidor del poro de transición mitocondrial, ciclosporina A, previno totalmente la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y de la viabilidad celular previamente observados. Al analizar la vía mitocondrial de muerte celular por apoptosis no se observó translocación de Bax a mitocondria, tampoco cambios en su relación con BclXL en esa organela, ni liberación de citocromo c al citosol por la técnica de inmunoblotting. Lo mismo ocurrió con Caspasa-3 respecto de su activación y actividad enzimática. Estos resultados sugieren que el knockdown de mtAQP8 en células HepG2 disminuye la normal liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial, causando disfunción de dicha organela a través del mecanismo del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la pérdida de viabilidad de células HepG2 por un mecanismo primario de muerte celular no apoptótico.

### 498. (176) CAMBIOS MORFOLÓGICOS NEURONALES EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ENCEFALOPATÍA HEPÁTICA MÍNIMA

Tallis S.<sup>1</sup>; Caltana L.<sup>2</sup>; Aronne M.<sup>3</sup>; Delfante A.<sup>4</sup>; Souto P.<sup>5</sup>; Brusco A.<sup>6</sup>; Perazzo J.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Encefalopatía Hepática, FFyB, UBA<sup>1 4 5 7</sup>*  
*Instituto de Biología Celular y Neurociencias, Facultad de Medicina, UBA<sup>2 3 6</sup>*  
*silvinatallis@yahoo.com.ar*

La Encefalopatía Hepática es un síndrome neuropsiquiátrico complejo, consecuencia de la falla hepática aguda o crónica. Su patogénesis no es clara pero se sabe que el amonio juega un rol principal en su desarrollo. Se han documentado alteraciones morfológicas en el Sistema Nervioso Central a nivel de la glia, particularmente en astrocitos, pero poco se sabe del efecto tóxico del amonio a nivel neuronal. Un modelo validado de Encefalopatía Hepática Mínima (EHM) es la inducida por la ligadura parcial de la vena porta, cuya su característica más relevante es la hiperamonemia. El objetivo del presente trabajo fue estudiar cambios morfológicos en neuronas de hipocampo y corteza en un modelo de EHM. Se utilizaron ratas Wistar macho adultas las cuales fueron divididas en dos grupos (n=10), EHM por ligadura parcial de la vena porta y Sham a las cuales se le practicó una operación simulada. Diez días post cirugía un pool de animales fue anestesiado para la determinación de la presión portal y la medición de amonemia. Otro grupo de animales se fijó por perfusión intracardiaca para el procesamiento histológico de los cerebros. Para evaluar la citoarquitectura general se realizó la coloración de Nissl y para estudios por inmunohistoquímica se utilizaron los marcadores neuronales NeuN (specific nuclear neuronal marker), MAP-2 (microtubule associated protein-2) y Nf-200 (specific intermediate filaments of neurons). El modelo de EHM cursa con un aumento significativo de la presión portal en mmHg (12,0±0,4 vs 8,5±0,2; p<0,0001) y de la concentración de amonio plasmático en µM (41,28±4,9 vs 14,25±0,9; p<0,0001). Se observó de una disminución significativa del área relativa de dendritas con p<0,001 en hipocampo y p<0,0001 en corteza y de neurofilamentos con p<0,01 tanto en hipocampo como en corteza respecto al grupo Sham sin variar el número de células por área estudiada en las zonas evaluadas. El modelo de EHM cursa con alteraciones morfológicas relacionadas con la estructura neuronal.

### 499. (230) PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA DE ACTIVACIÓN-1 (AP-1) EN LA INDUCCIÓN DE LA PROTEÍNA ASOCIADA A RESISTENCIA A MULTIDROGAS 3 (MRP3) POR ETINILESTRADIOL (EE) EN CÉLULAS HEPG2.

Ruiz M.<sup>1</sup>; Rigalli J.<sup>2</sup>; Arias A.<sup>3</sup>; Villanueva S.<sup>4</sup>; Banchio C.<sup>5</sup>; Mottino A.<sup>6</sup>; Catania V.<sup>7</sup>  
*Instituto de Fisiología Experimental (IFISE-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>1 2 3 4 6 7</sup>*  
*Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>5</sup>*  
*mlaura\_ruiz@hotmail.com*

Hemos demostrado que el transportador hepático basolateral de endo y xenobióticos conjugados, MRP3, se induce por EE sólo en presencia del receptor de estrógenos-α (ER-α). ER-α activado por ligando puede regular la expresión génica directamente uniéndose a sitios ERE (Estrogen Response Elements) en el promotor del gen diana, o indirectamente a través de su interacción con factores de transcripción como Ap-1 o Sp1. Considerando que un análisis in silico de la región promotora de MRP3 no reveló la presencia de sitios ERE pero identificó sitios de unión a los factores AP-1 y Sp1, nos propusimos evaluar la participación de estos factores de transcripción en la inducción de MRP3 por EE. Células HepG2 se co-transfectaron con los cDNA codificantes para c-jun y c-fos (miembros de la familia AP-1) o para Sp1 junto con el ER-α, o con sus respectivos vectores vacíos y se incubaron con EE (50 µM, 48 h). La expresión proteica de MRP3 se evaluó por western blotting en lisados

celulares totales. Se observó que la sobre-expresión de Ap-1 induce un aumento en la expresión de MRP3 (250%  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) sólo al co-transfectarse con ER- $\alpha$ . El tratamiento con EE no modificó esta respuesta, indicando no aditividad respecto de la sobre-expresión de AP-1. La sobre-expresión de Sp1 no influyó en la expresión de MRP3. Estos resultados sugieren que EE actuaría aumentando la expresión de alguno de los miembros de Ap-1 y de esta manera induciendo la expresión de MRP3. Para corroborar esta hipótesis, células HepG2 ER- $\alpha$  (+) se incubaron con EE (50  $\mu\text{M}$ ) y se evaluó por western blotting la expresión de c-Jun y c-Fos en extractos nucleares. Se observó que EE sólo incrementa los niveles proteicos de c-Jun (500%,  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ), sin modificar la proporción c-Jun fosforilada:c-Jun total. Conclusión: Ap-1 sería el mediador clave en la inducción de MRP3 por EE. Un aumento de expresión de su componente c-Jun y presencia simultánea de ER- $\alpha$ , con quien podría interactuar, serían la explicación más probable.

**500. (270) EL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS (RE) PARTICIPA EN LA COLESTASIS POR ESTRADIOL-17 $\beta$ -D-GLUCURÓNIDO (E17G) EN HÍGADO AISLADO Y PERFUNDIDO DE RATA (HAPR).**

Barosso I.<sup>1</sup>; Zucchetti A.<sup>2</sup>; Ochoa J.<sup>3</sup>; Crocenzi F.<sup>4</sup>; Sánchez Pozzi E.<sup>5</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
barosso@ifise-conicet.gov.ar

La activación del RE media efectos del estradiol tales como la activación de las quinasas de señalización PKC y PI3K. Dado que estas quinasas participan en la colestasis por E17G, se estudió la participación del RE en este modelo de colestasis. Previamente, demostramos que el bloqueo de RE protege de la colestasis por E17G en duplas aisladas de hepatocitos de ratas (J Hepatol 50 S103, 2009), por lo que se evaluó el rol del RE en un modelo más fisiológico como el HAPR. Hígados de ratas Wistar hembra se aislaron y perfundieron (método de Brauer), se agregaron al perfusato taurocolato (5 $\mu\text{M}$ , sustrato de Bsep) y clorodinitrobenzoceno (0,5 $\mu\text{M}$ , transformado intrahepáticamente en dinitrofenilglutacion [DNPG] sustrato de Mrp2). Luego de 20 min de estabilización, se agregó ICI182780 (ICI, 0,5 $\mu\text{M}$ , antagonista de RE) o solvente (DMSO 370 $\mu\text{l/L}$ ) y se recolectó bilis basal durante un período de 15 min cada 5 min. El HAPR se consideró funcional cuando el flujo biliar (FB) basal fue mayor de 15  $\mu\text{l/min/Kg}$  de peso corporal. Luego se administró E17G (2  $\mu\text{mol/hígado}$ , intraportal), se recolectó bilis cada 5 min durante 1 h y se determinaron: FB (gravimetría), concentración de sales biliares (SB, método de la 3- $\alpha$  hidroxisteroide deshidrogenasa) y concentración de DNPG (HPLC). Se calcularon las velocidades de excreción de SB y DNPG, y los datos se relativizaron con respecto a los obtenidos antes del agregado de E17G. ICI produjo una protección parcial del pico colestásico, 5 y 10 min luego de administrado E17G y una recuperación del FB al valor del control a partir de los 15 min. Similarmente, protegió la disminución en la excreción de SB y DNPG luego de administrado E17G. ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ). El bloqueo del RE protege de la colestasis por E17G en un modelo in vivo, confirmando el rol del RE en esta patología, lo que permitiría ampliar los blancos terapéuticos para diseñar nuevos tratamientos de la colestasis por estrógenos.

**501. (428) EFECTO DE LA INTOXICACIÓN AGUDA POR PARACETAMOL (AP) SOBRE LA EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR HEPÁTICA DE LA GLICERALDEHIDO 3 FOSFODESHIDROGENASA (GAPDH) EN RATAS.**

Delfante A.<sup>1</sup>; Di Carlo M.<sup>2</sup>; Perazzo J.<sup>3</sup>; Mottino A.<sup>4</sup>; Ghanem C.<sup>5</sup>

*Cátedra de Fisiopatología FFyB, ININFA UBA-CONICET<sup>1 3 5</sup>; Lab.Gastroenterología y Enzimología Clínica-Dpto. Bioquímica Clínica, FFyB –UBA<sup>2</sup>; IFISE, CONICET-UNR<sup>4</sup> a.e.delfante@gmail.com*

Introducción: La intoxicación por AP produce necrosis centrolbulillar hepática. Aunque también se observa apoptosis, su

rol en la intoxicación es discutido. La enzima glicolítica GAPDH, muy usada como 'housekeeping gene' en estudios de expresión, se relacionó recientemente con diferentes funciones (Ej. apoptosis y reparación y preservación del ADN) dependiendo de su localización subcelular. El objetivo del presente trabajo es evaluar si la intoxicación aguda por AP modifica los niveles y la redistribución subcelular de GAPDH en hígado de ratas. Métodos: Se usaron dos grupos de ratas adultas Wistar machos. AP: recibieron una dosis única de AP (1g/Kg, i.p). Control (C): recibieron solo vehículo. A las 24 h se midió ASAT en plasma y se realizó histopatología hepática. Se estudio la expresión hepática del ARNm y proteína de GAPDH por Northern y Western blot en homogenado total. Luego se determinó su concentración subcelular en fracciones nuclear, mitocondrial y citoplasmática obtenidas mediante centrifugación diferencial. Los resultados se expresaron como media $\pm$ DS ( $n = 4$ ) y se analizaron por Student t test (\*  $p < 0.05$  vs C). Resultados: El AP incrementó en 3,5\* veces los niveles de ASAT, confirmándose necrosis hepática por histología. El ARNm de GAPDH se incrementó por AP (246 $\pm$ 30\*; C: 100 $\pm$ 36), al igual que la cantidad de proteína GAPDH en el homogenado total (AP: 292 $\pm$ 127\*; C: 100 $\pm$ 7). Cuando se estudiaron las fracciones subcelulares se observó un aumento de GAPDH intranuclear en el grupo AP (232 $\pm$ 95\*; C: 100 $\pm$ 49) sin observarse diferencias en el compartimiento mitocondrial y en citosol. Conclusiones: La intoxicación aguda por AP induce la expresión proteica de GAPDH por un mecanismo transcripcional. Esta inducción se relaciona con un incremento en la translocación intracelular de la proteína al núcleo, pudiendo estar asociado con procesos pro-apoptóticos. Los resultados cuestionan el uso de GAPDH como 'housekeeping gene' en estudios de expresión que involucran al paracetamol.

**502. (454) PROTEINA QUINASA ACTIVADA POR MITOGENOS (MAPK) DEL TIPO P38 Y ERK1/2 COPARTICIPAN EN LA ALTERACION SECRETORA BILIAR INDUCIDA POR ESTRADIOL 17 $\beta$ -GLUCURONIDO (E).**

Boaglio A.<sup>1</sup>; Toledo F.<sup>2</sup>; Barroso I.<sup>3</sup>; Zucchetti A.<sup>4</sup>; Sanchez Pozzi E.<sup>5</sup>; Crocenzi F.<sup>6</sup>; Roma M.<sup>7</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental IFISE CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
andyboa@hotmail.com

E induce colestasis vía activación de PKC $\alpha$  y PI3K. Ya que ambas quinasas pueden activar MAPK, indagamos en hígado aislado y perfundido de rata (HAPR) si p38 y Erk1/2 participan en las alteraciones inducidas por E en la función y localización de los transportadores canaliculares responsables de la formación de bilis Mrp2 y Bsep. E (2  $\mu\text{mol/híg}$ ) redujo significativamente el flujo biliar (-69 $\pm$ 14%,  $p < 0.001$ ). El inhibidor de p38 SB203580 (SB; 250 nM) previno significativamente esta caída (+126 $\pm$ 18%;  $p < 0.001$ ), mientras que el inhibidor de ERK1/2 PD98059 (PD; 5 $\mu\text{M}$ ) aceleró la recuperación del flujo biliar. Inmunomarcación seguida de microscopía confocal reveló que E indujo internalización de Bsep y Mrp2, y que el pretratamiento con SB o PD previno significativamente estas alteraciones. Evaluamos también la aditividad entre PI3K-MAPK, PKC $\alpha$ -MAPK y Erk 1/2-p38 en duplas aisladas de hepatocitos de rata (DAHRs; >200 duplas/grupo,  $n = 3-4$ ). E (200  $\mu\text{M}$ ) disminuyó al 36 $\pm$ 3% del control ( $p < 0.01$ ) la acumulación canalicular (AC) de CLF, sustrato fluorescente de Bsep. PD (5 mM) y SB (1  $\mu\text{M}$ ), junto con el inhibidor de PKC $\alpha$  Gö6976 (Gö, 1 $\mu\text{M}$ ) o de PI3K wortmanina (WM, 100nM), previnieron parcialmente la disminución de la AC de CLF (E+PD+WM: 63 $\pm$ 2%; E+SB+WM: 57 $\pm$ 3%; E+PD+Gö6976: 64 $\pm$ 0,7%; E+SB+Gö6976: 63 $\pm$ 2%;  $p < 0.05$ ); estos valores fueron similares a los de los grupos solo tratados individualmente con cada inhibidor de MAPK (E+PD: 57 $\pm$ 2, E+SB :56 $\pm$ 1;  $p < 0.05$ ). En cambio, la co-administración de PD y SB resultó en mayor protección (E+PD+SB: 77 $\pm$ 2%;  $p < 0.05$ ), sugiriendo efectos complementarios de p38 y Erk1/2. Las variaciones en la AC de GS-MF, sustrato fluorescente de Mrp2, fueron similares a las de CLF. Concluimos que las MAPK p38 y Erk1/2 participan en la colestasis inducida por E como vías independientes y complementarias, lo cual explica sus efectos diferenciales sobre el flujo biliar (inducción de colestasis vs. inhibición de su recuperación). Ambas vías son sin embargo dependientes de PKC $\alpha$  y PI3K.

## ONCOLOGÍA 7

**503. (297) VÍA CANÓNICA DE WNT: ESTADO DE ACTIVACIÓN Y FUNCIONALIDAD EN CÉLULAS TUMORALES MAMARIAS MURINAS QUE REEXPRESAN GLIPICANO-3 (GPC3)**Lago Huvelle M.<sup>1</sup>; Romero S.<sup>2</sup>; Buchanan C.<sup>3</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>4</sup>; Peters M.<sup>5</sup>*Instituto de Oncología Angel Roffo, Area de Investigación<sup>1 2 3 4 5</sup>  
mariamparo86@gmail.com*

GPC3 es un proteoglicano que desaparece en tumores mamarios. Previamente demostramos que su reexpresión inhibe la capacidad metastásica del adenocarcinoma mamario murino LM3 in vivo, asociado a una menor motilidad y mayor agregación, y a un aumento de la senescencia y la apoptosis in vitro. Demostramos también que la vía Wnt canónica se encuentra inhibida en las células LM3-GPC3. Nos propusimos revalidar la inhibición de la vía Wnt canónica en las células LM3-GPC3, e investigar si las diferencias en el comportamiento celular son debidas a la regulación de GPC3 sobre esta vía. Mediante WB establecimos que las células LM3-GPC3 presentan entre 5-10 veces menos GSK3B fosforilada. Empleando fraccionamiento celular y WB determinamos que estas células tienen 20% menos de B-Catenina en la fracción citoplasma/membrana. Por IF, observamos a B-Catenina localizada próxima a membrana, con escasa tinción citoplasmática y nuclear. Para determinar si los fenómenos modulados por GPC3 están relacionados con la vía Wnt canónica, tratamos las células con el activador LiCl (o NaCl como control). El LiCl aumenta 10 veces la fosforilación de GSK3B con respecto a las células LM3-GPC3 +NaCl, e induce un aumento de B-Catenina citoplasmática y nuclear. Confirmamos que el LiCl revierte parcialmente la senescencia inducida por GPC3 (Células senescentes X-gal positivas: LM3-GPC3+NaCl=85% vs +LiCl=65%, p<0,05), sin efecto sobre la apoptosis (ns). Vimos en ensayos de cicatrización de heridas, que las células LM3-GPC3 +LiCl recuperan su capacidad de migrar (Cobertura de la herida: LM3-GPC3+NaCl=15% vs +LiCl=75%, p<0,05). Finalmente, el tratamiento con LiCl redujo la agregación homotípica de las células LM3-GPC3, alcanzando niveles similares a LM3-vector (p<0,05). En resumen, confirmamos mediante un nuevo enfoque metodológico que GPC3 inhibe la señalización Wnt canónica y demostramos que mediante esta inhibición GPC3 estaría modulando senescencia, migración y agregación celular.

**504. (323) BRCA1 Y P53 TIENEN UN EFECTO SINÉRGICO EN LA RESPUESTA AL DAÑO EN EL ADN EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA**De Luca P.<sup>1</sup>; Moiola C.<sup>2</sup>; Zalazar F.<sup>3</sup>; Vazquez E.<sup>4</sup>; De Siervi A.<sup>5</sup>*Laboratorio de Apoptosis y Cáncer - Dpto de Química Biológica - FCEN - UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
paoladeluca81@yahoo.com.ar*

Mutaciones germinales en el gen de susceptibilidad al cáncer de mama (BRCA1) confieren predisposición al cáncer de mama, ovario y se asocian a un peor pronóstico del cáncer de próstata (PCa). Previamente identificamos a GADD153 como uno de los blancos de BRCA1 que media el aumento de la sensibilidad a la doxorubicina en células de PCa que carecen de p53. Luego del daño en el ADN, BRCA1 se asocia e induce al promotor de GADD153, aumentando la apoptosis y el arresto del ciclo celular. Debido a que p53 es un blanco importante en las terapias antitumorales, en este trabajo estudiamos el efecto de este supresor tumoral en la regulación de la transcripción de GADD153. Encontramos que el tratamiento con doxorubicina aumentó la transcripción de GADD153 en células PC3. Sin embargo, la reconstitución de la expresión de p53 en forma estable en estas células, eliminó esta respuesta. Asimismo, en la línea tumoral LNCaP que expresa p53 wild type se observó el mismo efecto. La disminución en la expresión de BRCA1 con un shRNA BRCA1 disminuyó la transcripción de GADD153, en ambas líneas celulares. Mediante ChIP observamos que BRCA1 se asocia al promotor de GADD153 luego del daño en el ADN aun en presencia de p53.

Para dilucidar el efecto de la co-expresión de BRCA1 y p53 en la respuesta al daño en el ADN, estudiamos la transcripción de distintos genes blanco de estas proteínas. Comprobamos que BRCA1 moduló la expresión de genes blanco de p53 como por ejemplo ciclina D1 y SFN, observándose un aumento sinérgico del efecto en presencia de p53. Estos resultados proponen un nuevo mecanismo de regulación transcripcional en los tumores que expresan BRCA1 y p53. BRCA1 regula la transcripción de genes específicos induciendo apoptosis, pero en presencia de p53 estos efectos se ven potenciados. Por lo tanto los tumores de pacientes con mutaciones en p53 y BRCA1 serían más resistentes a agentes quimioterapéuticos lo cual debería considerarse en el momento de decidir una terapia efectiva.

**505. (453) ESTUDIO DE LOS EFECTOS ANTITUMORALES DE UN NUEVO ANÁLOGO DEL CALCITRIOL.**Salomón D.<sup>1</sup>; Fermento M.<sup>2</sup>; Ferronato M.<sup>3</sup>; Mascaró E.<sup>4</sup>; Vitale C.<sup>5</sup>; Fall Y.<sup>6</sup>; Facchinetti M.<sup>7</sup>; Curino A.<sup>8</sup>*Laboratorio de Biología del Cáncer, Instituto de Investigaciones Bioquímicas Bahía Blanca (INIBIBB-CONICET)<sup>1 2 3 7 8</sup>; Laboratorio de Química Orgánica, Departamento de Química, UNS<sup>4 5</sup>; Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Vigo, España<sup>6</sup>  
dsalomon@criba.edu.ar*

El calcitriol tiene importantes efectos antineoplásicos pero su actividad hipercalcemiente disminuye su potencialidad terapéutica. En conjunto con laboratorios de Química Orgánica sintetizamos un nuevo análogo denominado C10, con el fin de mantener los efectos antitumorales y disminuir la actividad calcemiente. Resultados que publicamos recientemente muestran los potentes efectos antiproliferativos de C10 en varias líneas de cáncer y la ausencia de actividad calcemiente. Posteriormente se comenzó a dilucidar los mecanismos celulares y moleculares de acción y a profundizar los estudios de los efectos antitumorales del C10 en modelos animales. Primero se evaluó la participación del receptor VDR en los efectos sobre la supervivencia celular. El silenciamiento del receptor previo al tratamiento con C10 no alteró los efectos del análogo sobre la supervivencia celular. Posteriormente, se estudió la expresión de distintas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular. En la línea T98G, el C10 induce un aumento de p21 y p27, disminuye la expresión de ciclina D1, de c-Jun y no altera los niveles de p53. También, se investigó la modulación de las vías Akt/PKB y MAP quinasas, observando una disminución de los niveles de p-Akt y no de p-Erk. También se observó un aumento de p27 en las líneas T47D y LM05e. El estudio del efecto de C10 sobre otros procesos celulares mostró que el tratamiento con C10 disminuye la migración celular en las T98G. Ensayos preliminares en un modelo animal de carcinoma mamario mostraron una tendencia en la reducción del tamaño y peso tumoral con el tratamiento con C10. En conclusión, el C10 ejerce una importante actividad antitumoral a través de un aumento de los niveles de p21 y p27, y de una disminución de ciclina D1 y de p-Akt. Por lo tanto el C10 ejercería su efecto sobre la supervivencia celular a través de la regulación de vías rápidas o no genómicas, independientemente del VDR.

**506. (385) INFLUENCIA DEL TAMOXIFENO Y DE FACTORES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL SOBRE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS CON CARACTERÍSTICAS STEM EN MODELOS DE CÁNCER DE MAMA**Raffo D.<sup>1</sup>; Sampayo R.<sup>2</sup>; Bal De Kier Joffé E.<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. La terapia con tamoxifeno (TAM) es la más utilizada actualmente. Sin embargo, un alto número de pacientes desarrolla resistencia. Se propone que las células stem son capaces de dar lugar a las distintas poblaciones celulares que normalmente se encuentran en el tejido tumoral y podrían ser iniciadoras de su desarrollo en el tejido mamario. Demostramos que factores del microambiente tumoral como la laminina y fibronectina tienen

influencia sobre la resistencia al TAM. El objetivo de este trabajo fue estudiar en modelos de cáncer de mama murino (M05) y humano (MCF-7) los cambios que se generan en las poblaciones stem como consecuencia de la terapia endócrina y por la exposición a factores del microambiente tumoral. Para evaluar los cambios en las poblaciones stem tanto in vivo como in vitro se utilizaron ensayos de mamíferas. In vivo se observó que el tratamiento de ratones portadores de tumores MO5 con TAM resulta en un aumento significativo en el porcentaje de células stem ( $n=2$ ,  $P<0,05$ ). Además estos tumores fueron pasados a nuevos ratones sin tratamiento y se demostró que mantuvieron esta población aumentada ( $P<0,01$ ,  $n=2$ ). In vitro el tratamiento por 5 días seleccionó hasta un 40 % de las células en ambas líneas celulares y la población residual tuvo un mayor porcentaje de células stem ( $P<0,05$ ,  $n=3$ ). El tratamiento con elementos del microambiente tumoral in vitro durante 2 días resultó en una disminución del porcentaje de células stem tanto para la laminina, fibronectina o medio condicionado de fibroblastos ( $P<0,01$ ,  $n=3$ ), y este cambio se mantuvo aún una semana después de interrumpido el tratamiento ( $P<0,01$ ,  $n=2$ ). De estos resultados se deduce que existe una clara interacción entre el microambiente tumoral y el control de las poblaciones stem y que estas además, tienen una menor susceptibilidad a la terapia endocrina.

**507. (559) ESTUDIO PRECLÍNICO DE NUEVOS COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA GTPASA RAC1 COMO AGENTES PARA EL TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Cardama G.<sup>1</sup>; Gonzalez N.<sup>2</sup>; Comin M.<sup>3</sup>; Hornos L.<sup>4</sup>; Alonso D.<sup>5</sup>; Gomez D.<sup>6</sup>; Lorenzano Menna P.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ<sup>1 2 5 6 7</sup>; Centro Investigación y Desarrollo en Química, Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI)<sup>3 4</sup>  
 gcardama@gmail.com*

Las Rho GTPasas funcionan como interruptores moleculares, ciclando entre un estado inactivo unido a GDP o un estado activo unido a GTP. Sólo en su estado activo, estas proteínas son capaces de interactuar con las proteínas efectoras. Las Rho GTPasas regulan múltiples procesos que pueden afectar la progresión tumoral. En particular, la Rho GTPasa Rac1 y sus reguladores son esenciales para la migración e invasión de células de glioblastoma multiforme (GBM), la neoplasia de cerebro más agresiva y frecuente en adultos. Si bien Rac1 no se encuentra mutado, la sobreexpresión de diferentes activadores (GEFs) promueve la hiperactivación de la GTPasa. Considerando que Rac1 es un blanco molecular prometedor para el desarrollo de estrategias terapéuticas novedosas en GBM, se llevó a cabo un screening virtual basado en Docking con el objetivo de encontrar inhibidores de la interacción Rac-GEF. Se buscaron compuestos que pudieran interactuar con los residuos aminoacídicos de Rac1 requeridos para la activación mediada por diferentes GEFs. Tras evaluar el efecto in vitro de 15 compuestos encontrados, se seleccionó el compuesto líder Hit1 con un IC50 en el rango de 80  $\mu$ M. Hit1 fue capaz de interferir la interacción de Rac con su activador Tiam in vitro, disminuir los niveles de Rac1 activo así como disminuir la activación de Pak1, uno de sus principales efectores. Por otro lado, el compuesto fue capaz de arrestar el ciclo celular en fase G0/G1 a una dosis 25  $\mu$ M ( $p<0,001$ ) y de bloquear de manera significativa ( $p<0,01$ ) la capacidad migratoria a una dosis de 10  $\mu$ M. A partir del compuesto líder se diseñaron y sintetizaron un primer grupo de análogos de los cuales se seleccionó el compuesto 1A-116 con un valor de IC50 de 44  $\mu$ M. Este análogo fue capaz de inhibir la activación de Rac1 en células de GBM a dosis menores que Hit1. Estos resultados aportan a la validación de Rac1 como blanco terapéutico en el desarrollo de agentes antitumorales de nueva generación para el tratamiento de GBM.

**508. (228) EL POLIMORFISMO EN LA ENZIMA GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA PI (GSTP1 P.105 ILE>VAL) ESTARÍA ASOCIADO CON UNA MENOR SOBREVIDA LIBRE DE RECAÍDAS Y LIBRE DE ENFERMEDAD EN PACIENTES CON CÁNCER DE PRÓSTATA.**

Leonardi D.<sup>1</sup>; Acuña A.<sup>2</sup>; Scorticati C.<sup>3</sup>; Fernández-ortiz D.<sup>4</sup>; Morales-bayo S.<sup>5</sup>; De Siervi A.<sup>6</sup>; Mazza O.<sup>7</sup>; Vazquez E.<sup>8</sup>; Cotignola J.<sup>9</sup>

*Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Dpto de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 6 8 9</sup>; Servicio de Urología, Hospital de Clínicas José de San Martín<sup>3 4 7</sup>; Servicio de Urología, Hospital Municipal de Vicente López "Dr. Prof. Bernardo Houssay"<sup>5</sup>  
 daialeonardi@hotmail.com*

Uno de los desafíos más importantes en oncología es predecir la progresión de la enfermedad. En Argentina, el cáncer de próstata (PCa) es el de mayor incidencia en los hombres y la segunda causa de muerte por esta enfermedad. El objetivo es identificar marcadores genéticos que pronostiquen la evolución de los pacientes. Reclutamos 220 pacientes del Hospital de Clínicas y del Hospital de Vicente López bajo un protocolo aprobado por los Comités de Ética. Se extrajo ADN de linfocitos y se analizaron 5 polimorfismos. Dos (GSTT1 nulo y GSTM1 nulo) se estudiaron por PCR multiplex, y los otros tres (GSTP1 c.313 A>G (p.105 Ile>Val), MDR1 c.3435 T>C y MTHFR c.665 C>T) por PCR-RFLP. Se realizó un análisis estadístico multivariado de 164 muestras para predecir las recaídas, incluyendo en el modelo estadístico otros posibles factores de riesgo. Este análisis mostró que los pacientes homocigotas para la variante GSTP1 c.313G(Val) tienen un riesgo aumentado de presentar una recaída (Odds ratio (OR)=4,8; 95% intervalo de confianza (95%IC)=1,9-21,4) al compararlo con los pacientes con los otros genotipos (AA + AG). La sobrevida libre de recaída (SLR) y sobrevida libre de enfermedad (SLE) de estos pacientes fue además significativamente menor que para los pacientes con al menos un alelo A ( $p=0,02$  y  $p=0,001$ , respectivamente). Al analizar solo a los pacientes con prostatectomía radical ( $n=120$ ), también se encontró un riesgo aumentado a presentar una recaída para los pacientes homocigotas GSTP1c.313G (OR=5,2; 95%IC=1,1-23,5). La SLR y SLE de estos pacientes fue significativamente menor que para los pacientes con al menos un alelo c.313 A ( $p=0,004$  y  $p<0,001$ , respectivamente). Estos hallazgos sugieren que la enzima GSTP1 estaría involucrada en la evolución del PCa y garantizan el estudio de más muestras y genes. Estos resultados ayudarían a elegir el mejor esquema de seguimiento y tratamiento para cada paciente con PCa; impactando en la calidad y sobrevida de los mismos.

**509. (290) EFECTOS DE LA SOBREATIVACIÓN DE AKT1 EN LAS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA HUMANO IBH-6 E IBH-7**

Riggio M.<sup>1</sup>; Polo M.<sup>2</sup>; Blaustein M.<sup>3</sup>; Colman-lerner A.<sup>4</sup>; Luthy I.<sup>5</sup>; Lanari C.<sup>6</sup>; Novaro V.<sup>7</sup>  
*IBYME<sup>1 2 5 6 7</sup>; IFIBYNE<sup>3 4 7</sup>  
 riggio.m@gmail.com*

En un modelo de carcinomas mamarios murinos inducidos por acetato de medroxiprogesterona (MPA) demostramos previamente que la activación de la vía PI3K/AKT es crítica en la transición hacia la hormono-independencia tumoral. Cultivos celulares provenientes de tumores hormono-dependientes (HD) infectados con una forma constitutivamente activa de AKT1 (myrAKT1) generaron tumores en ausencia de MPA al ser inoculados en ratones nude. Estos tumores presentaron un fenotipo ductal diferenciado, típico de los tumores hormono-independientes (HI). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de sobreactivar la vía PI3K/AKT en las líneas IBH-6 e IBH-7. Estas líneas expresan receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR) y son un buen modelo para estudiar los mecanismos involucrados en la progresión tumoral. La línea IBH-7 es de tipo HD, es decir necesita la presencia de estradiol (E2) para crecer in vivo, mientras que la línea IBH-6 es de crecimiento HI. Ambas líneas fueron transfectadas establemente con myrAKT1 o con el vector ACL4 vacío (control). In vivo, las células IBH-6-myrAKT1 presentaron una mayor tasa de crecimiento ( $p<0,001$ ) respecto de las células IBH-6-ACL4. In vitro, las células IBH-6-myrAKT1 mostraron una mayor capacidad para crecer en suspensión, incrementando tanto el número como el tamaño de las mamíferas formadas. Además, las células IBH-6-myrAKT1 tienen disminuida la expresión del marcador de adhesión celular

FAK. Las células IBH-7-myrAKT1 presentaron un incremento en la expresión de FAK y E-cadherina, acompañado de un cambio en la morfología celular y un aumento en la activación ligando-independiente del ER y PR respecto de las células IBH-7-ACL4. In vivo las células IBH-7-myrAKT1 originaron tumores en ausencia de E2. Estos resultados sugieren que, dependiendo del tipo celular, la sobreactivación de AKT1 produce cambios en la morfología celular y en la activación de receptores hormonales que puede generar un crecimiento celular autónomo.

**510. (256) EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DEL TRATAMIENTO RETINOIDEO EN LA REVERSIÓN DEL FENOTIPO MALIGNO DE TUMORES MAMARIOS CON ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE DISTINTAS ISOFORMAS DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC).**

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>; Urtreger A.<sup>6</sup>

*Instituto de Oncología Ángel Roffo Área de Investigación<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*

*mariadiazbessone@hotmail.com*

Entre las vías de señalización que constituyen prometedores blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama encontramos la vía de PKC, implicada en proliferación y apoptosis y el sistema retinoideo involucrado en diferenciación. En este trabajo desarrollamos un modelo de células LM3 que sobreexpresan PKC $\alpha$  o PKC $\delta$ , con el fin de estudiar si estos fenotipos, alteran la sensibilidad al tratamiento retinoide (ATRA). Mediante un ensayo de genes reporteros, observamos que la sobreexpresión de PKC $\alpha$  incrementó la actividad constitutiva de los sitios respondedores al Acido Retinoico (RARE), lo cual se asocia con trabajos previos, en los que demostramos que PKC $\delta$  se trasloca al núcleo junto con los receptores retinoideos. La sobreexpresión de PKC $\alpha$  fue capaz de modular diferentes eventos celulares asociados a la progresión tumoral in vitro. En este sentido, PKC $\alpha$  redujo el tiempo de duplicación poblacional (14,8 $\pm$ 2,3 h. vs 21,2 $\pm$ 3,1 h en cel. control p<0,05) e incrementó el potencial migratorio (cubrimiento de la herida: 69,3 $\pm$ 8,3% vs 41,2 $\pm$ 5,1% en cel. control p<0,05). Asimismo, estas células fueron las únicas que respondieron al tratamiento retinoide con una importante reducción en ambos parámetros. In vivo, la sobreexpresión de PKC $\alpha$  indujo la formación de tumores que presentaron una mayor velocidad de crecimiento y elevado potencial metastático. Nuevamente el tratamiento con ATRA limitó la progresión maligna de estos tumores (metástasis Md [Rango]: 9 [0-27] vs 55 [20-75] para LM3-PKC $\alpha$  tratadas y sin tratar resp p<0,05). Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de PKC $\alpha$ , confiere un fenotipo más agresivo pero torna a las células sensibles al ATRA, mientras que elevados niveles de PKC $\delta$  no alteran la respuesta al retinoide. El uso de retinoides podría ser beneficioso en pacientes con tumores mamarios agresivos, de altos niveles de PKC $\alpha$ .

### INMUNOLOGÍA 3

**511. (577) INTERACCIÓN DE CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS CON CÉLULAS INMUNES HUMANAS: PARTICIPACIÓN DE IL-10 Y MODULACIÓN POR EL SISTEMA COLINÉRGICO**

Paparini D.<sup>1</sup>; Fraccaroli L.<sup>2</sup>; Gori S.<sup>3</sup>; Scordo W.<sup>4</sup>; Perez Leiros C.<sup>5</sup>; Ramhorst R.<sup>6</sup>; Salamone G.<sup>7</sup>

*Lab. de Inmunofarmacología, FCEN, UBA, Lab. de Inmunología, Academia Nacional de Medicina<sup>1</sup>; Lab. de Inmunofarmacología, FCEN, UBA-CONICET<sup>2 5 6</sup>; Lab. de Inmunología, Academia Nacional de Medicina<sup>3 7</sup>; Servicio de Medicina Transfusional, Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>4</sup>*  
*daniel.paparini@hotmail.com*

La placenta humana y las células del sistema inmune contienen un sistema colinérgico no neuronal. El origen de la acetilcolina (ACh) placentaria y su rol sobre las células trofoblásticas (Tb) no ha sido aclarado aún, en particular no se ha investigado la participación de ACh en la interacción de las células T con las células inmunes presentes en la decidua. Nuestro objetivo fue analizar la producción de mediadores como IL-10, MCP-1 entre otros, en

un modelo in vitro de interfase materno-placentaria humana -cultivo células inmunes y línea celular Swan-71 (Tb)- y su posible modulación por el sistema colinérgico. Se emplearon poblaciones purificadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de voluntarios sanos: monocitos (Mo), linfocitos (L) y células dendríticas (CDs). Los Mo se purificaron por selección positiva con perlas inmunomagnéticas (Miltenyi) (>95%pureza). Para la obtención de CDs los Mo fueron diferenciados con GM-CSF + IL-4 por 6 días. Observamos un incremento en la producción de IL-10 por Mo y L luego de 24h de cultivo con Tb (pg/ml; media $\pm$ ES Mo: 347 $\pm$ 68, Mo+Tb: 565 $\pm$ 16 P<0,05; L: 10.6 $\pm$ 0.4, L+Tb: 50 $\pm$ 14, P<0,05). En co-cultivo de CDs y Tb, IL-10 también aumentó (media $\pm$ ES CDs: 11 $\pm$ 2; CDs+Tb 26 $\pm$ 6 pg/ml, P<0,05). El medio condicionado (MC) de Swan-71 moduló la quimiotaxis de CDs en 3h de cultivo en transwell (cél migradas: media $\pm$ ES; CDs+medio: 295 $\pm$ 47; CDs+MC 690 $\pm$ 54; P<0,05) y el MC per se indujo la producción de IL-10 (pg/ml; media $\pm$ ES CDs+medio: 52 $\pm$ 4; CDs+MC: 74 $\pm$ 5). No observamos modulación en la producción de IL-10 por neostigmina (inhibidor de la degradación de ACh), sin embargo observamos un incremento en la producción de MCP-1 (P<0,05) y en la expresión de CD83 en CDs cuando fueron cultivadas con Tb y neostigmina. En conclusión, las células Tb inducen la migración de CDs y la producción de IL-10 sin requerimiento de interacción célula-célula y el sistema colinérgico modula dicha interacción con producción de MCP1 y expresión de CD83.

**512. (597) DOPAMINA Y QUERATINOCITOS: IMPLICANCIA DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFAT**

Parrado A.<sup>1</sup>; Canellada A.<sup>2</sup>; Müller K.<sup>3</sup>; Gentile T.<sup>4</sup>; Reyrolán E.<sup>5</sup>

*Cátedra de Inmunología, FFyB, UBA, Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral Dr RA Margni, CONICET<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*cecilia.parrado@hotmail.com*

El neurotransmisor dopamina (DA) es una catecolamina con efectos moduladores en el sistema inmune y está implicada en la cicatrización de la piel. Previamente demostramos que el neurotransmisor dopamina aumenta la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) en queratinocitos. El factor de transcripción NFAT está involucrado en la regulación de la expresión de estas citoquinas en otros tejidos. La participación de la vía Calcineurina/NFAT en el sistema catecolaminérgico fue observada en neuronas y células del epicardio ventricular. A pesar de que su acción a nivel cutáneo es poco conocida, podría estar involucrada en la respuesta proinflamatoria inducida por catecolaminas. En este trabajo evaluamos la expresión del factor NFATc1 en cultivos celulares de queratinocitos HaCaT. Las células se incubaron con dopamina (10-5M) o medio control RPMI durante 1 y 4hs. La expresión de NFATc1 se determinó mediante western blot en extractos totales de las células. Como controles de fosforilación/desfosforilación de NFAT se utilizaron extractos de la línea macrofágica Raw264.7 estimuladas durante 2hs con PMA/ionóforo de calcio o sin preincubación con Ciclosporina A. Resultados: Observamos que los queratinocitos HaCaT son capaces de expresar el factor NFATc1, visualizándose tres isoformas características de aproximadamente 90, 110 y 140 KDa. El patrón de bandas de las células control y estimuladas con DA observado a 1 y 4 hs es similar al de las células Raw cultivadas en ausencia de estímulo, correspondiente a la forma fosforilada de NFAT. Conclusión: nuestros resultados preliminares sugieren que el factor NFATc1 se expresa en queratinocitos HaCaT, en ausencia/presencia de dopamina. Sin embargo no parecería ser activado por dicha catecolamina.

**513. (616) FENOLES DEL ACEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEN INHIBEN LA ACTIVACIÓN DE MASTOCITOS**

Persia F.<sup>1</sup>; Vera M.<sup>2</sup>; Mariani L.<sup>3</sup>; Fogal T.<sup>4</sup>; Penissi A.<sup>5</sup>

*Fac Ciencias Médicas-UNCUYO-IHEM<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*fandrespersia@hotmail.com*

Los mastocitos (Mc) participan activamente en procesos alérgicos e inflamatorios a través de la liberación de mediadores biológicamente activos. Existen dos vías de estimulación de Mc:

inmunológica (agregación de los Fc $\gamma$ RI) y no inmunológica. Ambas conducen a una activación no citolítica con generación de radicales libres y especies reactivas del oxígeno. Así, moléculas antioxidantes como hidroxitirosol (HT) y oleuropeína (Olp), compuestos fenólicos purificados del aceite de oliva, podrían inhibir la activación de Mc inducida por estímulos. Hipótesis: HT y Olp inhiben la degranulación de Mc, actuando como estabilizadores mastocitarios. Se purificaron Mc peritoneales de rata en gradiente de Percoll. Grupos experimentales: 1) Buffer, 2) Estímulo (Est), 3) HT+Est, 4) Olp+Est y 5) Cromoglicato de sodio (Cgto)+Est. Estímulos: Concanavalina A (ConA, vía inmunológica) o compuesto 48/80 (48/80, vía no inmunológica) o ionóforo de calcio A23187 (A23187, vía no inmunológica); Cgto, estabilizador mastocitario de referencia. Se determinó liberación de  $\beta$ -hexosaminidasa ( $\beta$ -hex) como indicador bioquímico de activación de Mc y se realizó microscopía óptica y electrónica. La viabilidad celular se evaluó mediante coloración con azul Tripán. Estadística: ANOVA-1/Tukey-Kramer. La incubación de los Mc con 48/80 (10  $\mu$ g/ml), ConA (200 mg/ml) y A23187 (0,05mg/ml), indujo un incremento significativo de la liberación de  $\beta$ -hex y alteraciones morfológicas, comparado con control. Este efecto fue inhibido por preincubación con Olp o HT de manera dosis dependiente. No se observaron cambios en la viabilidad de las células tratadas con Olp y HT (85% de viabilidad). Los efectos inhibitorios de Olp fueron mayores que los obtenidos para Cgto y HT. En conclusión, HT y Olp inhiben la activación de Mc inducida por A23187, ConA y 48/80, actuando como estabilizadores mastocitarios.

**514. (627) EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ACETATO DE GLATIRAMER SOBRE LAS ALTERACIONES NEUROINMUNES INDUCIDAS POR ESTRÉS CRÓNICO EN RATONES BALB/C.**

Palumbo M.<sup>1</sup>; Trinchero M.<sup>2</sup>; Zorrilla-Zubilete M.<sup>3</sup>; Schinder A.<sup>4</sup>; Genaro A.<sup>5</sup>  
 CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1,3,5</sup>; Laboratorio de Plasticidad Neuronal, Instituto Leloir<sup>4</sup>  
 molecula\_21@yahoo.com.ar

El estrés ha sido relacionado con déficit cognitivo. El hipocampo, una estructura límbica relacionada con el comportamiento y la memoria, es particularmente sensible a los efectos del estrés crónico. Las citoquinas pueden afectar la función cognitiva, entre ellas la memoria. Además, la IL-2, el IFN- $\gamma$  y la IL-6 han sido implicadas en desórdenes psiquiátricos. El acetato de glatiramer (GA) es un polímero de aminoácidos sintéticos que puede tener una débil reacción cruzada con autoantígenos residentes en el SNC y pueden estimular los efectos de protección y de reparación de las células T autoreactivas. En trabajos previos encontramos que el estrés crónico indujo déficit cognitivo que está correlacionado con el desbalance Th1/Th2. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento con GA sobre los efectos deletéreos inducidos por la exposición a estrés crónico en ratones BALB/c. Encontramos que los ratones expuestos a estrés crónico tuvieron una disminución en el número de células BrdU positivas ( $p < 0,001$ ), un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) ( $p < 0,001$ ), peor desempeño en las pruebas de aprendizaje y memoria evaluadas, comportamiento espontáneo de alternancia en el laberinto en forma de Y ( $p < 0,01$ ) y habituación en la prueba campo abierto, respecto a los ratones controles. Las citoquinas producidas por los linfocitos analizadas por ELISA mostraron una disminución de IFN- $\gamma$  y sin cambios en IL-2 (citoquinas tipo Th1) y un aumento de IL-6, IL-4 y IL-10 (citoquinas tipo Th2) en ratones estresados. Estos efectos inducidos por el estrés crónico fueron revertidos por la administración de GA (100 mg por inyección s.c., 4 veces durante 3 semanas). Estos resultados indican que el GA es capaz de revertir las alteraciones neuroinmunes inducidas por el estrés crónico. Estos hallazgos indican que las terapias basadas en la inmunidad podrían ser consideradas en el tratamiento del déficit cognitivo asociado al estrés crónico.

**515. (629) REGULACIÓN DE MARCADORES DE MADURACIÓN Y CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS POR ACTIVACIÓN MUSCARÍNICA. PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO.**

Graziano E.<sup>1</sup>; Lombardi M.<sup>2</sup>; Salamone G.<sup>3</sup>; Yuseff M.<sup>4</sup>; Geffner J.<sup>5</sup>; Sales M.<sup>6</sup>  
 CEFYBO-CONICET<sup>1,2,4,6</sup>; Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia nacional de Medicina<sup>3,5</sup>  
 lombardimg@yahoo.com.ar

El sistema colinérgico no neuronal está constituido por la acetilcolina, colina-acetil transferasa (CoAcT) y acetilcolinesterasa (ACE) enzimas que sintetizan y degradan a la Ac y por los receptores: nicotínicos y muscarínicos (M). Recientemente demostramos la presencia de receptores M3, M4 y M5, las enzimas ACE y CoAcT en células dendríticas (CD) humanas. Dada la importancia del proceso de maduración de las (CD) en la respuesta inmune, en este trabajo investigamos el efecto de la estimulación colinérgica breve sobre la expresión de los marcadores fenotípicos de maduración: HLA-DR y CD86 y sobre la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 y TNF- $\alpha$  en las CD. Las células se trataron con el agonista colinérgico carbacol (Carb, 10-8M) durante 1 h. Luego se cultivaron 24 h adicionales en ausencia (CD inmaduras (CDi)) o en presencia (CD maduras (CDm)) de LPS 0,5  $\mu$ g/ml. Observamos que el Carb incrementó la expresión de los marcadores HLA-DR y CD86 en las CDm tanto como la producción (pg/ml) de IL-12 (Carb: 575 $\pm$ 10; basal: 374 $\pm$ 15) y TNF- $\alpha$  (Carb: 6733 $\pm$ 1167; basal 3667 $\pm$ 629) ( $n=3$ ;  $p \leq 0,01$  Carb vs. basal). Ambos efectos se redujeron en presencia del antagonista muscarínico atropina (10-7M). Los receptores M3 y M5 pueden tener como enzima efectora a la óxido nítrico sintasa (NOS) en su vía de señalización, cuyo producto es un mediador inflamatorio y regulador de la respuesta inmune. Demostramos que tanto las CDi como las CDm expresan las isoformas NOS1 y NOS3 por Western blot y liberan concentraciones basales similares de NO<sub>2</sub>- ( $\mu$ M) (CDi: 2,99 $\pm$ 0,96; CDm: 1,98 $\pm$ 0,51). El tratamiento con Carb sólo incrementó los niveles de NO<sub>2</sub>- (5,53 $\pm$ 0,18,  $p < 0,01$ ) en las CDi. Concluimos que la estimulación colinérgica regula la expresión de los marcadores fenotípicos de maduración y la producción de citoquinas proinflamatorias en las CD humanas. Asimismo las CDi responden al agonista colinérgico aumentando la producción de óxido nítrico, el cual podría ser un factor clave en el proceso de maduración.

**516. (639) ESTUDIO DEL POLIMORFISMO +874 A/T EN EL GEN DEL IFN-G EN PACIENTES CON TUBERCULOSIS ACTIVA Y DADORES SANOS.**

Departamento de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, UNNOBA, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1,2,6</sup>; División de Tisiología, Hospital FJ Muñiz, Buenos Aires, Argentina<sup>3,4</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>5</sup>  
 guadaines.alvarez@gmail.com

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) es una citoquina Th1 clave en la respuesta inmune contra la infección por Mycobacterium tuberculosis (Mtb). Variaciones genéticas en el gen que la codifica pueden afectar la susceptibilidad de la respuesta inmune frente a esta bacteria. Ha sido reportado que el polimorfismo de nucleótido simple +874 A/T localizado en el primer intrón del gen de IFN- $\gamma$  estaría relacionado con los niveles de producción de esta citoquina. Así, aquellos individuos homocigotas AA producen niveles de IFN- $\gamma$  significativamente menores que los individuos que poseen una o dos copias del alelo T (AT o TT). A fin de determinar si esta asociación existe en la población en Argentina, en el presente estudio se caracterizaron genotípicamente pacientes con tuberculosis activa (TB) y dadores sanos (DS) mediante la técnica de ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System -PCR) y se determinaron por ELISA los niveles de IFN- $\gamma$  producido por sus células mononucleares de sangre periférica estimuladas durante 48 horas con un sonicado de Mtb. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran en pacientes con tuberculosis activa una alta frecuencia del genotipo AA (Frecuencia del genotipo AA 83,3% vs 16,6% del genotipo AT) mientras que en DS los genotipos más frecuentes fueron TT y AT (Frecuencia: 23,52% y 64,7%, respectivamente), observándose diferencias significativas al comparar las frecuencias entre pacientes y dadores sanos ( $\chi^2 = 12,36$ ;  $p <$

0,0005). Más aún, la presencia del alelo A se asocia con una menor producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con Mtb. Estos resultados sugieren que en Argentina, el genotipo AA podría ser considerado un importante marcador genético de riesgo para el desarrollo de la TB activa, mientras que los genotipos TT o AT estarían asociados con la protección frente a esta enfermedad.

- 517. (678) EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE LA RESPUESTA INMUNE Y EL COMPORTAMIENTO EN MACHOS Y HEMBRAS BALB/C SOMETIDOS A ESTRÉS PRENATAL**  
Pascuan C.<sup>1</sup>; Palumbo M.<sup>2</sup>; Genaro A.<sup>3</sup>  
*CEFAYBO-CONICET-UBA<sup>1,2,3</sup>*  
*ceciliapascuan@gmail.com*

El estrés prenatal (EP) se ha asociado con alteraciones inmunológicas y conductuales en la vida adulta. El objetivo de este trabajo fue investigar las alteraciones en la respuesta inmune y la conducta en ratones Balb/c adultos machos y hembras sometidos a EP y su respuesta al estrés crónico (EC). Para ello, hembras preñadas fueron sometidos a estrés por inmovilización 2 horas al día, desde el día 14 de gestación hasta el parto. Un grupo de crías adultas fueron expuestas a EC por inmovilización (3 semanas). Los resultados mostraron que tanto en hembras como en machos el EP no indujo cambios significativos en la respuesta proliferativa. Sin embargo, el efecto del EC en la respuesta inmune es diferente en ratones expuestos o no a EP (controles). En los ratones no expuestos, el EC indujo un aumento en la respuesta inmune en los machos ( $p < 0,05$ ), no observable en las hembras. Sin embargo, en animales EP el EC indujo una disminución de la respuesta inmune en hembras ( $p < 0,05$ ), mientras que en machos EP no hubo cambio. Por otro lado, tanto las hembras como los machos EP mostraron un desempeño similar en el laberinto en Y en comparación con ratones controles. La exposición a EC en las hembras EP causó una disminución significativa de la conducta de alternancia espontánea ( $p < 0,05$ ). Al contrario, el EC no indujo cambios en el porcentaje de alternancias espontáneas en los machos EP respecto a ratones control. Por último, no se observaron cambios en los niveles de corticosterona y catecolaminas ni en hembras ni en machos sometidos a EP. De manera similar, la exposición de ratones controles y EP a estrés crónico no indujo alteraciones en los niveles de estas hormonas. Estos resultados indican que las hembras serían más sensibles a los efectos nocivos del estrés crónico cuando son expuestas a estrés prenatal. En este efecto no parece estar implicada la desregulación de las hormonas clásicamente asociadas al estrés.

- 518. (681) DISTURBANCES OF THE PERIPHERAL B LYMPHOCYTE COMPARTMENT IN HUMAN CHRONIC CHAGAS DISEASE**  
Fernández E.<sup>1</sup>; Olivera G.<sup>2</sup>; González M.<sup>3</sup>; Hernández-vázquez Y.<sup>4</sup>; Sirena N.<sup>5</sup>; Morán M.<sup>6</sup>; Ledesma O.<sup>7</sup>; Postan M.<sup>8</sup>  
*Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén<sup>1,3,4,8</sup>*; *Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén<sup>2</sup>*; *Centro de Enfermedad de Chagas y Patología Regional, Hospital Independencia, Santiago del Estero, Argentina<sup>5,6,7</sup>*  
*este.fernandez@gmail.com*

The hallmark of chronic Chagas disease is the development of cardiac abnormalities in approximately 30% of individuals infected with *Trypanosoma cruzi*. In previous studies we have shown that chronic *T. cruzi* infection is associated with abnormalities of CD8+ and CD4+ T cell compartments, probably as a consequence of chronic antigenic stimulation by persisting parasites. In this study, we measured the levels of circulating naïve and memory B cells in chronic Chagas disease patients by flow cytometry. Twenty-one patients chronically infected with *T. cruzi* (mean age  $\pm$ SD= 40.35  $\pm$  13.5 yrs) living in endemic areas with active transmission (SE, n=8) and non-endemic areas (BA, n=13), were compared with 14 non-infected controls (mean age  $\pm$ SD= 34.31  $\pm$  10.2 yrs; SE n=8 and BA n=6). The results showed that *T. cruzi*-infected

patients had higher percentages of naïve (CD19+CD27-IGD+; mean %  $\pm$ SD= 51,8  $\pm$  15,73) and lower percentages of memory (CD19+CD27+; mean %  $\pm$ SD= 36,96  $\pm$  17,44) B lymphocytes compared to controls (mean %  $\pm$ SD= 29,22  $\pm$  13,67 and 60,78  $\pm$  14,22 respectively,  $p < 0.0002$ ), regardless the area of residence. As disease became more severe, a positive trend in the percentages of naïve ( $P = 0.004$ ) and a negative trend in the percentages of memory ( $P = 0.008$ ) B cells was found. Furthermore, a reduced proportion of switched memory B cells (CD19+CD27+IGD-; mean % SD=26,52 $\pm$ 14,44), associated to T cell-dependent immune responses was observed in patients from SE, and a reduced proportion of no-switched memory B cells (CD19+CD27+IGD+; mean %  $\pm$ SD=22,21 $\pm$ 15,09), involved in T cell-independent responses, was observed in patients from BA, compared with their respective controls (mean %  $\pm$ SD=46,76  $\pm$ 11,59 and 40,83 $\pm$ 18,95 respectively,  $p < 0.05$ ). The accumulation of naïve and loss of discrete memory B cell subsets in chronic Chagas disease patients indicate that *T. cruzi* infection modulates the phenotypic profile of the peripheral blood B cell-compartment. Grant Support: FONCYT PICT 2007 N°1732.

- 519. (708) REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA ACTIVIDAD LINFOCITARIA EN RATONES HIPOTIROIDEOS Y EN TRANSGÉNICOS QUE SOBRE-EXPRESAN EL GEN DE TRH**  
Valli E.<sup>1</sup>; Mascanfroni I.<sup>2</sup>; Klecha A.<sup>3</sup>; Barreiro Arcos M.<sup>4</sup>; García S.<sup>5</sup>; Landa M.<sup>6</sup>; Pirola C.<sup>7</sup>; Rabinovich G.<sup>8</sup>; Cremaschi G.<sup>9</sup>  
*CEFAYBO-CONICET<sup>1,4</sup>*; *IBYME-CONICET<sup>2,8</sup>*; *CEFAYBO-CONICET, FFyB, UBA<sup>3,9</sup>*; *IDIM-CONICET<sup>5,6,7</sup>*  
*eduardovalli@yahoo.com.ar*

Se ha demostrado que el estado tiroideo modula la inmunidad, pero se desconoce el exacto rol que cumplen las distintas hormonas del eje hipotálamo-pituitario-tiroideo (HPT). Al respecto nuestro grupo demostró que el hipotiroidismo inducido en ratones por administración de propiltiouracilo (PTU) conduce a la disminución de la reactividad linfocitaria y la producción de citoquinas Th1, pero no Th2 y lo contrario se observó en ratones hipertiroideos tratados con T4 (r-T4). A fin de investigar la participación de las hormonas tiroideas (HTs), de TSH y de TRH en estos efectos se analizó la regulación de la inmunidad en ratones transgénicos que sobre-expresan el gen de TRH (r-TRH). Los r-TRH presentaron altos niveles de TRH diencefálica respecto de los animales controles (n=15,  $p < 0.05$ ), pero similares valores séricos de THs y de TSH y mayores respuestas proliferativas T (LT) y B (LB) linfocitarias ante estímulos mitogénicos selectivos (ambos con  $p < 0.01$ ). Los niveles de TRH, así como también los de TSH se correlacionaron con las respuestas proliferativas linfocitarias (LT:  $r = 0.7952$ ,  $p = 0.0007$ ; LB:  $r = 0.8112$ ,  $p = 0.0004$ ). Estos efectos fueron acompañados por un aumento significativo de la liberación de citoquinas Th1, IFN- $\gamma$  e IL-2 y de IL-6 ( $p < 0.05$ ), pero no de las Th2 (IL-4 e IL-10) o de la citoquina pro-inflamatoria TNF- $\alpha$ . A diferencia de lo observado en los ratones hipotiroideos (r-PTU) que presentaron un aumento significativo en el porcentaje de células Treg ( $p < 0.05$ ) espontáneas, los r-TRH no mostraron diferencias en dichos porcentajes. Estos resultados sugieren que el aumento de hormonas del eje HP con niveles circulantes normales de HTs estaría relacionado con el incremento de las respuestas de LT y LB, contrariamente a lo observado en r-PTU que tiene bajos valores de HTs y altos de TSH y TRH y a lo hallado en r-T4 con bajos niveles de TRH y TSH, pero altos de HTs. Esto le daría un rol central a las HTs en la regulación de la inmunidad ejercida por el eje HPT.

- 520. (709) LA PROTEÍNA DE UNIÓN A SLAM (SAP) REGULA LA ACTIVACIÓN DE ERK Y P38 MAPK INHIBIENDO LA PRODUCCIÓN DE IFN-G EN RESPUESTA A M. TUBERCULOSIS.**  
Rovetta A.<sup>1</sup>; Hernandez Del Pino R.<sup>2</sup>; Peña D.<sup>3</sup>; Jurado J.<sup>4</sup>; Musella R.<sup>5</sup>; Palmero D.<sup>6</sup>; Malbrán A.<sup>7</sup>; Pasquinelli V.<sup>8</sup>; García V.<sup>9</sup>  
*Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1,3,4,9</sup>*; *Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA, Departa-*



mento de Ciencias Básicas y Experimentales, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA)<sup>2,8</sup>; División Tisiología, Hospital F.J. Muñiz<sup>6</sup>; Departamento de Alergia e Inmunología, Hospital Británico<sup>7</sup>  
 anarovetta@gmail.com

La producción de IFN-g es crucial en la respuesta frente a *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) pero los mecanismos que regulan su secreción no han sido totalmente esclarecidos. Previamente demostramos que la señalización vía SLAM induce una respuesta Th1 frente a Mtb a través de la activación de las proteínas quinasas ERK y p38 MAPK y que la proteína de unión a SLAM (SAP) inhibe la producción de IFN-g en células activadas con Mtb. Asimismo, hemos caracterizado dos poblaciones de pacientes con tuberculosis activa en Argentina según la respuesta in vitro frente a Mtb: los pacientes Altos Respondedores (AR) presentan alta producción de IFN-g, alta proliferación, expresión incrementada de SLAM; los individuos Bajos Respondedores (BR) producen bajos niveles de IFN-g, expresión de SLAM reducida e incrementada de SAP. Considerando estos antecedentes estudiamos la modulación diferencial de ERK y p38 MAPK en dichos grupos. Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes AR, BR y dadores sanos (DS) con Mtb y se determinó fosforilación por western blot. Los pacientes BR presentaron menor activación de ERK y p38 en comparación con los pacientes AR y los DS, en correlación con una menor producción de IFN-g ( $p < 0,05$ ). Más aún, los pacientes BR mostraron expresión elevada del ARN mensajero de SAP a las 48h de estimulación antigénica ( $p < 0,05$ ). Para corroborar el rol de SAP en la producción de IFN-g, analizamos la activación de Erk y p38 en individuos deficientes en SAP (pacientes con Síndrome Linfoproliferativo ligado al cromosoma X (XLP)). Observamos una mayor activación de estas quinasas respecto a los pacientes BR, acompañada de mayor producción de IFN-g en respuesta a Mtb. Así nuestros resultados sugieren que SAP podría modular negativamente la activación de Erk y de p38 en la tuberculosis activa inhibiendo la producción de IFN-g frente al patógeno.

## ONCOLOGÍA 8

### 521. (325) DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGÍA DE CRIOPRESERVACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA PARA SU APLICACIÓN A LA VACUNA CSF470

Tapia I.<sup>1</sup>; Arriaga J.<sup>2</sup>; Aris M.<sup>3</sup>; Duzelman V.<sup>4</sup>; Mazzobre F.<sup>5</sup>; Buera M.<sup>6</sup>; Vega J.<sup>7</sup>; Mordoh J.<sup>8</sup>; Barrio M.<sup>9</sup>  
 Centro de Investigaciones Oncológicas-FUCA<sup>1,2,3,4,9</sup>; Laboratorio de Propiedades Físicoquímicas y Conservación de Biomoléculas- Departamento de Industrias- FCEN-UBA<sup>5,6</sup>; Laboratorio Pablo Cassará<sup>7</sup>; IIBBA-CONICET- Fundación Instituto Leloir<sup>8</sup>  
 ivanatapia@gmail.com

La vacuna terapéutica CSF470 es una mezcla de líneas celulares de melanoma irradiadas letalmente, administradas con BCG y GM-CSF, que se está ensayando en pacientes con melanoma (Ensayo Clínico Fase II/III). El objetivo final del proyecto consiste en desarrollar una metodología para preservar CSF470 liofilizada, evitando almacenarla en N2 líquido y conservando sus propiedades biológicas e inmunogénicas. La liofilización de células eucarióticas nucleadas es un área poco explorada. Para ello, las células deben congelarse en ausencia de dimetilsulfóxido (DMSO), crioprotector actualmente utilizado, siendo este el paso crítico. Ensayamos distintas condiciones de congelación utilizando criopreservantes aptos como excipientes en el producto final. Investigamos la trehalosa (TRE) como crioprotector de las células componentes de la vacuna, antes y después de su irradiación. Para la incorporación de TRE investigamos la cinética de endocitosis de fase fluida por medio del trazador fluorescente LYCH. Ensayamos distintas composiciones del medio de congelación con TRE y albúmina humana (HSA). Muestras criopreservadas en DMSO y TRE se compararon evaluando la integridad celular (exclusión azul tripan),

persistencia de Ags (MART-1, gp100, GD2, GD3 y HLA-A0201, FACS), capacidad proliferativa (MTT y ensayo clonogénico) y en el caso de células irradiadas, la proporción de células apoptóticas/necróticas (Anexina-V/PI). La incorporación de TRE se calculó por el método de antrona-sulfúrico. Las células congeladas en presencia de TRE 0.2M y 30mg/ml HSA a -800C alcanzan una concentración intracelular entre 100-170 mM, luego de 5 h de endocitosis de fase fluida. La integridad celular, capacidad de crecimiento y persistencia de Ags fueron comparables para células congeladas en TRE y DMSO. Además, el patrón de apoptosis/necrosis resultó similar en ambos casos después de la irradiación. Utilizando el medio de congelación desarrollado podríamos iniciar los ensayos de liofilización de la vacuna.

### 522. (470) ANÁLISIS DE UNA RED FUNCIONAL DE GENES ASOCIADOS A LA EXPRESIÓN DE TRISTETRAPROLIN (TTP) EN LA DIFERENCIACIÓN Y TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA DE CÉLULAS EPITELIALES DE MAMA

Rodríguez Peña A.<sup>1</sup>; Goddio V.<sup>2</sup>; Canzoneri R.<sup>3</sup>; Kordon E.<sup>4</sup>; Abba M.<sup>5</sup>  
 CINIBA, Facultad de Ciencias Médicas – UNLP<sup>1,3,5</sup>; IFIBY-NE-CONICET, Dpto Qca Biológica, FCEN – UBA<sup>2,4</sup>  
 agustinarodriguezpea@yahoo.com.ar

El estudio de la coexpresión génica interespecífica puede ser utilizada en una predicción de redes funcionales de genes asociados a procesos biológicos específicos. Tristetraprolin (TTP) codifica a una proteína de unión a sitios ARE (AUBP) involucrada en la regulación post-transcripcional negativa de diversos genes relacionados con la progresión tumoral. La expresión TTP se encontraría dramáticamente suprimida en diversos tipos de tumores sólidos como el cáncer de mama. Para comprender los mecanismos que rigen la regulación de la expresión de TTP en las células mamarias, el objetivo del presente estudio fue identificar y caracterizar el módulo transcripcional asociado con la expresión de TTP. El análisis interespecífico de coexpresión en el transcriptoma de *Homo sapiens*, *Mus musculus* y *Rattus norvegicus* permitió identificar a un grupo de 9 genes (JUN, JUNB, FOS, FOSB, NR4A1, EGR1, IER2, BTG2 y DUSP1) estrechamente asociados a la expresión de TTP ( $p < 0,0001$ ). Estos hallazgos in silico fueron posteriormente validados en un modelo de diferenciación celular de glándula mamaria de ratón (HC11) mediante RT-PCR cuantitativa. En particular, los resultados muestran que los diferentes miembros del factor de transcripción AP1 (Ej.: Jun, JunB) se encuentran sobreexpresados y comodulados con TTP en los estadios de competencia/diferenciación en comparación a la fase de proliferación de la línea celular HC11 ( $p < 0,01$ ). Posteriormente, se evaluó la co-expresión génica en muestras normales, carcinomas infiltrantes y líneas celulares de cáncer de mama humano ( $n=30$ ) mediante RT-PCR cuantitativa, hallándose una reducción en los niveles de expresión de TTP y el módulo transcripcional asociado en carcinomas infiltrantes ( $p < 0,01$ ). Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que este grupo de genes podrían estar involucrados en la diferenciación de la glándula mamaria y su inhibición conjunta estaría asociada a la progresión del cáncer de mama humano.

### 523. (569) DESARROLLO DE UN SET DE MARCADORES GENÓMICOS Y PROTEÓMICOS PARA OPTIMIZACIÓN DE PREDICCIÓN DE RESPUESTA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE MAMA

Moncalero V.<sup>1</sup>; Peri M.<sup>2</sup>; Perandones C.<sup>3</sup>; Radrizzani M.<sup>4</sup>  
 Laboratorio de Neuro y Citogenética Molecular, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de San Martín<sup>1,2,3,4</sup>  
 vemoncalero@hotmail.com

El cáncer de mama es el tumor más frecuente de la población femenina. Las estadísticas informan que 1 de cada 8 mujeres lo padecerá en algún momento de su vida, y 1 de cada 25 morirá a causa del mismo. La amplificación del oncogen HER-2/neu (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) se observa en un 20-30% de los cánceres mamarios y es un excelente biomarcador no sólo pronóstico sino también predictivo. La amplificación de

HER-2/neu se asocia con enfermedad más agresiva y permite identificar aquellas pacientes que pueden beneficiarse del tratamiento con trastuzumab a partir del estudio de muestras de tumor. La sobre-expresión de la proteína HER-2/neu se evalúa mediante métodos inmunohistoquímicos (IHQ) utilizando anticuerpos específicos contra los receptores HER-2/neu. Las limitaciones de este método; tales como, subjetividad del observador, discrepancia en la sensibilidad y especificidad de diferentes anticuerpos comerciales, han determinado que la FDA haya establecido la obligatoriedad de la determinación de la amplificación del oncogen HER-2/neu mediante la técnica de FISH. Evidencias recientes plantean que la respuesta terapéutica al trastuzumab está condicionada por los niveles de expresión del gen supresor tumoral PTEN. El objetivo del presente proyecto es garantizar la accesibilidad a la evaluación sistemática de la amplificación de Her-2/neu, la expresión de PTEN y determinan menor respuesta al tratamiento con trastuzumab. Resultados: Pudimos obtener una sonda para detectar la amplificación de Her-2/neu en pacientes con cáncer de mama con igual sensibilidad y precisión comparables con las comerciales (Vysis-Abbot). También obtuvimos resultados con aptámeros contra PTEN con resultados similares a los obtenidos con anticuerpos. Conclusiones: Se pudo desarrollar sondas con la sensibilidad y precisión necesarias para la detección tanto de la amplificación genómica de Her-2/neu como para la detección de la proteína PTEN en pacientes con cáncer de Mama.

**524. (571) ANÁLISIS PROTEÓMICO EN CÁNCER DE PRÓSTATA: EFECTO DE UN MICROAMBIENTE INFLAMATORIO**  
Quintar A.<sup>1</sup>; Leimgruber C.<sup>2</sup>; Maccioni M.<sup>3</sup>; Jaume R.<sup>4</sup>; Maldonado C.<sup>5</sup>; Doll A.<sup>6</sup>

*Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC<sup>1 2 5</sup>; CIBICI, Dpto Bioquímica clínica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC<sup>3</sup>, Unitat de recerca biomèdica, Vall D'Hebron Institut de Recerca (VHIR), España<sup>4 6</sup> aquintar@cmefcm.uncor.edu*

Numerosas investigaciones sostienen que el microambiente estromal en el cual se desarrollan los tumores influencia fuertemente su comportamiento. Nuestro objetivo fue analizar el impacto de un microambiente inflamatorio en el cáncer prostático. Para ello desarrollamos una prostatitis crónica (PCr) en ratas Copenhagen inoculando intraprostáticamente 107 UFC de E.coli que, a los 28 días, resultó en un infiltrado inflamatorio CD3+, CD8+ y en menor medida CD4+ y CD11b/c+, sin desarrollo bacteriano. En ese momento, se implantaron células de la línea tumoral prostática MatLu en ratas singénicas con prostatitis crónica (PCr+MatLu) o normales (MatLu) en forma ortotópica (106 células por rata). Luego de 20 días, se extrajo la próstata para su análisis proteómico mediante 2D-DIGE y MALDI-MS. Se reconocieron alrededor de 1500 spots, de los cuales fueron diferencialmente expresados 61 en la comparación MatLu vs. PCr+MatLu (fold  $\pm 1.3$  y Anova  $p \leq 0.05$ ). El mismo análisis arrojó un total de 193 spots diferentes entre PCr vs. PCr+MatLu. Para la identificación de los spots, se realizó el picking de 67 de los mismos, digestión peptídica con tripsina y el estudio de los espectros mediante PMF data y/o fragmentación de espectros TOF-TOF PSD con posterior búsqueda en bases de datos mediante MASCOT. Entre las proteínas identificadas, se encontraron incrementadas en MatLu (vs. PCr+MatLu) moléculas relacionadas con transición epitelio-mesénquima (vimentina), movilidad celular (anexina 2) y metabolismo energético (MalatoDH, transketolasa). Estudios ultraestructurales de microscopía electrónica confirmaron un fenotipo más indiferenciado en MatLu, con mayor tasa mitótica y de proliferación celular ( $p < 0,01$  vs. PCr+MatLu mediante ICQ de incorporación de BrdU). Estos resultados sugieren que el microambiente inflamatorio crónico origina señales moduladoras para la progresión del cáncer prostático.

**525. (581) PAPEL DEL RECEPTOR A HISTAMINA H4 SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL Y POTENCIAL METASTÁSICO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMARIO HUMANO**

Martinel Lamas D.<sup>1</sup>; Carabajal E.<sup>2</sup>; Cortina E.<sup>3</sup>; Brenzoni P.<sup>4</sup>; Croci M.<sup>5</sup>; Bergoc R.<sup>6</sup>; Rivera E.<sup>7</sup>; Medina V.<sup>8</sup>

*Laboratorio de Radioisótopos, FFYB, UBA<sup>1 3 4 6 7 8</sup>; Instituto de Inmunología, Bs As<sup>5</sup> dmartinel@ffyb.uba.ar*

El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión del receptor a histamina H4 (RH4) y examinar los efectos de ligandos del RH4 sobre la tasa de crecimiento tumoral, capacidad metastásica y patrón de expresión molecular de un tumor mamario in vivo. Para ello se realizaron xenoinjertos de tumores desarrollados en ratones nude por inoculación de las células MDA-MB-231 derivadas de un carcinoma mamario humano altamente invasivo. Además, se evaluó el efecto de estos compuestos sobre la proliferación in vitro de las células MDA-MB-231. Los resultados in vitro demuestran que el tratamiento con el agonista del RH4 clozapina, reduce la proliferación en forma dosis dependiente produciendo una inhibición del 50% para una concentración 20  $\mu\text{M}$ . Este efecto se revierte completamente cuando las células se tratan previamente con el antagonista específico del RH4, JNJ7777120. Por otra parte, el RH4 se detectó en los tumores que también exhibieron elevada inmunoreactividad para histamina, histidina decarboxilasa, marcadores de proliferación y reducido porcentaje de apoptosis (15%), que no se vieron modificados significativamente con los tratamientos. Los animales del grupo no tratado mostraron un tiempo de duplicación exponencial del tumor de  $8.8 \pm 0.8$  días mientras que el tratamiento con clozapina (1 mg/Kg.día, s.c.) lo aumentó significativamente ( $13.9 \pm 3.3$ ,  $P < 0.01$ ). El tratamiento con JNJ7777120 (10 mg/Kg.día, p.o.) no modificó el tiempo de duplicación del tumor ( $8.7 \pm 1.1$ ). Los tumores desarrollados son altamente indiferenciados e invasivos y todos los animales mostraron numerosas metástasis ganglionares y pulmonares. Solo el compuesto JNJ7777120 redujo significativamente el número de metástasis pulmonares ( $4.0 \pm 1.8$  vs.  $23.3 \pm 3.9$ , T-test,  $P = 0.001$ ). Podemos concluir que el RH4 juega un papel fundamental en la progresión del tumor mamario y por lo tanto ligandos de este receptor podrían ofrecer un novedoso potencial terapéutico como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama.

**526. (605) LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE P38 EN CÉLULAS DE CARCINOMA MAMARIO MURINO F3II AUMENTA LA MULTIPLICIDAD DE NÓDULOS METASTÁSICOS PULMONARES EN RATONES BALB/C**

Capobianco C.<sup>1</sup>; Gabri M.<sup>2</sup>; Gomez D.<sup>3</sup>; Alonso .<sup>4</sup>; Aguirreghiso J.<sup>5</sup>; Farina H.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ<sup>1 2 3 4</sup>; Head and Neck Cancer Basic Research, Mount Sinai School of Medicine<sup>5</sup>; Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ<sup>6</sup> cscapobianco@gmail.com*

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 metastásico atraviesan tempranamente un estadio de quiescencia o dormancy. La identificación y caracterización de las señales celulares involucradas en la transición entre el estado proliferativo y el de dormancy son un paso crucial para la comprensión de este proceso y una herramienta útil para la búsqueda de terapias que prevengan la recurrencia luego de periodos libres de enfermedad. ERK y p38 son dos proteínas que se encuentran en estudio por su posible rol en la regulación de dichos mecanismos. Con el fin de evaluar el rol de p38 en la modulación del comportamiento de las células de carcinoma mamario murino F3II, se estudiaron los efectos in vivo de la inhibición de dicha quinasa. Previamente se demostró que al inocular por vía subcutánea células F3II en ratones Balb/c y administrar un inhibidor de p38 (SB203580), se reducen los tiempos de latencia tumoral ( $p < 0,05$  para 50.000 células y  $p < 0,01$  para 25.000 células, Logrank test), y aumentan significativamente los volúmenes tumorales ( $p < 0,05$ , t test). A continuación se decidió comprobar cuál es el efecto de la inhibición de p38 luego de la remoción del tumor. La administración de SB203580 no generó diferencias en la incidencia de metástasis pulmonares, sino en la carga metastásica en ratones portadores. Un 83% de los ratones con metástasis del grupo tratado presentó más de dos nódulos

por pulmón. Este porcentaje disminuye a un 36% en el grupo control ( $p < 0,05$ , Fisher's exact test). La diferencia aumenta si se consideran los animales con más de tres nódulos por pulmón, con un 66% de animales en el grupo tratado y un 7% en el grupo control ( $p < 0,005$ , Fisher's exact test). Estos resultados constituyen una nueva evidencia del rol que cumpliría p38 en la inducción del estado de quiescencia para la línea F3II.

#### 527. (622) IDENTIFICACION DEL PERFIL EPIGENÉTICO DE TUMORES DE MAMA "TRIPLE NEGATIVO

Branham M.<sup>1</sup>; Marzese D.<sup>2</sup>; Laurito S.<sup>3</sup>; Orozco J.<sup>4</sup>; Tello O.<sup>5</sup>; Gago F.<sup>6</sup>; Vargas-roig L.<sup>7</sup>; Roque M.<sup>8</sup>; *IHEM-CCT-CONICET*<sup>1,2,3,8</sup>; *Hospital Italiano, IGM y FCM, UNCuyo, Mendoza*<sup>4,5,6</sup>; *IMBECU-CCT*<sup>7</sup>  
mbranham@fcm.uncu.edu.ar

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea. Los tumores triple negativo (TN) son definidos por la ausencia de los receptores a estrógeno, a progesterona y al factor de crecimiento epidérmico 2, careciendo hoy de tratamiento específico. Muestran un comportamiento clínico más agresivo, una duplicación del riesgo de metástasis a distancia y un mal pronóstico. Los tumores TN presentan una desregulación en la reparación del ADN y la vía de reparación brca1/2 "down"-regulada. No se han detectado mutaciones en sus secuencias génicas, sugiriéndose una posible causa epigenética para esta desregulación. HIPOTESIS: Los tumores TN presentan alteraciones epigenéticas específicas en genes reparadores del ADN. OBJETIVO: analizar con 100 sondas, diferentes regiones CpG en genes reparadores del ADN y genes reguladores del ciclo celular, con la finalidad de identificar la firma epigenética de tumores de mama TN. MÉTODOS: Se extrajo ADN a partir de tejido fresco y fijado de tumores TN y tumores mamarios no-TN como control. Para el estudio de metilación se utilizó el ensayo MS-MLPA, basado en la hibridación de pares de sondas en regiones del promotor y su posterior amplificación luego de una digestión metil-sensible. RESULTADOS: El número de regiones aberrantemente metiladas es similar en tumores TN como en controles; sin embargo, los genes afectados difieren. Mediante análisis de asociación se detectó una correlación positiva entre los tumores TN y la metilación de los genes MGMT y Rb ( $p = 0,008$  y  $p = 0,04$ ). A su vez, los tumores TN presentaron una correlación negativa con la metilación de los genes reparadores de ADN mmr (PMS2, MSH2, MSH6, MLH1, MSH3). CONCLUSIÓN: Los tumores mamarios TN presentan una firma epigenética diferente del resto de los tumores mamarios e inactivan diferentes vías de los sistemas de reparación del ADN. Estos datos permiten identificar posibles blancos terapéuticos para estos tumores, que a la fecha carecen de un tratamiento específico.

#### 528. (632) EFECTO DE COPOLÍMEROS SOBRE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ALGUNOS TRANSPORTADORES ABC IMPLICADOS EN EL TRANSPORTE DE DROGAS ANTINEOPLÁSICAS

Castronuovo C.<sup>1</sup>; Cuestas M.<sup>2</sup>; Gentile E.<sup>3</sup>; Castillo A.<sup>4</sup>; Oubiña J.<sup>5</sup>; Sosnik A.<sup>6</sup>; Lorenti A.<sup>7</sup>; Mathet V.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Hepatitis Virales, Dpto de Microbiología, Facultad de Medicina, UBA*<sup>1,3,4,5,8</sup>; *The Group of Biomaterials and Nanotechnology for Improved Medicines (BIONIMED), Depto de Tecnología Farmacéutica, FFyB, UBA*<sup>2,6</sup>; *Banco de Tejidos, Grupo Biotar*<sup>7</sup>  
cynthia.castronuovo@gmail.com

Introducción: La capacidad de las células tumorales de adquirir resistencia a antineoplásicos está frecuentemente mediada por la sobreexpresión de proteínas de la superfamilia ABC (ATP-Binding Cassette), que son bombas transmembrana activas implicadas en el flujo de antitumorales y otros sustratos. Una de las estrategias para mejorar la eficacia de la terapia antitumoral es la formulación de fármacos donde el compuesto activo esté acompañado de copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) como las poloxaminas y los poloxámeros. Existen escasos reportes en la literatura internacional que demuestran que algunos de estos copolímeros inhiben la actividad de MDR1. Objetivo:

Evaluar mediante RT-qPCR el efecto de diversas poloxaminas y poloxámeros sobre los niveles de expresión relativa de MDR1, MRP1 y BCRP en 2 líneas celulares hepatocitarias. Materiales y métodos: las líneas celulares PLC/PRF/5 y SKHep1 se incubaron con las poloxaminas T904, T304, T1107 y el poloxámero F127 a diferentes concentraciones (1%, 0,1% y 0,01%) y tiempos (24, 48 y 72h). Se analizó la citotoxicidad de los mismos mediante citometría de flujo a las 24 y 72h calculando el porcentaje de células vivas mediante tinción con Anexina V-FITC/ioduro de propidio, el porcentaje de hipodiploidía, y el potencial de membrana mitocondrial. También se evaluó el daño celular determinando el nivel de transaminasas en los sobrenadantes celulares y el efecto de dichos copolímeros a las concentraciones no citotóxicas sobre el nivel de expresión relativa de MDR1, MRP1 y BCRP. Resultados: Todos los copolímeros a bajas concentraciones resultaron citocompatibles a las 72h. Al 0,1% la mayoría de los copolímeros disminuyeron los niveles de ARNm de MDR1 y BCRP, al menos a las 72h. Conclusiones: El efecto observado con estos copolímeros sobre los niveles de ARNm de los genes *mdr1* y *bcrp* constituye una nueva evidencia de la alta versatilidad de los mismos como coadyuvantes en la terapia antitumoral.

#### 529. (643) EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE INMUNOTERAPIA CON QUIMIOTERAPIA EN UN MODELO METASTÁSICO DE CÁNCER PULMONAR MURINO

Segatori V.<sup>1</sup>; Cabrera M.<sup>2</sup>; Gomez D.<sup>3</sup>; Alonso D.<sup>4</sup>; Gabri M.<sup>5</sup>  
*Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ*<sup>1,2,3,4,5</sup>  
valeriasegatori@yahoo.com.ar

El ácido siálico N-glicolil neuramínico (NGc) es un carbohidrato presente en células de mamíferos que forma parte de los glico-conjugados de membrana como el gangliósido GM3 (NGcGM3), habiendo sido descrito como antígeno tumoral en el cáncer pulmonar humano de células no pequeñas (NSCLC). La inmunoterapia basa su efecto terapéutico en la estimulación del sistema inmunológico. La aplicación de vacunas en la clínica suele estar asociada al tratamiento quimioterapéutico convencional, por lo que en este trabajo evaluamos la combinación de ambos tipos de tratamientos. La vacuna anti-idiotipo racotumomab (Raco) está dirigida contra NGcGM3. En este trabajo se reporta la actividad antitumoral de Raco en combinación con quimioterapia en el modelo de NSCLC murino 3LL. Raco demostró efecto antitumoral en la diseminación metastásica en ratones C57BL/6 desafiados (i.v.) con cél. 3LL observándose un menor número de nódulos pulmonares en los animales tratados con respecto al control. Con el objeto de evaluar la combinación terapéutica, ratones desafiados fueron tratados con Raco, Pemetrexed o ambos. Los animales tratados con la combinación desarrollaron menor cantidad de metástasis espontáneas que el grupo control (t-test no pareado,  $p < 0,05$ ). Cuando las células fueron inyectadas i.v., el peso de los pulmones de ratones tratados con la combinación fue menor al control (0,93 (0,44-0,98) vs 0,64 (0,47-0,91), control vs combinación. Mann Whitney,  $p < 0,05$ ). Adicionalmente, se comparó la actividad antitumoral en metástasis espontáneas de Raco producido mediante la tecnología tradicional de purificación desde líquido ascítico de ratones (LAM) versus el producto obtenido mediante la fermentación en tanque agitado (TA). La inmunización con ambos productos mostró una similar reducción en el recuento de nódulos pulmonares. Nuestros resultados sugieren que la combinación Raco/Pemetrexed muestra un beneficio terapéutico cuando se la compara con el tratamiento de ambas terapias por separado.

#### 530. (696) EL ANÁLISIS PROTEÓMICO POR MICROARRAY DE ANTICUERPOS DEFINE UN PERFIL DE PROTEÍNAS EXPRESADO POR CÉLULAS METASTÁSICAS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO TRIPLE NEGATIVO

Roberti M.<sup>1</sup>; Bianchini M.<sup>2</sup>; Bravo A.<sup>3</sup>; Levy E.<sup>4</sup>; Mordoh J.<sup>5</sup>; Barrio M.<sup>6</sup>  
*CIO-FUCA*<sup>1</sup>; *Centro de Investigaciones Oncológicas - Fundación Cáncer FUCA*<sup>2,4,6</sup>; *HIGA San Martín*<sup>3</sup>; *Centro de Investigaciones Oncológicas - Fundación Cáncer FUCA*; *IIBBA CONICET - Fundación Instituto Leloir*<sup>5</sup>  
paularoberti@conicet.gov.ar

Los tumores de mama humano que no expresan RE, RPg ni HER-2 (triple negativos-TN), son los más agresivos y aún no se cuenta con tratamientos efectivos. La línea celular IIB-BR-G fue aislada a partir de un tumor primario humano TN y su variante metastásica MT6, generada luego de trasplantes sucesivos en ratones nude, desarrolla metástasis (mts) en ganglios linfáticos y es altamente invasiva in vitro. Para identificar un perfil proteómico asociado a la mts utilizamos un microarray de anticuerpos (glass chips) para evaluar simultáneamente la expresión de 168 proteínas (principalmente citoquinas, quemoquinas y factores de crecimiento) comparando IIB-BR-G e MT6, extractos celulares (CEL) y medios condicionados libres de suero fetal bovino (MC). Para MT6 la secreción al MC aumentó para 37 proteínas y disminuyó para 27, siendo las más sobre-expresadas IL1b, CSF3, IGFBP1, CXCL1, CCL20 mientras que VEGFD, CXCL12, ICAM3, AgR e IL12 se encuentran entre las sub-expresadas. Para MT6 CEL se encontraron 24 proteínas sobre-expresadas (entre ellas CCL3, CSF3, IL2R $\alpha$ , CXCL1, y PGF) y 6 sub-expresadas (TNFRSF21, Siglec5, IL2R $\beta$  VEGFR2, TIE, PECAM). El análisis funcional del perfil proteómico evidencia categorías significativamente desreguladas en MT6 respecto de la parental IIB-BR-G: 1-factores pro-angiogénicos y linfangiogénicos (VEGFA, IL8, PGF, ang, HGF, IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , LAP, FGF2, VEGFC, MMP9, TEK, PDGFA); 2- proteínas involucradas en stress oxidativo tumoral-estroma (CCL5, CSF2, ICAM1, IL17, IL1 $\beta$ , IL8, LAP, TNFSF11); 3-factores pro-proliferativos y de supervivencia (IGFBPs, IL4, PDGFA, HGF, FGF2, FGF9, IL1, EGFR); 4- inductores potenciales de transición epitelio-mesenquimal (LAP, IL6, HGF, FGF9, MMPs); 5- actividad endopeptidasa (MMP1, MMP9, MMP13, HGF), entre otras. Durante la selección metastásica in vivo MT6 modifican la expresión de múltiples factores capaces de modular el estroma tumoral, favorecer la angiogénesis, migración e invasión tumoral y así contribuir a la mts.

**531. (699) EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS AZUCARADOS EN LÍNEAS CELULARES MURINAS DE CÁNCER VESICAL**  
Segatori V.<sup>1</sup>; Cabrera M.<sup>2</sup>; Belgorosky D.<sup>3</sup>; Gomez D.<sup>4</sup>; Alonso D.<sup>5</sup>; Eiján A.<sup>6</sup>; Gabrì M.<sup>7</sup>  
*Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ<sup>1 2 5 7</sup>; Instituto de Oncología Angel H. Roffo<sup>3 6</sup>*  
*valeriasegatori@yahoo.com.ar*

La glicosilación aberrante es un fenómeno reconocido en las células tumorales que implica la aparición o sobreexpresión de antígenos azucarados poco expresados en las células somáticas que le dieron origen, que interactúan con el microambiente tumoral como parte de proteínas o lípidos de membrana. Es por ello que la glicobiología de las células tumorales presenta características distintivas que no son el simple resultado de la alteración metabólica de la célula transformada sino un fenotipo activamente seleccionado. Los antígenos Sialyl Tn (S-Tn: Sia $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ Ser/Thr) y Sialyl Lewis X (S-LeX: Sia $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc-) son arreglos naturalmente asociados a proteínas. En lípidos, una alteración reportada en gangliósidos es la sobreexpresión del ácido neuramínico glicosilado (NeuGc) a costa del acetilado (NeuAc). Poca es la información publicada que describa la expresión de los antígenos mencionados en líneas murinas de cáncer vesical. Por citometría de flujo, las líneas MB49, MB49-I y MBT-2 se mostraron positivas solo para S-LeX siendo la expresión de este antígeno mayor en la línea invasiva (35%, 12,8% y 13% para MB49-I, MB49 y MBT-2, respectivamente). La expresión en cortes de tumor mostró un patrón diferente: mientras que la línea murina invasiva MB49-I muestra una expresión significativa de los marcadores estudiados, la línea no invasiva MB49 solo se mostró positiva para NeuGc-GM3. A modo de comparación se realizaron ensayos en paralelo con la línea humana T24. En estas células tanto S-LeX, S-Tn como NeuGc-GM3 mostraron una alta expresión. Estos resultados describen parte del perfil glucosídico de líneas tumorales murinas indicando que las líneas murinas de cáncer vesical estudiadas expresan significativamente S-LeX de manera similar a lo observado y reportado en tumores humanos. Estos resultados aportan valiosa información relativa a la glicobiología del cáncer vesical murino insumo necesario para la experimentación preclínica de esta enfermedad.

**532. (725) EL TGF- $\beta$ 1 Y EL AHR ESTÁN INVOLUCRADOS EN EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL HEXACLOROBENCENO EN LA GENERACIÓN DE FOCOS PRENEOPLÁSICOS EN HÍGADO DE RATA.**

de Tomaso Portaz AC.<sup>1</sup>; Chiappini F.<sup>2</sup>; Pontillo C.<sup>3</sup>; Randi A.<sup>4</sup>; Sanchez M.<sup>5</sup>; Kleiman De Pisarev D.<sup>6</sup>; Alvarez L.<sup>7</sup>  
*Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
*laura6alvarez@yahoo.com.ar*

El hexaclorobenceno (HCB) es un compuesto orgánico clorado que deletéreo la salud humana. En animales de experimentación es disruptor endocrino, neurotóxico, inductor de enzimas microsomales hepáticas, y promotor de cáncer hepático. Algunos de sus efectos biológicos están mediados por el Receptor de Hidrocarburos Aromáticos (AhR). El TGF- $\beta$ 1 es antiproliferativo y proapoptótico en células epiteliales hepáticas, sin embargo en células tumorales estimula la proliferación, invasión y metástasis. El TGF- $\beta$ 1 y el AhR presentan una regulación recíproca en hígado de rata. Hemos demostrado que el HCB desregula el crecimiento celular, aumentando la proliferación y la apoptosis en hígado de rata y en células humanas transformadas (Hep-G2). Objetivo: estudiar si el AhR y el TGF- $\beta$ 1 están involucrados en el mecanismo de acción del HCB en la generación de focos preneoplásicos, en un modelo de iniciación-promoción tumoral hepático, [diethylnitrosamina (DEN) (50 mg/kg) y HCB (100 mg /kg p. c.)] en ratas, y en Hep-G2 (5, 50 y 500 nM). Se analizaron en ambos modelos: 1- proliferación celular, Niveles proteicos de PCNA (inmunohistoquímica), c-Myc, p53, TGF- $\beta$ 1 y AhR, (Westernblot); 2-Expresión de Catalasa, RT-PCR. Se estudió In vivo: 3-Niveles proteicos en zonas focales y no focales de GST-P, TGF- $\beta$ 1 y AhR; por inmunohistoquímica. Resultados: Se observó In vivo aumento de los niveles de PCNA 60%,  $p \leq 0.001$ ; p53 fosforilada, 45% ; c-Myc 36%, TGF- $\beta$ 1 50%, y AhR 40%, ( $p \leq 0.01$ ) y de Superóxido Dismutasa 27% ( $p \leq 0.05$ ), en hígado total. En zonas focales TGF- $\beta$ 1 y AhR aumentaron 62 % y 51%, ( $p \leq 0.001$ ,  $p \leq 0.01$ ). In vitro, aumentaron a dosis máxima (500 nM) PCNA (38%,  $p \leq 0.05$ ) y AhR (40%,  $p \leq 0.01$ ), p53 y c-Myc (35% y 43%,  $p \leq 0.01$ ). TGF- $\beta$ 1 aumentó significativamente con todas las dosis (26%, 40% y 28 %). Conclusión: El HCB aumenta la proliferación celular, la expresión del TGF- $\beta$ 1 y AhR en focos preneoplásicos en hígado de rata y en la línea celular Hep-G2, en función de la dosis de tratamiento. El protooncogen c-Myc así como p53, podrían estar involucrados en dicho mecanismo.

## REPRODUCCIÓN 6

**533. (431) TOXICIDAD AL GLIFOSATO EN ESTADIOS EMBRIONARIOS DE RHINELLA ARENARUM. EFECTO DE LA HIPOXIA Y LA IRRADIACION UVB**

Herkovits J.<sup>1</sup>; Piazuolo M.<sup>2</sup>  
*Instituto de Ciencias Ambientales y Salud, Fundacion PROSAMA<sup>1 2</sup>*  
*herkovit@retina.ar*

El uso intensivo del glifosato especialmente asociado con el cultivo de soja transgénica motiva intensa preocupación por sus potenciales efectos tóxicos. Se informa: i) la toxicidad del glifosato, ingrediente activo (IA) en tratamientos continuos y para 5 estadios embrionarios de *Rhinella arenarum*, Blástula (E7), Brote Caudal (E17), Boca Abierta (E21), Circulación en Aleta (E22) y Opérculo Completo (E25). Se mantuvieron 10 embriones por triplicado en diferentes concentraciones de glifosato en tratamiento continuo a partir de E7 y por 24 horas durante los estadios mencionados con observaciones diferidas hasta las 240 horas post tratamiento. Para tratamientos continuos la CL50 resultó para E7 en 9, 8 y 6 mg/L de glifosato IA a las 96, 168 y 240 hs respectivamente. De los estadios embrionarios evaluados el de E21 resultó el más sensible con una CL50 de 11 y 5,5mg/L a las 96 y 240hs respectivamente. ii) El papel del O2 en la toxicidad del glifosato se evaluó manteniendo 10 embriones en E25 por triplicado con 25mg/L de glifosato IA en cámaras de hipoxia al 35% y 50% respecto de la concentración ambiental de O2 resultando la sobrevida en 20, 80 y 40% respectivamente. La sobrevida de

los embriones controles en hipoxia y los que estaban en normoxia fue mayor al 90%. iii) Para evaluar el efecto del UVB se utilizó una concentración subletal de glifosato IA (1mg/L) durante 15 días aplicándose posteriormente una dosis de 3556 J/m<sup>2</sup> de UVB que resulta para los controles en una letalidad a las 24, 48 y 72 hs de 0, 26 y 54% y para los embriones pretratados con glifosato en 10, 53 y 80% respectivamente. Los resultados indican que el glifosato tiene efectos especialmente adversos para E21 y que factores ambientales tales como el UVB y fluctuaciones de oxígeno disuelto que podemos considerar habituales en los cuerpos acuáticos, tienen una incidencia que eventualmente incrementaría en forma significativa la toxicidad de este agroquímico.

**534. (474) COMPORTAMIENTO DIFERENCIAL DE COMPONENTES DEL SISTEMA IGF EN LA ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA BOVINA**

Rodríguez F.<sup>1</sup>; Colombero M.<sup>2</sup>; Ortega H.<sup>3</sup>; Salvetti N.<sup>4</sup>; Díaz P.<sup>5</sup>; Barbeito C.<sup>6</sup>; Rey F.<sup>7</sup>

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL<sup>1 2 3 4 5 7</sup>; Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP<sup>6</sup>  
fernandamrodriguez@hotmail.com

El sistema IGF cumple un rol fundamental en el desarrollo y funcionalidad ovárica. Se ha descrito que las señales endocrinas, como así también el microambiente folicular, ejercen una regulación diferencial en el desarrollo de la enfermedad quística ovárica (COD), postulando al sistema IGF como uno de los principales moduladores. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la expresión de ARNm de IGF-I y, la actividad y expresión de sus proteínas de unión (IGFBP) en ovarios y líquido folicular de vacas con COD. Se utilizaron muestras de vacas con quistes espontáneos, obtenidas en playa de faena, y muestras de animales experimentales, cuyos ciclos estrales fueron sincronizados previamente, y luego divididos en dos grupos. En uno de ellos, se indujo la enfermedad por medio de la administración de ACTH, y el otro se mantuvo como grupo control. Luego de la confirmación del desarrollo de quistes por ultrasonografía se realizó la ovariectomía y se obtuvieron muestras de ovarios y líquido folicular. Se determinó la expresión de ARNm de IGF-I en pared folicular por RT-PCR, observando una menor expresión en quistes respecto a folículos antrales controles. Por inmunohistoquímica, se observó una disminución en la expresión de IGFBP-4 y -5 en quistes respecto a folículos controles en crecimiento ( $p < 0,05$ ), así como además, en la actividad de las mismas en líquido folicular ( $p < 0,05$ ) evaluada por ligand blot. Además, se observó un incremento en la actividad de IGFBP-3 en quistes ( $p < 0,05$ ) proponiendo que dicha proteína de unión ejercería la principal acción moduladora sobre los niveles detectados de IGF-I. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el sistema IGF participaría en la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina, al alterar componentes del control del crecimiento folicular.

**535. (518) LA PROGESTERONA MODULA LOS NIVELES DE ENDOCANNABINOIDES EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.**

Wolfson M.<sup>1</sup>; Vercelli C.<sup>2</sup>; Aisemberg J.<sup>3</sup>; Franchi A.<sup>4</sup>

Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto, CEFyBO-CONICET-UBA<sup>1 2 3 4</sup>  
manuwolfson@gmail.com

Los endocannabinoides son una clase emergente de mediadores lipídicos, y análogos endógenos del tetrahidrocannabinol (THC). La anandamida (AEA), una de los principales endocannabinoides, es necesaria para la implantación, pero su aumento está asociado con abortos tempranos en mujeres. El lipopolisacárido (LPS) induce la síntesis de AEA en macrófagos murinos e inhibe la actividad de la FAAH, enzima que degrada AEA, en linfocitos de sangre periférica de mujeres. En nuestro laboratorio desarrollamos un modelo de aborto temprano en ratón inducido por LPS, donde se observó una disminución de los niveles séricos de progesterona (P). El objetivo de este trabajo es estudiar si la progesterona modula el sistema endocannabinoide y a través de que receptores estaría actuando en células mononucleares

de sangre periférica (PBMC). Se observó que PBMC de ratones preñados tienen mayores niveles de actividad de FAAH que los provenientes de ratones no preñados (NP) ( $p < 0,05$ ). En ratones NP, nuestros resultados muestran que el tratamiento con LPS disminuye tanto la actividad ( $p < 0,05$ ) como la expresión de FAAH (WB ( $p < 0,05$ ) y PCR ( $p < 0,05$ )) y que la P revierte el efecto de la endotoxina ( $p < 0,05$ ). Este efecto protector de la P es revertido con el tratamiento con 2 antagonistas de P (RU486 y Ionaprizan) ( $p < 0,05$ ). En ratones preñados, el tratamiento con LPS no produce efecto en la actividad de la FAAH, pero sí se observa cuando se administra un antagonista de los receptores nucleares de P (RU486) previo al LPS ( $p < 0,05$ ). Se detectaron los receptores de P, PRA y PRB y se observó que sus niveles están modulados por LPS y P ( $p < 0,05$ ). La mayor parte de las PBMC son CD3+ (citometría de flujo) y estos expresan los PR (citometría de flujo e inmunofluorescencia). Estos resultados sugieren que la P, a través de sus receptores clásicos, tiene un efecto protector sobre los procesos inflamatorios mediados por AEA.

**536. (523) PARTICIPACIÓN DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE LEPTINA DURANTE EL PROCESO DE DECIDUALIZACIÓN.**

Vaccarezza A.<sup>1</sup>; Cerchi G.<sup>2</sup>; Farina M.<sup>3</sup>; Vitullo A.<sup>4</sup>; Cameo P.<sup>5</sup>  
CEBBAD, Universidad Maimónides<sup>1 2 4 5</sup>; Laboratorio de Fisiopatología Placentaria, CEFYBO-CONICET-UBA<sup>3</sup>  
vaccarezza.agustina@maimonides.edu

La decidua es esencial para la implantación, placentación y desarrollo embrionario. La leptina tiene un importante rol en el desarrollo de la receptividad endometrial y el éxito de la implantación. La acción biológica de la leptina es mediada por el receptor de leptina (OB-R), del cual se conocen al menos 5 isoformas. Trabajos previos han demostrado la presencia de las distintas isoformas del OB-R en trofoblasto, decidua y endometrio humano. Nuestro objetivo fue identificar las isoformas del OB-R en decidua y endometrio humano; determinar si la decidualización modifica el perfil de expresión de las isoformas del OB-R; y estudiar la fosforilación de STAT3 y MAPK $\alpha$ , segundos mensajeros de la cascada de señalización inducida por la leptina. Se utilizaron cultivos primarios de fibroblastos uterinos humanos (HuF) provenientes de placentas normales a término. Las células HuF se decidualizaron in vitro en presencia de hormonas y AMPc y se analizó la expresión del OB-R por inmuno-blot. Identificamos en las células HuF la expresión de 5 isoformas del OB-R (150, 120, 95, 72 y 50 kDa) y en la decidua 4 isoformas del OB-R (150, 95, 72 y 50 kDa). En nuestro modelo de decidualización observamos la expresión diferencial de dos isoformas del OB-R (95 y 72 kDa). Por otro lado, mediante inmuno-blot observamos un aumento dosis dependiente en la fosforilación de STAT3 y MAPK $\alpha$  en las células HuF estimuladas con leptina. Teniendo en cuenta la expresión diferencial de las distintas isoformas del OB-R durante la decidualización y el efecto de la leptina, mediante cascadas de señalización específicas, sugerimos que el sistema leptina/receptor es un regulador importante en el proceso de decidualización y en la implantación embrionaria.

**537. (524) EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE UTERINO PARTICIPA DEL EFECTO DELETÉREO DEL LPS SOBRE EL ÚTERO DE RATÓN PREÑADO.**

Salazar A.<sup>1</sup>; Vercelli C.<sup>2</sup>; Davio C.<sup>3</sup>; Franchi A.<sup>4</sup>

Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto, CEFyBO-CONICET-UBA<sup>1 2 4</sup>; Cátedra de Química Medicinal, Laboratorio de Farmacología de Receptores, FFyB, UBA<sup>3</sup>  
laturi@hotmail.com

El sistema endocannabinoide (EC) desempeña funciones vitales en varios aspectos de la reproducción, incluyendo la gametogénesis, la fecundación y el parto. Sin embargo poco se sabe sobre la presencia o el papel del sistema endocannabinoide en el útero. Nosotros hemos demostrado que el útero de ratón preñado expresa las enzimas que sintetizan y degradan anandamida, el endocannabinoide más abundante en el útero como así también los receptores de cannabinoides (CB). Además hemos observado que

los EC median el efecto deletéreo del LPS sobre el tejido uterino como el aumento de óxido nítrico y prostaglandinas inducido por la endotoxina. El AMP cíclico es un segundo mensajero intracelular difusible, que contribuye a la quiescencia uterina, probablemente a través de la inhibición de la movilización de calcio y del aparato contráctil. En el presente trabajo estudiamos el efecto de la endotoxina LPS (1µg/ml) en fragmentos uterinos provenientes de sitios de implantación de hembras Balb-C en el día 7 de gestación sobre la síntesis de AMPc (ensayo de unión de PKA), observando la disminución del mensajero en los tejidos incubados con la endotoxina ( $p < 0,05$ ). Se realizó una curva concentración respuesta de metanandamida, análogo estable de la anandamida, encontrándose que todas las concentraciones ensayadas (10-6, 10-7 y 10-8 M) también causaron una inhibición de la adenilato ciclasa reduciendo los niveles intracelulares de AMP cíclico ( $p < 0,01$ ). El tratamiento con LPS de los sitios uterinos aumentó la desorganización tisular y produjo condensación de la cromatina así como la formación de pequeños cuerpos apoptóticos, hecho que fue revertido por la co-incubación con un antagonista del receptor CB1. Estos resultados muestran que tanto el LPS como la anandamida disminuyen los niveles intracelulares de AMPc y que el daño tisular inducido por la endotoxina podría estar asociado a procesos apoptóticos y mediado por endocannabinoides.

**538. (561) TESTOSTERONA ATENÚA LOS CAMBIOS FENOTÍPICOS DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS PROSTÁTICAS EN RESPUESTA A LPS.**

Leimgruber C.<sup>1</sup>; Quintar A.<sup>2</sup>; Maldonado C.<sup>3</sup>  
*Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC<sup>1 2 3</sup>*  
*carolina@cmefcm.uncor.edu*

Las células musculares lisas prostáticas (CMLp) establecen interacciones con el epitelio para mantener la homeostasis glandular, las que son reguladas por testosterona (T). Recientemente demostramos que las CMLp responden a LPS adquiriendo un fenotipo miofibroblástico secretor de citoquinas proinflamatorias. Considerando que los miofibroblastos son importantes componentes de la estroma reactiva, el objetivo fue analizar si T modula dicha respuesta. CMLp de ratas Wistar se estimularon con 1 y 10 µg/ml LPS en presencia o no de 10-7M T por 24 ó 48 h; se analizó su ultraestructura y expresión de TLR4,  $\alpha$ -actina (ACTA2), calponina y vimentina por western blot e inmunofluorescencia (IF). Se cuantificó IL6 y TNF $\alpha$  en sobrenadantes por ELISA. Además, se realizaron estímulos cortos con LPS de 15, 30 o 120 min, para analizar la traslocación nuclear de NF $\kappa$ B por IF. Las CMLp controles mostraron fenotipo contráctil ACTA2(+), calponina(+) y vimentina(-). LPS promovió su diferenciación con coexpresión de ACTA2 y vimentina y disminución de calponina ( $p < 0,01$  vs control) a las 24 h. T atenuó tanto la disminución de calponina como el incremento de vimentina ( $p < 0,05$  vs LPS sin T), apareciendo recién a las 48 hs post-LPS. Además, LPS estimuló la expresión de TLR4 a las 48 h ( $p < 0,001$  vs control), lo que fue inhibido por T ( $p < 0,05$  vs. LPS sin T). T disminuyó además la secreción de IL6 y TNF $\alpha$  en respuesta a LPS (IL6  $p < 0,01$  vs LPS sin T; TNF $\alpha$   $p < 0,05$  vs LPS sin T). Finalmente, CMLp tratadas con LPS exhibieron traslocación nuclear de NF $\kappa$ B a los 15 min (21% de células (+) vs 5% en los controles,  $p < 0,01$ ). En cambio, las CMLp con T mostraron menor expresión nuclear de NF $\kappa$ B a los 15 min post-LPS (8% de células (+) vs 21 % sin T,  $p < 0,05$ ) alcanzando un pico a los 30 min de 12 %. Estos resultados indican que si bien en presencia de T las CMLp responden a LPS, esta respuesta es más atenuada. Asimismo, los datos sugieren que los andrógenos ayudarían a mantener el fenotipo contráctil de las CMLp.

**539. (628) EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS DURANTE EL DESARROLLO FOLICULAR EN OVARIOS BOVINOS DE ANIMALES SANOS Y SU VARIACIÓN EN ANIMALES CON ENFERMEDAD QUÍSTICA OVÁRICA.**

Alfaro N.<sup>1</sup>; Amweg A.<sup>2</sup>; Matiller V.<sup>3</sup>; Rodríguez F.<sup>4</sup>; Velazquez M.<sup>5</sup>; Salvetti N.<sup>6</sup>; Stangaferro M.<sup>7</sup>; Ortega H.<sup>9</sup>  
*Facultad de Ciencias Veterinarias, UNL<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>*  
*natoalfaro@hotmail.com*

Las hormonas esteroideas juegan un rol clave en la regulación de la función ovárica y además de su función a nivel del eje hipotálamico-hipofisario-gonadal, actúan como moduladores intraováricos. Se ha demostrado en modelos experimentales que alteraciones en su expresión conducen a la formación de folículos quísticos. Un aspecto clave para llegar a una mayor comprensión de la forma en que los andrógenos intervienen en el crecimiento folicular es determinar las poblaciones celulares de folículos en los diferentes estadios de desarrollo que expresan sus receptores. Es por ello que nuestro objetivo fue evaluar la expresión del receptor de andrógenos (RA) durante el crecimiento folicular en ovarios bovinos y estudiar su variación en la enfermedad quística ovárica (COD). Para ello 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 y se realizó la evaluación de la expresión del ARNm de los RA mediante RT-PCR. Por inmunohistoquímica se analizó la expresión de RA en células de la granulosa y tecas de folículos primarios, secundarios y antrales en ovarios normales y folículos quísticos en ovarios de animales con COD. Los quistes evidenciaron una fuerte expresión del ARNm de RA ( $p < 0,05$ ) en células de la granulosa mientras que a nivel proteico, la inmunoexpresión fue menor ( $p < 0,05$ ) en estas células respecto a las de los folículos antrales sanos. Los hallazgos encontrados indican que los folículos quísticos presentan un patrón de expresión del RA diferente con respecto a folículos sanos. Por otra parte, la discrepancia entre la expresión del ARNm y de la proteína podría deberse a mecanismos de regulación post-transcripcionales o a la presencia de diferentes isoformas de la proteína. En conclusión, los cambios encontrados podrían afectar los mecanismos autocrinos de control intraovárico.

**540. (7) LA VÍA ALTERNATIVA DE AMPc/EPAC Y LA VÍA DE MAPK MEDIAN LA ESTIMULACIÓN DE LEPTINA POR HCG EN PLACENTA**

Maymó J.<sup>1</sup>; Pérez Pérez A.<sup>2</sup>; Maskin B.<sup>3</sup>; Calvo J.<sup>4</sup>; Sánchez-margalet V.<sup>5</sup>; Varone C.<sup>6</sup>  
*Dpto de Química Biológica, FCEN-UBA<sup>1 4 6</sup>; Depto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular, Universidad de Sevilla, Sevilla, España<sup>2 5</sup>; Hospital Nacional Alejandro Posadas<sup>9</sup>*  
*julietamaymo@gmail.com*

La leptina (LEP) ha sido propuesta como una molécula fundamental en la regulación de la implantación y en el mantenimiento del embrión. Es una hormona de 16kDa descubierta en tejido adiposo con la función de regular el balance energético del organismo. También es expresada en placenta humana donde podría tener efectos sobre el crecimiento, la angiogénesis y la inmunomodulación. Hemos demostrado que el AMPc y la hCG inducen la expresión de leptina en células placentarias. En el presente trabajo, analizamos las vías de señalización y los mecanismos involucrados en la estimulación de leptina por hCG en trofoblastos humanos. Utilizamos como modelo de trabajo las líneas celulares trofoblásticas BeWo y JEG-3 así como explantos de placenta humana término. Por qRT-PCR confirmamos que el hCG (25-100 UI/ml) estimula la expresión de leptina en trofoblastos. Determinamos también que la hCG aumenta los niveles de AMPc y activa la transcripción a través de elementos CRE, evaluado por ensayos de gen reportero con plásmidos conteniendo el elemento CRE y el gen luc. Por qRT-PCR y por WB observamos que el AMPc inhibe el efecto estimulador de hCG sobre leptina. Previamente, demostramos que la estimulación de leptina por hCG en placenta era ejercida a través de la vía de la MAPK. Por WB y ensayos de gen reportero con plásmidos conteniendo el promotor de leptina y el gen luc, determinamos que la inhibición de la PKA con H89 10 µM no bloquea la estimulación de leptina por hCG. Más aún, la inhibición de PKA indujo significativamente la fosforilación de ERK 1/2, medida por WB. Finalmente, el tratamiento con un análogo del AMPc (8cpt-2me-cAMP, 10µM) que estimula la vía de Epac (sin estimular a la PKA), o la cotransfección con intermediarios de dicha vía, estimularon tanto la expresión basal de leptina como la inducida por hCG. En resumen, demostramos que la estimulación de leptina por hCG en placenta es independiente de PKA e involucra la vía de MAPK y la vía alternativa de AMPc/Epac.

**541. (21) MECANISMO DE ACCIÓN DE LEPTINA SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS PLACENTARIAS**

Toro A.<sup>1</sup>; Ibarbalz F.<sup>2</sup>; Maymó J.<sup>3</sup>; Calvo J.<sup>4</sup>; Varone C.<sup>5</sup>  
 Dpto de Química Biológica, FCEN-UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 ayelentoro@gmail.com

Durante la implantación embrionaria se genera un diálogo materno fetal que involucra la acción de múltiples reguladores, siendo uno de ellos la leptina. Esta proteína de 16 kDa fue descubierta en tejido adiposo con la función de regular el balance energético del organismo. También se expresa en placenta humana donde podría tener efectos sobre el crecimiento, la supervivencia, la angiogénesis y la inmunomodulación placentaria. Resultados previos de nuestro grupo demostraron que la leptina aumenta la proliferación celular y supervivencia en células JEG-3 y BeWo. El objetivo de este trabajo es estudiar los mecanismos involucrados en la acción 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 caspasa-3, Bcl-2, Bax y p53. Observamos que 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  $\mu$ M) aumentó la apoptosis celular medida por activación de caspasa-3. Luego del tratamiento con leptina la relación de los niveles de Bcl-2/Bax fueron incrementados. También se determinó el efecto de leptina sobre la expresión de Bax, en ensayos de transfección transitoria con construcciones reporteras conteniendo el promotor de Bax obteniéndose una disminución de su expresión por leptina. Por otro lado se analizó la expresión de p53, regulador clave del ciclo celular, observándose una disminución luego del tratamiento con leptina. Todos estos resultados refuerzan la noción de la leptina como una importante citoquina placentaria, con la función de promover la supervivencia de las células trofoblásticas.

**542. (110) EL RECEPTOR NUCLEAR PPAR $\alpha$  MODULA LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y LIPOPERÓXIDOS EN FETOS DE RATA SANA Y DIABÉTICA**

Martinez N.<sup>1</sup>; Mazzuco M.<sup>2</sup>; White V.<sup>3</sup>; Jawerbaum A.<sup>4</sup>  
 CEFYBO-CONICET-UBA, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 noraalicia\_martinez@hotmail.com

En la patología diabética, el desarrollo fetal se encuentra afectado por alteraciones metabólicas y de tipo pro-inflamatorio. El receptor nuclear PPAR $\alpha$  ejerce importantes efectos metabólicos y anti-inflamatorios, siendo el hígado un órgano blanco de su acción. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la activación de PPAR $\alpha$  regula la producción de óxido nítrico (NO) y lipoperóxidos en fetos en período de post-placentación y en el hígado de feto a término de ratas sanas (C) y diabéticas (D). La diabetes se indujo por administración neonatal de estreptozotocina. Fetos de ratas C y D en el día 14 de gestación e hígados fetales de ratas C y D en el día 21 de gestación, se incubaron durante 3 hs en presencia o ausencia de agonistas de PPAR $\alpha$  (LTB4 0,1  $\mu$ M y clofibrato 20 $\mu$ M). Se midieron los niveles de nitratos/nitritos (metabolitos estables de NO) y de lipoperóxidos determinados como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS). Se observaron niveles incrementados de NO en fetos de rata D (146%, p<0.001), sin evidenciar diferencias significativas en sus niveles por activación de PPAR $\alpha$ . Se observaron niveles incrementados de lipoperóxidos en fetos de rata D (66%, p<0,01), y la activación de PPAR $\alpha$  produjo una reducción de los TBARS en los fetos de rata D (45%, p<0,001). En el hígado de feto de rata D observamos un incremento tanto de NO (66%, p<0.05) como de TBARS (84%, p<0.001). LTB4 redujo los niveles de NO (66%, p<0,01) en los hígados de fetos de rata D, y ambos agonistas redujeron los niveles de TBARS en los hígados de dichos fetos (56-58%, p<0,05). Conclusiones: PPAR $\alpha$  es un receptor nuclear cuya activación regula la producción de NO y lipoperóxidos en fetos e hígados fetales de rata diabética, donde dichos parámetros están alterados.

**543. (205) EFECTOS DEL INHIBIDOR SELECTIVO DE CICLOOXIGENASA (COX)-2, CELECOXIB, Y DEL AGONISTA DEL RECEPTOR ACTIVADO POR PROLIFERADORES DE****PEROXISOMAS (PPAR)- $\gamma$ , ROSIGLITAZONA, SOBRE LA ENDOMETRIOSIS (EDT) EXPERIMENTAL IN-VITRO E IN-VIVO**

Olivares C.<sup>1</sup>; Ricci A.<sup>2</sup>; Bilotas M.<sup>3</sup>; Barañao R.<sup>4</sup>; Meresman G.<sup>5</sup>  
 IBYME<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 carlioliva@gmail.com

En trabajos previos hemos logrado inhibir el desarrollo de la EDT experimental utilizando celecoxib (Cele) tanto in-vitro como in-vivo. En el presente estudio, basándonos en resultados satisfactorios obtenidos en el tratamiento del cáncer, planteamos utilizar una estrategia combinada utilizando Cele con rosiglitazona (Rosi). Por un lado, se indujo EDT a ratones hembra BALB/c, a los cuales se comenzó a tratar por vía esofágica al día siguiente de la cirugía por 28 días (Cele 200mg/kg/día, Rosi 0.16mg/kg/día, Cele+Rosi o Control (C)). Se evaluó el N° y volumen de las lesiones desarrolladas. En las lesiones se evaluó apoptosis por TUNEL y proliferación celular y vascularización por inmunohistoquímica. Por otro lado, evaluamos los efectos de esta combinación de drogas sobre la proliferación celular de una línea endometrial (ECC-1), por la técnica de MTS. En el modelo in-vivo, se observó una disminución significativa del N° de lesiones luego de los tratamientos con Cele y Cele+Rosi (p<0.05 vs. C) y una reducción significativa de su volumen luego de todos los tratamientos (p<0.05 Cele y Rosi, p<0.001 Cele+Rosi, vs. C). Además, los tres tratamientos fueron efectivos en disminuir significativamente la proliferación celular (p<0.01 Cele, p<0.001 Rosi y Cele+Rosi, vs. C) así como la densidad vascular (p<0.05 vs. C) y aumentar significativamente la apoptosis (p<0.05 vs. C). En el modelo in-vitro, resultados preliminares indican que la combinación de Rosi con Cele disminuye la proliferación celular de manera más efectiva que cualquiera de las drogas por separado (p<0.05 Cele 100 $\mu$ M+Rosi 100 $\mu$ M vs. Cele 100 $\mu$ M y Rosi 100 $\mu$ M por separado). En este trabajo experimental, hemos obtenido resultados favorables utilizando estrategias que apuntan a interferir con los mecanismos etiopatogénicos de la EDT. Sin embargo, en vista de las recientes advertencias que existen sobre Rosi, es importante encontrar en un futuro, otra droga alternativa que pueda sustituirla con resultados similares.

**544. (450) LA MELATONINA PREVIENE EL PARTO PREMATURO INDUCIDO POR LPS EN RATONES BALB/C.**

Domínguez Rubio A.<sup>1</sup>; Cella M.<sup>2</sup>; Bariani V.<sup>3</sup>; Rosenstein R.<sup>4</sup>; Franchi A.<sup>5</sup>  
 Laboratorio de Fisiopatología de la Preñez y el Parto,  
 CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 apaudr@gmail.com

El nacimiento prematuro es la causa más importante de morbi-mortalidad perinatal a nivel mundial. De los procesos patológicos que han sido relacionados con el parto prematuro (PP), la infección y la inflamación intrauterina son las que se encuentran más frecuentemente asociadas al mismo. La melatonina (mel), un metoxindol con actividad antioxidante, previene las alteraciones en el crecimiento fetal y en la fisiología placentaria observadas en modelos de PP. En este trabajo analizamos si el tratamiento con mel puede prevenir el PP, y a su vez, determinamos si afecta los sistemas nitrérgico y de prostaglandinas. El modelo de PP utilizado consiste en la administración de dos dosis relativamente bajas de LPS en el día 15 de preñez de ratonas BALB/c, lo que provoca altos porcentajes de PP entre 10 y 12 hs después de la administración de la endotoxina, sin comprometer la supervivencia de la madre. Hembras de d15 de preñez fueron tratadas con LPS (i.p., 0,4 mg/kg a las 11 y 13 hs) o mel (i.p., 10 mg/kg, a las 9, 11, 13 y 15 h) o ambos. La administración de mel previno el PP inducido por LPS en el 100% de los casos estudiados (p<0,001). Se cuantificó la síntesis uterina de PGE2 y PGF2a (RIA) y la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS; radioconversión de arginina) cinco horas después de la última administración de LPS y la expresión de los rNAm de ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2) y NOSi (RT-PCR) en el tejido recolectado a las 3hs post última inyección de LPS. La mel revirtió parcialmente el aumento de la PGE2 inducido por LPS (d15+LPS+Mel, p<0,01 vs d15+LPS) e inhibió el incremento de la actividad de la NOS (d15+LPS+Mel, p<0,05 vs d15+LPS). La administración de LPS incrementó el rNAm de

COX-2 y de la NOSi, mientras que el tratamiento con mel, revirtió parcialmente el aumento del mensajero de la COX-2 ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que la melatonina podría contribuir a un nuevo abordaje terapéutico para la prevención del PP.

**545. (261) PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO LIBERADO POR LOS MACRÓFAGOS TESTICULARES EN LA APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS GERMINALES EN UN MODELO DE INFLAMACIÓN TESTICULAR EN LA RATA**

Jarazo Dietrich S.<sup>1</sup>; Fass M.<sup>2</sup>; Perez C.<sup>3</sup>; Lustig L.<sup>4</sup>; Theas M.<sup>5</sup>

*Instituto de Investigaciones en Reproducción, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
sabrina.jarazo@gmail.com

En el testículo normal, los linfomonocitos intersticiales, poseen un fenotipo pro-inflamatorio atenuado que contribuye a proteger a las células germinales (CG) de un ataque inmunológico. Sin embargo, en condiciones patológicas se activan y expresan un fenotipo pro-inflamatorio. Para estudiar los mecanismos involucrados en el daño testicular en respuesta a la inflamación, desarrollamos un modelo de inflamación crónica, la orquitis autoinmune experimental (OAE). Las características relevantes del cuadro son la presencia de un abundante infiltrado de macrófagos y linfocitos y apoptosis de las CG. Previamente en la OAE demostramos un aumento de la producción de óxido nítrico (ON) por los macrófagos testiculares (MT) concomitante con el inicio de la lesión testicular. El objetivo de este trabajo fue evaluar ex-vivo, la participación del ON liberado por los MT en la apoptosis de las CG. La OAE fue inducida por inmunización con antígenos espermáticos y adyuvantes (grupo experimental, E), además empleamos un grupo de ratas sin inmunizar (normales, N). Fragmentos de testículo (FT) de ratas N fueron co-cultivados con medio de cultivo solo o con MT aislados ("cell sorting") de ratas E en presencia del inhibidor competitivo de la ON sintasa, L-NAME (2mM), o de su isómero inactivo, D-NAME (2mM). El % de túbulos seminíferos (TS) con CG apoptóticas (TUNEL) fue mayor en los FT co-cultivados con los MT vs medio y disminuyó en presencia de L-NAME (media±ESM, medio:4.08±1.40, MT+D-NAME:33.87±3.99  $p < 0.001$ ; MT+L-NAME:19.29±3.09  $p < 0.05$ ); en concordancia la producción de ON (técnica de Griess) por los MT fue disminuida por el L-NAME (MT+D-NAME:4.05µM, MT+L-NAME:2.60). El dador de ON (DETA-NONOato, 2mM) indujo in vitro apoptosis de las CG de FT de ratas N (media±ESM, medio:3.48±1.39 %TS con CG apoptóticas, DETA:25.47±7.42  $p < 0.01$ ). En conclusión, demostramos que en la orquitis el ON generado por la activación de la ONS en los macrófagos del intersticio testicular induce apoptosis de las CG.

### FARMACOLOGÍA 3

**546. (113) COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA ACTIVACIÓN MUSCARÍNICA ENTRE CÉLULAS NIH3T3 BAJO ESTÍMULO INFLAMATORIO Y CÉLULAS TUMORALES SCA-9. PARTICIPACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASAS Y CICLOOXIGENASAS**

Maddaleno M.<sup>1</sup>; Español A.<sup>2</sup>; Sales M.<sup>3</sup>

*CEFYO-CONICET<sup>1 2 3</sup>*

aespan\_1999@hotmail.com

Se ha documentado que la inflamación crónica está asociada con patologías como el cáncer. Demostramos que en fibroblastos normales NIH3T3, la activación muscarínica modula la actividad de las óxido nítrico sintasas (NOS) y las ciclooxigenasas (COX). Investigamos comparativamente el efecto de la activación muscarínica en células tumorales SCA-9 y NIH3T3 tratadas 72 h con lipopolisacárido de *E. coli* (10 ng/ml) e interferón gama (0,5 ng/ml). La proliferación se determinó por MTT como porcentaje respecto de basal (100%); la actividad de NOS por el método de Griess y la actividad de COX por RIA de prostaglandina E2 (PGE2). El tratamiento con el agonista muscarínico carbacol (Carb) aumentó la proliferación con una concentración efectiva máxima de 10-

7M (148±4%) para NIH3T3 y de 10-9M (131±2%) para SCA-9 ( $p < 0.001$  vs. basal). El efecto se revirtió al preincubar con el antagonista muscarínico atropina (AT) (10-6M) o con los inhibidores enzimáticos: de NOS2, aminoguanidina (AG) (10-3M); de NOS3, I134 (10-5M); de COX, indometacina (INDO) (10-6M); de COX-2, NS-398 (10-5M) o del factor nuclear kB (NF-kB), IMD354 (5x10-6M) ( $p < 0.001$  vs. Carb). Comprobamos que el Carb estimuló la actividad de NOS en un 26±4% para NIH3T3 y en un 72±26% para SCA-9 ( $p < 0.001$  vs. basal). El efecto se revirtió en presencia de AT, AG, I134, INDO, NS398 e IMD354 ( $p < 0.001$ ). Además el Carb incrementó la producción de PGE2 en NIH3T3 (70±17%) y en SCA-9 (85±6%) ( $p < 0.001$  vs. basal) y este efecto se revirtió al preincubar las células con AT, INDO, NS-398 e IMD354 ( $p < 0.001$  vs. basal); pero mientras que en NIH3T3 la preincubación con AG e I134 redujo el efecto del Carb, en las SCA-9 lo incrementó. Concluimos que la estimulación muscarínica promueve la proliferación tanto en células normales NIH3T3 en condiciones inflamatorias como en células tumorales SCA-9. En este proceso que presenta un complejo "cross talk", participan enzimas inflamatorias como NOS-2 y COX-2 siendo regulado por NF-kB.

**547. (68) ROL DE LA NADPH OXIDASA Y COX-2 EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA MEDIADA POR BENZNIDAZOL EN UN MODELO DE LIGADURA Y PUNCIÓN CECAL (CLP)**

Ronco M.<sup>1</sup>; Ingaramo P.<sup>2</sup>; Francés D.<sup>3</sup>; Alvarez M.<sup>4</sup>; Carrillo M.<sup>5</sup>; Revelli S.<sup>6</sup>; Carnovale C.<sup>7</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental IFISE-CONICET; Facultad de Cs Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
tereronco@hotmail.com

En estudios previos demostramos en el hígado de ratones C57BL/6 sometidos al modelo de ligación y punción cecal (CLP) que el tratamiento con la droga anti-chagásica, Benznidazol (BZL) disminuye la actividad del factor nuclear kB (NFkB) y de la proteína p-38, involucrados en la expresión de COX-2 y activación de NADPH oxidasa respectivamente. Como objetivo nos plantemos analizar las posibles vías de señalización involucradas en la respuesta anti-inflamatoria del BZL, específicamente las que involucran al receptor TLR-4, NADPH oxidasa y COX-2. 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. Sham vs Sham+BZL no mostraron diferencias significativas. BZL disminuye la expresión del receptor TLR-4 analizado por western blot en membranas plasmáticas totales (Unidades Arbitrarias de Densitometría: Sham:160±4; CLP:305±17\*, CLP+BZL:70±5#). Se observó una disminución de la actividad de la enzima NADPH oxidasa en los animales tratados con BZL (estimado por el consumo de NADPH a 340nm durante 90s y expresado en pmol/mg/min; Sham:3,2±0,1, CLP:7,0±0,2\*, CLP+BZL:3,9±0,2#). BZL disminuyó los niveles de COX-2 analizado en lisado total hepático por western blot (Unidades Arbitrarias de Densitometría, Sham:117±7; CLP:197±5\*, CLP+BZL:90±2#). (\* $p < 0,05$  vs Sham; # $p < 0,05$  vs CLP). Nuestros resultados demuestran que BZL ejerce su efecto modulador de la respuesta inmune, en parte, disminuyendo la expresión del receptor TLR-4 que se asocia a una disminución de la actividad de NADPH oxidasa y de la expresión de COX-2.

**548. (310) CICLO REDOX DE O-NAFTOQUINONAS EN CITO-SOL DE HÍGADO DE RATA Y SU CORRELACIÓN CON LOS MECANISMOS DE CITOTOXICIDAD INDUCIDOS EN LA LÍNEA DE LINFOMA T MURINO EL-4.**

Di Rosso M.<sup>1</sup>; Barreiro Arcos M.<sup>2</sup>; Elingold I.<sup>3</sup>; Baptista Ferreira S.<sup>4</sup>; Ferreira V.<sup>5</sup>; Galleano M.<sup>6</sup>; Cremaschi G.<sup>7</sup>; Dubin M.<sup>8</sup>

*CEFYO-CONICET-UBA<sup>1 2 3 7 8</sup>; Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química, UFRJ, Río de Janeiro,*



Brasil<sup>4</sup>; Departamento de Química Orgánica, Instituto de Química, UFF, Río de Janeiro, Brasil<sup>5</sup>; Físicoquímica-PRALIB, FFyB, UBA-CONICET<sup>6</sup>  
emidirosso@gmail.com

Las naftoquinonas fueron estudiadas como agentes antitumorales, antivirales y tripanocidas. Entre ellas, se destacó la  $\beta$ -lapachona. El objetivo de este trabajo fue estudiar el mecanismo de acción de o-naftoquinonas (NQ's) tripanocidas, derivadas de la  $\beta$ -lapachona, en citosol de hígado de rata y su efecto sobre células del linfoma T murino EL-4. Las drogas estudiadas fueron: 2-fenil(e), 2-p-tolil(i), 2-(2,4-dimetilfenil)(L), 3,4-dihidro-benzocromeno-5,6-dionas y 2-fenil- $\beta$ -lapachona(m). La adición de estos compuestos a la fracción citosólica estimuló significativamente el consumo de oxígeno (medido polarográficamente) y la generación de anión superóxido en forma dependiente de la concentración (determinada por reducción del citocromo c parcialmente acetilado). Estos efectos fueron inhibidos significativamente con el agregado al medio de reacción de dicumarol, un inhibidor de la diáforasa citosólica (quinona-oxidoreductasa). Por ESR, en presencia de NADPH y de las drogas estudiadas, se detectó en la fracción citosólica una señal correspondiente al radical semiquinona. Por otro lado, comprobamos que los compuestos e, i y m inhibieron significativamente, a partir de la concentración 2  $\mu$ M, la proliferación celular de la línea EL-4 (cuantificada por el método de incorporación de timidina tritiada). Las células EL-4 teñidas con Hoescht 33342 o naranja de acridina y observadas por microscopía de fluorescencia, muestran una morfología nuclear compatible con procesos apoptóticos. Ensayos de citometría de flujo, marcando a las células con yoduro de propidio y anexina V-FITC, mostraron que las NQ's inducen la muerte celular por apoptosis, a partir de las 3 horas de incubación, corroborando los resultados previos. Estos datos indicarían la producción de un ciclo redox por las NQ's en citosol hepático, con producción de superóxido. Este mecanismo podría ser responsable de la inhibición de la proliferación y muerte celular por apoptosis en la línea de linfoma T EL-4.

- 549. (315) EFECTO DESACOPLANTE DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA MITOCONDRIAL HEPÁTICA POR NUEVAS NAFTOFURANQUINONAS CON ACTIVIDAD TRIPANOCIDA**  
Elingold I.<sup>1</sup>; Di Rosso M.<sup>2</sup>; Da Silva Júnior E.<sup>3</sup>; Ventura Pinto A.<sup>4</sup>; Dubin M.<sup>5</sup>  
CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1,2,5</sup>; Instituto de Química, Universidade de Brasília, 70910-970 Brasília, DF, Brazil<sup>6</sup>; Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais, U.F.R.J., 21944-971 Río de Janeiro, RJ, Brazil<sup>4</sup>  
mis10jerbos@hotmail.com

Las naftoquinonas son compuestos que participan en numerosas reacciones redox generando especies reactivas del O<sub>2</sub>, siendo las mitocondrias de mamífero y el kinetoplasto de tripanosomátidos, entre otros, importantes blancos de acción de estas drogas. En este trabajo estudiamos los mecanismos de acción de tres naftofuranquinonas (NFQs) semi-sintéticas con actividad tripanocida, en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Los compuestos denominados NPPN 3222, 3223 y 3226 inhibieron la lipoperoxidación mitocondrial NADH dependiente (LPO), en un 49%, 92% y 48% a 1  $\mu$ M, respectivamente. No produjeron efectos significativos sobre la actividad ATPasa en mitocondrias acopladas, desacopladas o mitocondrias acopladas en presencia de malato-glutamato (MG). Las drogas en presencia de MG, estimularon el consumo de oxígeno mitocondrial, determinado polarográficamente en el estado respiratorio 4 (E4) a 50  $\mu$ M, similarmente a otros desacoplantes de la fosforilación oxidativa como 2,4 DNP, gramicidina, FCCP o CCP. Este efecto no se revirtió para ninguna de las NFQs estudiadas, luego de la adición de 6-ketocolesterol (sustancia capaz de aumentar el potencial dipolo de membranas). Las mitocondrias incubadas en presencia de las NFQs y carboxiatractilato (inhibidor del antiporter ATP/ADP) o ciclosporina A (inhibidor del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial) no demostraron variación en el consumo de oxígeno del E4, respecto de lo observado en ausencia de dichos inhibidores. En presencia de succinato como

sustrato, la adición de NFQs estimuló el E4, mientras que el agregado de CNK inhibió dicho estímulo. Esto sugeriría que el incremento del E4 fue debido al efecto desacoplante y no al ciclo redox producido por las drogas en estudio. Este ciclo redox, sin embargo, podría explicar la inhibición de la LPO causada por las NFQs. Estos resultados sugieren que las NFQs desacoplan la fosforilación oxidativa mitocondrial por un mecanismo diferente a los desacoplantes típicos.

- 550. (369) EFECTO DE LA RISPERIDONA Y LA FLUOXETINA EN EL MOVIMIENTO Y LOS CAMBIOS NEUROQUÍMICOS EN PEZ CEBRA**  
Prieto M.<sup>1</sup>; Carreño Gutierrez H.<sup>2</sup>; Arévalo Arévalo R.<sup>3</sup>; Alonso S.<sup>4</sup>  
UNQ<sup>1</sup>; Dpto. de Biología Celular y Patología, Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, España<sup>2,3</sup>; Laboratorio de Biomembranas, UNQ<sup>4</sup>  
jimeprieto@gmail.com

Los niveles elevados de serotonina se han asociado con los trastornos generalizados del desarrollo (TGD). La serotonina está implicada en la regulación del desarrollo cerebral y la médula espinal. La droga antipsicótica risperidona (Risp) es uno de los fármacos más utilizados en el tratamiento de TGD. La Risp actúa bloqueando los receptores de serotonina, disminuyendo sus niveles. Por otra parte, se ha observado que niños tratados con un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina, por ejemplo fluoxetina (Flu), presentan valores más bajos en pruebas psicomotoras y comportamentales. En este trabajo, se han examinado los efectos de la Risp y la Flu sobre la actividad locomotora, la frecuencia cardíaca y el desarrollo cerebral en larvas de peces cebra. El estudio de estos parámetros brinda una idea de los efectos causados por la variación en los niveles de serotonina, permitiendo establecer una aproximación de la función de este neurotransmisor en las etapas tempranas de desarrollo. En cuanto a la actividad locomotora, se observó una disminución en los peces tratados con Risp y un incremento en los tratados con Flu. La naturaleza y el tiempo de prevalencia de estos movimientos indicarían que podría deberse a problemas en la etapa de desarrollo del SNC y no a un efecto farmacológico. No se observó cambios en la frecuencia cardíaca indicando que los cambios en la locomoción tendrían una naturaleza neurológica y no cardiovascular. Por otro lado, estudios inmunohistoquímicos y morfológicos revelaron que ambos tratamientos provocaron cambios en los patrones normales de construcción de la neuroanatomía en etapas del desarrollo. El establecimiento de conexiones neuronales requiere de la correcta diferenciación, crecimiento neuronal y actividad sináptica. Si la variación de la serotonina modifica alguno de estos factores, podrían producir trastornos del desarrollo. Por ello, el estudio de dichos parámetros permitirá abordar nuevas terapias para TGD.

- 551. (386) ANALISIS NEUROQUIMICO DE LA POTENCIACION DE LOS EFECTOS ANTIDEPRESIVOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA-3 CON FLUOXETINA**  
Laino C.<sup>1</sup>; García P.<sup>2</sup>; Fonseca C.<sup>3</sup>; Reines A.<sup>4</sup>  
IICSHUM, Universidad Nacional de la Rioja, ININFA-CO-CONICET-UBA<sup>1</sup>; Instituto Tecnología de Alimentos, INTA Castelar<sup>2</sup>; Departamento de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de la Rioja<sup>3</sup>; ININFA-UBA-CONICET, FFyB<sup>4</sup>  
carloslaino25@gmail.com

Recientes investigaciones han asociado a los ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ -3) con la fisiopatología de la depresión y con un potencial efecto antidepresivo. Previamente observamos que los  $\omega$ -3 tienen un efecto antidepresivo en ratas, el cual aumenta de manera aditiva o sinérgica al combinarlos con dosis antidepresivas o subefectivas de fluoxetina (FLX), respectivamente. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los tratamientos individuales y combinados sobre la composición de ácidos grasos cerebrales, sobre el balance serotoninérgico y los niveles de diferentes aminoácidos relacionados con la depresión y/o su tratamiento

farmacológico. El tratamiento con  $\omega$ -3, tanto en monoterapia como en combinación con FLX, incrementó los niveles hipocámpales del ácido  $\omega$ -3 docosahexaenoico (DHA) sin modificar los niveles de  $\omega$ -6. El tratamiento con  $\omega$ -3 no modificó el balance serotoninérgico. A dosis antidepressiva (10 mg/kg), la FLX disminuyó los niveles del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) en el hipocampo sin modificar los de serotonina (5-HT). Contrariamente, la dosis subefectiva (1 mg/kg) de FLX aumentó la 5-HT en el hipocampo sin modificar el 5-HIAA. Los tratamientos combinados de  $\omega$ -3 con FLX generaron un perfil idéntico al tratamiento individual con FLX. En cuanto al efecto sobre aminoácidos cerebrales, el tratamiento con FLX 1 mg/kg aumentó los niveles corticales de taurina y glutamina; efecto que desapareció al combinarla con  $\omega$ -3. Estos resultados indican la efectividad del tratamiento con  $\omega$ -3 para modificar la composición de las membranas cerebrales, puesta de manifiesto por el incremento hipocámpal de DHA. También sugieren que la neurotransmisión serotoninérgica no participa en el efecto antidepresivo de los  $\omega$ -3, ni en los efectos beneficiosos de los tratamientos combinados y que cambios en la concentración hipocámpal de taurina y glutamina podrían estar involucrados en la potenciación del efecto antidepresivo de los  $\omega$ -3 con dosis subefectivas de FLX.

**552. (698) ACORTAMIENTO DEL TIEMPO DE SUEÑO INDUCIDO POR BARBITÚRICO EN RATONES TRATADOS ORALMENTE CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE BACCHARIS CRISPA (JAGUARETE KA'A)**

Pereira Brunelli M.<sup>1</sup>; Velazquez A.<sup>2</sup>; Mallorquin Espinola Z.<sup>3</sup>  
Dpto de Farmacología, Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Nacional de Asunción<sup>1,2,3</sup>  
teti.pb@gmail.com

Desde la antigüedad, las plantas medicinales han sido empleadas por el hombre como agentes terapéuticos frente a varias patologías. Esta práctica es importante puesto que amplía el arsenal terapéutico y su empleo carece de efectos secundarios significativos. El objetivo es determinar la dosis letal aguda (DL50), la influencia sobre el comportamiento y el tiempo de sueño inducido por barbitúrico en ratones tratados con el extracto hidroalcohólico *Baccharis crispa* (EHABc) para posterior validación del uso popular. El estudio fue experimental, se obtuvo el EHABc empleando el método de reflujo convencional, el material obtenido fue utilizado en los ensayos biológicos. Para hallar la DL50 del EHABc se utilizó el procedimiento de dosis fijas, para observar la influencia sobre el comportamiento general y el tiempo de sueño barbitúrico en ratones, fue empleado el método de Irwin y el método de Carlini respectivamente. El método estadístico utilizado fue el Test de Comparación Multiple Tukey's el ensayo no produjo mortalidad ni síntomas indicativos de toxicidad en los animales estudiados. Las dosis de 5, 50 y 500 mg/kg del EHABc provocaron acortamiento significativo de tiempo de sueño inducido por 40 mg/Kg vía i.p. de pentobarbital en ratones de ambos sexos, de manera no dependiente a la dosis. La intensidad del efecto es semejante al inducido por 30 mg/kg de cafeína; por tanto denota una actividad similar al estimulante central, pero el mecanismo de acción es aún desconocido. Se concluye que la Dosis Letal 50 (DL50) oral del EHABc, es superior a 3000 mg/kg de peso corporal, lo que comprueba su seguridad. No se apreciaron variaciones de la actividad general; ni se denotaron signos de intoxicación y daños anatomomorfológicos en órganos internos con las dosis utilizadas, luego de la administración de dosis única, y observados por 14 días. Las dosis de 5, 50 y 500 mg/kg del EHABc acortan el tiempo de sueño barbitúricos indicando un efecto compatible con la acción estimulante.

**553. (394) ENSAYOS DE TOXICIDAD POR DOSIS ÚNICAS Y DE EFECTOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN DOS ESPECIES DE ROEDORES, DE TRES PLANTAS ARGENTINAS CON ACTIVIDAD INSECTICIDA.**

Miño J.<sup>1</sup>; Tarcaya V.<sup>2</sup>; Cufre I.<sup>3</sup>; Broussalis A.<sup>4</sup>  
FFyB - UBA<sup>1,2,3,4</sup>  
jmimo@ffyb.uba.ar

Introducción. *Hybanthus parviflorus*, *Hybanthus bigibbosus* (Violaceae) y *Ovidia andina* (Thymelaeaceae) presentan actividad

insecticida sobre *Ceratitis capitata* Wied. (Broussalis et al., Crop Protection 29:953-6, 2010) y *Tribolium castaneum*. Objetivos: 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 roedores. Materiales y métodos. 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 la toxicidad aguda en 24hs hasta los 5g/kg. Los efectos sobre SNC se estudiaron en ratones: 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 la irritación primaria dérmica (IPD) y la ocular por el método de Draize.

Resultados. 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*

Columnas: media ± ES. \*p<0.001 (ANOVA-Test de Bonferroni). El tratamiento post trial en el test de RREI no afectó el aprendizaje. Ninguno de los extractos produjo irritación ocular pero sí una leve irritación primaria dérmica. Conclusiones. De acuerdo a los resultados se concluye que *H. parviflorus* y *H. bigibbosus* no son tóxicas y no presentan efectos adversos sobre SNC. *O. andina* no produce mortalidad aunque sí efectos depresores sobre el SNC. Las tres especies no producen irritación ocular pero generan una leve irritación dérmica. Investigación financiada con aportes del proyecto UBACYT-B404

## NEUROCIENCIAS 6

**554 (139) EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO EN EL METABOLISMO DE 2-ARAQUIDONOILGLICEROL EN FRACCIONES DE MEMBRANA Y SOLUBLE DE CORTEZA CEREBRAL DE RATA**

Pascual A.<sup>1</sup>; Giusto N.<sup>2</sup>; Pasquaré S.<sup>3</sup>  
INIBIB-UNS-CONICET<sup>1,2,3</sup>  
apascual@criba.edu.ar

El 2-araquidonoilglicerol (2-AG), componente importante del sistema canabinoide, es sintetizado en terminales postsinápticas por las enzimas diacilglicérido lipasa (DAGL) y lisofosfatidato fosfohidrolasa (LPAasa). En su degradación participan la monoacilglicérido lipasa (MAGL), la ácido graso amidohidrolasa (FAAH) y la serina hidrolasa ABHD6. El objetivo del trabajo fue evaluar la contribución de las distintas vías de síntesis y degradación de 2-AG y como eran modificadas por el envejecimiento. Se emplearon fracciones de membrana y soluble de corteza cerebral (CC) de ratas adultas (4 meses) y seniles (28 meses), las cuales fueron obtenidas por centrifugación diferencial. Para la determinación de las actividades de DAGL, MAGL y LPAasa se emplearon sustratos radiomarcados con tritio de diferente composición en acilos. Los productos monoacil[3H]glicerol y [3H]glicerol fueron cuantificados previa separación por CCF o a partir de la fase acuosa, respectivamente. Se observó que la vía de síntesis más activa es la de la LPAasa siendo mayor en la fracción de membrana; actividad que disminuye en el envejecimiento. Empleando como sustrato DAG rico en ácido graso 20:4, pudo observarse una mayor asociación de la DAGL a la membrana por efecto del envejecimiento. La degradación de 2-AG en membrana es similar a la del soluble y no se ve modificada por el envejecimiento. La utilización de URB-602 (inhibidor de la MAGL) y de URB-597 (inhibidor de la FAAH) nos permitió evidenciar que la degradación de 2-AG en membranas adultas es llevada a cabo por la ABHD6 y por la MAGL, siendo la primera la única responsable en la degradación del canabinoide en seniles. Nuestros resultados demuestran una regulación controlada del metabolismo de 2-AG, la cual se ve modificada en el envejecimiento fisiológico.

**555. (156) CAMBIOS ASTROGLIALES EN EL HIPOCAMPO DE RATONES TRANSGÉNICOS PARA LA APP Y EFECTOS DEL ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL.**

Beauquis J.<sup>1</sup>; Pavía P.<sup>2</sup>; Roig P.<sup>3</sup>; Galván V.<sup>4</sup>; De Nicola A.<sup>5</sup>; Saravia F.<sup>6</sup>

*Dpto de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>2</sup>; IBYME, CONICET<sup>1,3,6</sup>; University of Texas Health Science Center at San Antonio, USA<sup>4</sup>; Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA, IBYME, CONICET<sup>5</sup>*  
juanbeauquis@gmail.com

Es conocido el rol protector de la estimulación ambiental sobre la evolución de la enfermedad de Alzheimer (AD). En el presente trabajo, nuestro objetivo fue estudiar los efectos del enriquecimiento ambiental en un modelo animal de la AD, haciendo énfasis en las alteraciones de la astrogliosis en el hipocampo. Utilizando este modelo previamente hemos descrito un déficit en la neurogénesis adulta, el cual es reversible mediante la exposición a un ambiente enriquecido (EE). Utilizamos ratones hembras transgénicas (Tg, PDAPP-J20) que expresan una forma mutante de la proteína precursora de amiloide (APP) con las mutaciones Swe e Ind y las hermanas no transgénicas (NTg) como controles, alojándolos en un ambiente enriquecido (EE) o en condiciones estándar (SC) por 3 meses (5 a 8 meses de edad). Los niveles cerebrales de los péptidos solubles de beta amiloide (AB) disminuyeron en los Tg en EE comparados con los Tg en SC ( $P < 0,05$ ). El EE no tuvo efecto sobre el número de placas AB en el hipocampo. Utilizando inmunohistoquímica para GFAP y microscopía confocal estudiamos la densidad y el volumen de los astrocitos en el hipocampo. Encontramos una menor densidad de astrocitos en el área CA1 en los Tg ( $P < 0,01$  vs NTg) y un aumento ante la exposición al EE ( $P < 0,05$ ). El volumen celular fue estimado en 2 subpoblaciones de astrocitos: asociados a placas amiloides (PA) y no asociados a placas (NPA). El análisis reveló que los astrocitos PA exhibieron un mayor volumen que los controles ( $P < 0,001$ ), sugiriendo mayor reactividad. Los astrocitos NPA mostraron un volumen disminuido en los Tg en SC ( $P < 0,05$  vs NTg), lo cual fue revertido por el EE ( $P < 0,05$ ). Nuestros resultados indican que la atrofia astrogliosis está presente en el hipocampo en este modelo animal. El enriquecimiento ambiental logró revertir este fenómeno, sugiriendo la relevancia de esta estrategia en la evolución de la AD al modular no solo poblaciones neuronales sino también astrogliosis.

**556. (274) EFECTO DEL GLAUCOMA SOBRE EL SISTEMA CIRCADIANO**

De Zavalía N.<sup>1</sup>; Lanzani F.<sup>2</sup>; Plano S.<sup>3</sup>; Fernandez D.<sup>4</sup>; Belforte N.<sup>5</sup>; Salido E.<sup>6</sup>; Keller Sarmiento I.<sup>7</sup>; Golombek D.<sup>8</sup>; Rosenstein R.<sup>9</sup>

*Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmológica Experimental, Dpto de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, CEFYBO-CONICET-UBA<sup>1,2,4,5,6,7,9</sup>; Laboratorio de Cronobiología, UNQ-CONICET<sup>3,8</sup>*  
nuriaz@gmail.com

El glaucoma, una de las principales causas de ceguera, se caracteriza por la pérdida progresiva de células ganglionares retinianas (CGR) y el daño irreversible del nervio óptico. El objetivo de este trabajo fue evaluar el sistema visual no formador de imagen en un modelo experimental de glaucoma en ratas (inducido por inyecciones de condroitin sulfato (CS)), así como la fisiología circadiana en pacientes con glaucoma avanzado. Se inyectó CS (40%) o vehículo en forma uni- o bilateral en la cámara anterior del ojo de ratas Wistar macho adultas durante 10 semanas. El CS indujo una disminución significativa en los niveles de melanopsina (Western blot) y una disminución (~ 40%) en el número de células que expresan melanopsina (similar a la del total de CGR (inmunohistoquímica, ambos  $p < 0,01$ )), en el reflejo pupilar aferente ( $p < 0,01$ ) y en la expresión de cFos inducida por un pulso de luz en los núcleos supraquiasmáticos (inmunohistoquímica,  $p < 0,01$ ). Un pulso de luz blanca a medianoche indujo una disminución significativa en el contenido de melatonina pineal en animales control y glaucomatosos, mientras que un pulso de luz azul disminuyó este parámetro sólo en ratas control (RIA,  $p < 0,01$ ). Los animales

glaucomatosos fueron capaces de sincronizar a un ciclo normal de 24 h, pero con un retraso significativo en el inicio de la actividad respecto al apagado de las luces. El porcentaje de actividad locomotora en la fase fótica fue mayor en los animales con glaucoma que en los controles ( $p < 0,01$ ). Se evaluó la actividad diaria (por actigrafía) en 9 sujetos control y 9 pacientes con glaucoma avanzado. En los pacientes con glaucoma se observó una disminución significativa en los minutos de sueño y un aumento significativo en los minutos de vigilia y en los episodios de vigilia durante la noche respecto a los controles ( $p < 0,05$ ). Estos resultados sugieren que el glaucoma no sólo afecta las funciones visuales clásicas, sino también el sistema visual no formador de imagen.

**557. (40) VALIDACIÓN DE UN TEST DE REACCIÓN PSICOMOTORA EN UNA PLATAFORMA NETBOOK**

Agostino P.<sup>1</sup>; Bussi I.<sup>2</sup>; Diez J.<sup>3</sup>; Pérez Lloret S.<sup>4</sup>; Golombek D.<sup>5</sup>; Pérez Chada D.<sup>6</sup>; Cardinali D.<sup>7</sup>; Vigo D.<sup>8</sup>

*Laboratorio de Cronobiología, Dpto de Ciencia y Tecnología, UNQ-CONICET<sup>1,2,5</sup>; Depto. de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, CONICET<sup>3,4,8</sup>; Depto. de Neumonología, Hospital Universitario Austral<sup>6</sup>*  
pagostino@gmail.com

Introducción: el test de reacción psicomotora (PVT) basado en plataformas Palm (Palm-PVT) es utilizado en pruebas psicométricas para cuantificar el grado de alerta de un sujeto. Debido a la discontinuación de estas computadoras de mano, hemos diseñado un PVT basado en las características del Palm-PVT sobre una plataforma netbook (Net-PVT). Objetivo: validar el Net-PVT. Diseño del Estudio: se administraron ambos tests en orden aleatorio a un grupo de 17 sujetos sanos. El test mide el tiempo de reacción psicomotora ante la aparición repetida de un estímulo luminoso durante 5 minutos. Se obtuvieron la media (MRT) y el coeficiente de variación (CVRT) de los tiempos de reacción. Se compararon dichos indicadores entre ambos tests, para estimar exactitud (diferencia media entre Palm-PVT y Net-PVT) y precisión (IC95% de la diferencia media) del Net-PVT. Se determinó la significancia estadística de las diferencias mediante un test de T para muestras pareadas. Cuando la diferencia media fue significativa, se determinó la correlación de Pearson de las diferencias individuales con el fin de evaluar si éstas son sistemáticas. Resultados: las diferencias medias entre ambos tests fueron: MRT = 32 ms, IC95%: 24 ms - 41 ms,  $p < 0,001$ ; CVRT = 2.7 %, IC95%: -7.0 % - 12.3 %,  $p = 0,564$ . La correlación de MRT entre Palm-PVT y Net-PVT fue de  $r = 0,825$ ,  $p < 0,001$ . Conclusiones: la diferencia media de MRT en favor del Net-PVT, indica que este dispositivo es más rápido en comparación al Palm-PVT, observándose un buen grado de correlación entre ambas mediciones. La diferencia media de CVRT entre ambos dispositivos no fue significativa. Por lo tanto, concluimos que el Net-PVT es una alternativa válida para la medición del tiempo de reacción psicomotora en sujetos sanos.

**558. (185) CUERPO CALLOSO EN IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA DEL PLANO SAGITAL MEDIO: RELACIONES DE DOMINANCIA DE ZONAS DE SUPERFICIE CON LA EDAD EN AMBOS SEXOS (PARTE 2)**

Miño J.<sup>1</sup>; Gómez E.<sup>2</sup>; Albanese A.<sup>3</sup>; Albanese E.<sup>4</sup>; Merlo A.<sup>5</sup>  
*Facultad de Medicina, USAL<sup>1,2,3,4,5</sup>*  
jmino@usal.edu.ar

En SAIC 2011 mostramos que superficies de zonas del cuerpo calloso (CC) en el plano sagital medio de resonancia magnética, no difieren significativamente entre sexos. En ambos sexos disminuyen a partir de los 61 años. Cabe destacar que estos valores corresponden a medias  $\pm$  ES de grupos de datos de cada superficie pero no muestran las relaciones entre superficies de cada caso. Para tener en cuenta variaciones individuales entre superficies anterior y posterior y de allí las variaciones por sexo y edad, utilizamos el cálculo de la relación de dominancia (rD) (1) OBJETIVO: Consignar las variaciones de superficie anterior vs. posterior del CC en grupos de ambos sexos y rangos de edad utilizando la diferencia porcentual individual entre la superficie

anterior y la posterior y calcular luego la relación de dominancia rD del grupo. MATERIAL Y MÉTODO: Con valores de la superficie anterior (incluye el genu) vs. Posterior (incluye el esplenio) del CC mostrados en SAIC 2011 de 48 sujetos femeninos y 48 masculinos se calcularon las rD por sexo y rangos de edad (41-60 y 61-84 años). La rD está basada en la correlación no paramétrica de Spearman. Las variables que se enfrentan en la correlación son la diferencia porcentual entre la superficie anterior y posterior con su signo (positivo si es mayor la anterior y negativo si es mayor la posterior) y el correspondientes valor absoluto. Su rango está comprendido entre -1 y +1. Su signo resulta positivo si la dominancia es anterior y negativo si es posterior. RESULTADOS: Los valores de rD en los rangos de 41-60 y 61-84 años del grupo femenino son 0.23 y -0.77 ( $p < 0.01$ ) y del masculino 0.29 y -0.05 ( $p < 0,05$ ). CONCLUSIÓN: Superficies (anterior que incluye el genu y posterior que incluye el esplenio) de la imagen de resonancia magnética del plano sagital medio del CC experimentan en ambos sexos variaciones similares con el avance de la edad con aumento de la dominancia posterior.

**559. (536) S100B ES UNA PROTEÍNA DE TIPO DAMP (DAMAGE ASSOCIATED MOLECULAR PATTERN) QUE ACTIVA UN LOOP DE SEÑALIZACIÓN AUTÓCRINO DEPENDIENTE DE RAGE Y NFκB EN ASTROCITOS**

Villarreal A.<sup>1</sup>; Gonzalez Torres M.<sup>2</sup>; Seoane R.<sup>3</sup>; Avilés Reyes R.<sup>4</sup>; Angelo M.<sup>5</sup>; Rossi A.<sup>6</sup>; Barker P.<sup>7</sup>; Ramos A.<sup>8</sup>  
Laboratorio de Neuropatología Molecular IBCN, Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 8</sup>; McGill University, Montreal Neurological Institute<sup>7</sup>  
avillarreal.med@gmail.com

S100B es una proteína abundante en el citoplasma de los astrocitos. Luego de la isquemia cerebral, S100B se libera masivamente al espacio extracelular desde el core isquémico. En el espacio extracelular S100B actúa a través de su receptor RAGE expresado en neuronas y células de la glía para inducir la activación de NFκB. Así, se ha planteado la hipótesis de que S100B actuaría como una proteína tipo DAMP (Damage Associated Molecular Pattern) capaz de activar las células de la astrogliá y microglia, efectores de la inmunidad innata en el SNC. Con el objetivo de estudiar los efectos de S100B extracelular sobre los astrocitos y las rutas de señalización que S100B activa, utilizamos cultivos primarios de astrocitos de rata, que fueron expuestos a S100B (50nM y 1μM) por diferentes periodos de tiempo y luego estudiados por inmunoblot o inmunocitoquímica. En otra serie de experimentos se utilizaron astrocitos transfectados con un plásmido reportador de actividad de NFκB o plásmidos reporteros del promotor de RAGE. La proliferación se midió por incorporación de bromodioxiuridina. Los ensayos de pérdida de función se realizaron con anticuerpos neutralizantes anti-RAGE, con un inhibidor químico de NFκB (sulfasalazina, SFZ) o la transfección de un DN-Sp1. S100B aumentó la proliferación astrogliá e incrementó la complejidad de las prolongaciones gliales, en forma RAGE dependiente. La exposición a S100B también promovió la translocación nuclear de NFκB y la actividad del plásmido reportador de NFκB. S100B incrementó la actividad del promotor proximal de RAGE y su expresión, en una forma NFκB y Sp1 dependiente. Concluimos que la exposición a S100B reproduce in vitro características típicas de la gliosis reactiva (hiperplasia, hipertrofia) y activa NFκB en forma dosis dependiente. Más aún, S100B estimula la expresión de su propio receptor RAGE, dando lugar a una retroalimentación positiva que es capaz de expandir la respuesta inflamatoria, comportándose como un clásico DAMP.

## GENÉTICA 2

**560. (15) CITRULINEMIA TIPO 1, VARIANTE CLÁSICA: ESTUDIO GENÉTICO POBLACIONAL EN UN ÁREA ARGENTINA DE RIESGO. PROYECCIÓN DE UN PROGRAMA CONDUCTENTE A LA DETECCIÓN PRECONCEPCIONAL DE HETEROCIGOTAS**

Silvera Ruiz S.<sup>1</sup>; Laróvere L.<sup>2</sup>; Angaroni J.<sup>3</sup>; Dodelson De Kremer R.<sup>4</sup>  
CEMECO- Hospital de Niños de Córdoba<sup>1 2 3 4</sup>  
silene\_cba@hotmail.com

La Citrulinemia Clásica (CTLN1), enfermedad de herencia autosómica recesiva, se presenta con un inicio neonatal / infantil y conduce por lo general a hiperamonemia, coma y muerte si no es tratada a tiempo. CTLN1 es causada por mutaciones en el gen ASS1. La Argininosuccinato sintetasa es una de las enzimas que intervienen en el Ciclo de la Urea. Previamente, identificamos la sustitución p.G390R en el gen ASS1 en pacientes con CTLN1 de la Provincia de San Luis, Argentina (J Clin Biochem., 42:10-11, 2009). En este trabajo, se reportan los resultados del análisis de la mutación en un número mayor de pacientes y en miembros de las familias involucradas, así como un estudio poblacional destinado a la identificación de portadores. En total, se analizaron 420 alelos, pertenecientes a 12 probandos, 26 familiares y 172 voluntarios sanos. El análisis molecular de p.G390R-ASS1 incluyó amplificación por PCR y ensayos de restricción enzimática. Todos los pacientes (n= 12) fueron homocigotos para la mutación, 21 familiares resultaron portadores y 5 normales. La ocurrencia de la enfermedad en los descendientes de las parejas de riesgo fue del 57% mostrando una transmisión preferencial del alelo mutado frente al normal. El estudio poblacional en la zona de riesgo mostró una frecuencia de portadores de 4,1% o 1/25 habitantes, y la estimación de la incidencia de CTLN1 fue de 1:2427 RN, número aproximadamente veinte veces mayor que el calculado para la población en general. El objetivo de este trabajo fue dar basamento a la proyección de un programa preconcepcional de identificación de portadores de CTLN1 en los individuos/parejas de la región de riesgo para brindarles un asesoramiento preciso respecto a sus opciones reproductivas.

**561. (30) RETINOBLASTOMA: ANÁLISIS MOLECULAR DE UNA FAMILIA CON UNA MUTACIÓN NOVEL DE BAJA PENETRANCIA.**

Ottaviani D.<sup>1</sup>; Parma D.<sup>2</sup>; Ferrer M.<sup>3</sup>; Giliberto F.<sup>4</sup>; Szijan I.<sup>5</sup>  
Genética y Biología Molecular, Hospital de Clínicas, UBA<sup>1 2 4 5</sup>; Neurocirugía, Hospital de Clínicas<sup>3</sup>  
danielaottaviani4@hotmail.com

El retinoblastoma (RB), cáncer ocular de la niñez, puede ser hereditario (40%) con alta penetrancia (90%) o no hereditario (60%). Se origina por mutaciones en el gen RB1 (13q14) que incluyen mutaciones puntuales, deleciones o inserciones de pocas pb (80%) y grandes rearrreglos: deleciones o duplicaciones (20%). Es importante identificar la mutación en el paciente de modo que permita la detección precoz de familiares susceptibles de padecer RB y llevar a cabo un tratamiento temprano. El objetivo es el estudio de una familia con 2 afectados unilateralmente, que permitirá identificar a los individuos en riesgo de desarrollar el tumor y/o de transmitirlo a su descendencia. En primera instancia se analizó la segregación de 6 polimorfismos intragénicos en la familia, para determinar el haplotipo de riesgo. En una segunda etapa, se realizó la secuenciación de la región promotora y los 27 exones del gen RB1, y el análisis de MLPA. El análisis de haplotipos permitió identificar el de riesgo, común a los 2 afectados, y así mismo permitió detectar a 2 portadores asintomáticos: la hija de uno de los afectados, y el hermano y padre de los individuos afectados en la familia. El análisis de MLPA mostró resultados compatibles con los controles normales utilizados, en ambos individuos afectados. El análisis de secuenciación reveló una sustitución de bases en la región proximal del promotor, en los cuatro integrantes de la familia que comparten el mismo haplotipo. La sustitución de bases (g.1868G>A) ocurrió 192 pb antes del sitio de inicio de la traducción (primer codón ATG) y coincide con el sitio de unión del factor de transcripción ATF, lo cual afectaría la expresión normal del gen RB1 y la función de la proteína pRb en el control del ciclo celular. La mutación encontrada en esta familia, es una mutación germinal novel de baja penetrancia que no produciría la ausencia total de la proteína pRb dada la presencia de 2 individuos afectados unilateralmente y 2 portadores asintomáticos.

**562. (138) ESTUDIO FUNCIONAL DE MUTACIONES NOVELES EN EL GEN CYP21A2**

Taboas M.<sup>1</sup>; Ceballos N.<sup>2</sup>; Dain L.<sup>3</sup>  
 Centro Nacional de Genética Médica<sup>1</sup>; Dpto de Biodiversidad y Biología Experimental, FCEN, UBA<sup>2</sup>; Centro Nacional de Genética Médica; IBYME<sup>3</sup>  
 mel\_taboas@yahoo.com.ar

En trabajos previos hemos detectado en nuestra población la presencia de mutaciones noveles en pacientes afectados por Hiperplasia Suprarrenal Congénita por deficiencia en la enzima 21 hidroxilasa (21OHasa). El objetivo del presente trabajo fue realizar el estudio funcional de la actividad residual de 3 de las mutaciones halladas en pacientes No Clásicos (NC). Las variantes en estudio fueron creadas mediante mutagénesis dirigida sobre un vector pCMV4 conteniendo el ADN copia salvaje de CYP21. Dado que uno de los pacientes poseía una mutación ya descrita (p.D322G) en el mismo alelo que la mutación novel, se realizó la mutagénesis de las variantes en forma aislada y en forma combinada. Los vectores así obtenidos, el vector salvaje y el sin inserto (Mock) fueron transfectados en células COS-7 junto con un plásmido de  $\beta$ -galactosidasa para relativizar la eficiencia de transfección. La expresión de la proteína se estudió mediante Western Blot y la actividad enzimática se estimó por conversión de progesterona (P) y 17hidroxiprogesterona (17OHP) radioactivas en sus productos, separación por cromatografía en placa delgada y conteo de la radioactividad resultante. Los resultados obtenidos hasta el presente indican una actividad enzimática residual (AR) de: p.R132C=32,3%, p.R149C=67,8%, p.E431K=23,4%, p.D322G=50,7% y p.D322G + p.E431K=1,8%, para P como sustrato. Usando 17OHP, la variante p.R132C mostró una AR=47,8%. Estos resultados indican una disminución moderada de la actividad enzimática para las mutaciones en forma individual que predicen alelos relacionados a la forma NC. Para las variantes p.E431K + p.D322G, se observa un efecto sinérgico de ambas mutaciones que predice un alelo severo relacionado con la forma clásica de la enfermedad.

**563. (281) CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL MÓDULO RCCX EN LA 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>; Pasquallini T.<sup>6</sup>; Charreau E.<sup>7</sup>; Alba L.<sup>8</sup>; Dain L.<sup>9</sup>  
 Centro Nacional de Genética Médica (CENAGEM-ANLIS); IBYME-CONICET<sup>1,2,7,8,9</sup>; División Endocrinología, Hospital Durand<sup>3,4,5</sup>; Servicio de Pediatría, Hospital Italiano<sup>6</sup>  
 cecisolfer@gmail.com

El gen CYP21A2 codifica para la enzima 21-hidroxilasa siendo su deficiencia la principal causa de Hiperplasia Suprarrenal Congénita. Las mutaciones presentes en la deficiencia, ocurren como resultado de recombinaciones entre el gen y el pseudogen CYP21A1P (98% de identidad de secuencia), ambos ubicados en tándem junto con los genes C4A y B, dentro del módulo RCCX. El objetivo de este trabajo fue la caracterización del módulo RCCX en pacientes con Deficiencia de 21-hidroxilasa. La muestra consistió en 224 pacientes (166 no clásicos, 55 clásicos y 3 crípticos) y 29 familiares. El ADN genómico fue digerido con Taq I y Bgl II y las membranas hibridadas con sondas para los genes CYP21A1/2, TNXA/B y C4A/B. Algunos pacientes se analizaron además por MLPA. Se caracterizaron y genotipificaron completamente 211/224 pacientes (404 alelos no relacionados). Se identificaron 9 haplotipos diferentes: 46 alelos monomodulares (18 y 28 por delección del módulo que contiene al gen y al pseudogen, respectivamente); 218 alelos bimodulares (7 portadores de conversiones génicas); y 140 alelos trimodulares (2 por duplicación del módulo del gen y 138 por duplicación del módulo del pseudogen, 4 además, portadores de conversiones génicas). Observamos que el 73% de los pacientes caracterizados (154/211) era portador de al menos un alelo con alguna alteración en el número o composición modular. Nuestro trabajo nos permitió evidenciar una elevada variabilidad en la región del módulo RCCX. La aplicación de diferentes técnicas posibilita una caracterización molecular más precisa de este complejo locus.

**564. (301) ESTUDIO DE LA FISIOPATOLOGÍA MOLECULAR DEL HIPOTIROIDISMO CONGENITO EN FAMILIAS AFECTADAS POR BLOQUEO DE ORGANIFICACIÓN DE IODO. ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENES DE TPO Y DUOX2.**

Belforte F.<sup>1</sup>; Olcese M.<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, FFyB, UBA<sup>1,2,3,4</sup>; Servicio de Endocrinología, Hospital de Niños Santísima Trinidad, Córdoba<sup>4,5</sup>; CEDIE-CONICET, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez<sup>6</sup>; Unidad de Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca<sup>7,8,9</sup>  
 fiorellabelforte@hotmail.com

El hipotiroidismo congénito presenta en nuestro país una prevalencia de 1/2100 cuyo 10% corresponde a Defectos de Organización de Iodo (IOD). Con un modo de herencia autosómico recesivo, mutaciones en el gen de tiroperoxidasa (TPO) y genes del Sistema DUOX son la causa más frecuente de IOD. En el presente trabajo se buscó identificar nuevas mutaciones en los genes de TPO y dual oxidasa 2 (DUOX2) a partir de 16 familias no relacionadas con diagnóstico clínico y bioquímico de IOD. Se amplificaron por PCR el promotor, 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. La evaluación de la estructura 2ria y 3ria de las proteínas mutadas se analizó mediante estudios "in silico" y se exploró el grado de conservación evolutiva de las mismas en distintas especies. Se identificaron cinco nuevas mutaciones en el gen de TPO: p.Q266X; p.G667D, p.R595K; p.V748M y g.IVS16 -2 A>C. Así mismo, dos mutaciones ya descritas p.R396fsX472 y p.C808fsX879 fueron evidenciadas. En Duox2 se encontró una nueva mutación heterocigota p.A1088fs1100. Esto permitió genotipificar 4 familias: un compuesto heterocigota p.Q266X/p.G667D, dos dobles heterocigotas para p.R595K/p.R396fsX472 y un homocigota p.R595K/ p.R595K. Las mutaciones p.V748M y g.IVS16 -2 A>C fueron encontradas en forma heterocigota en pacientes no relacionados. El modelado 3D de TPO mostró alteración de interacciones aminoacídicas y cambios netos en las superficies electrostáticas de las TPO mutantes respecto de la "wilde type". El preciso análisis de la fisiopatología molecular del Hipotiroidismo Congénito permite tanto la instauración temprana de reemplazo hormonal como el adecuado asesoramiento genético a las familias afectadas permitiendo identificar portadores de mutaciones asintomáticos con riesgo de hipotiroidismo recurrente.

**NEUROCIENCIAS 7****565. (219) IDENTIFICACIÓN DEL SUBTIPO DE RECEPTOR P2Y INVOLUCRADO EN LA INHIBICIÓN PRESINÁPTICA INDUCIDA POR ATP/ADP**

Guarracino J.<sup>1</sup>; Palma A.<sup>2</sup>; Cinalli A.<sup>3</sup>; Fernández Menna V.<sup>4</sup>; Roquel L.<sup>5</sup>; Losavio A.<sup>6</sup>  
 Instituto de Investigaciones Médicas A. Lanari, IDIM CONICET<sup>1,2,3,6</sup>; Universidad Argentina JF Kennedy<sup>4,5</sup>  
 adrianalosavio@gmail.com

De los 8 tipos diferentes de receptores (R) P2Y identificados, los P2Y1,2,4,6,11 estarían acoplados a proteína Gq/11 y los P2Y12,13,14 a proteína Gi/o. Previamente hemos demostrado que, en sinapsis neuromuscular de mamífero, el ATP induce inhibición presináptica de la liberación espontánea de ACh al activar RP2Y (Neuroscience 2006, 2008), siendo este efecto abolido por la toxina pertussis y N-etilmaleimida, lo cual indica que los RP2Y involucrados son los acoplados a proteína Gi/o. Como los RP2Y12 ó 13 son activados por nucleótidos de adenina y los RP2Y14 por UDP-glucosa sugerimos que el efecto inhibitorio es llevado a cabo por los primeros. Nuestro objetivo fue identificar el/los subtipo/s de RP2Y responsables de la modulación presináptica inducida por el agonista preferencial de los RP2Y12/13, 2-MeSADP (150 nM). En preparaciones frénico-diafragma de ratones CF1 encon-

tramos que 2-MeSADP redujo la frecuencia de los potenciales de placa miniatura al  $56.9 \pm 2.8\%$  ( $n=7$ ,  $p<0.05$ ) de los valores controles siendo más potente en su acción que ADP y ATP (EC50: 2-MeSADP 0.08  $\mu\text{M}$ , ADP 4.18  $\mu\text{M}$ , ATP 5.07  $\mu\text{M}$ ). Este efecto fue revertido en presencia de los antagonistas selectivos para los RP2Y12/13 2-MeSAMP y AR-C69931MX (2-MeSAMP  $91.2 \pm 2.6\%$ , 2-MeSAMP + 2-MeSADP  $90.8 \pm 1.5\%$ ,  $n=4$ ; AR-C69931MX  $93.7 \pm 2.1\%$ , AR-C69931MX + 2-MeSADP  $94.6 \pm 2.0\%$ ,  $n=4$ ). Recientemente se comercializaron antagonistas específicos para cada uno de los R; el efecto de 2-MeSADP fue prevenido por el antagonista del RP2Y13 MRS2211, pero no por el del RP2Y12 MRS2395 (MRS2211  $106.4 \pm 4.0\%$ , MRS2211 + 2-MeSADP  $107.6 \pm 8.4\%$ ,  $n=6$ ; MRS2395  $101.6 \pm 5.9\%$ , MRS2395 + 2-MeSADP  $66.9 \pm 1.7\%$ ,  $n=10$ ,  $p<0.05$ ). Como 2-MeSADP también es agonista del RP2Y1 estudiados su efecto en presencia del antagonista (MRS2179  $106.7 \pm 5.5\%$ , MRS2179 + 2-MeSADP  $62.4 \pm 3.6\%$ ,  $n=4$ ,  $p<0.05$ ). Estos resultados sugieren que el efecto modulador del ATP/ADP sobre la secreción del neurotransmisor en sinapsis motoras está mediado por el subtipo del receptor de ATP P2Y13.

#### 566. (225) ANÁLISIS DE LA VÍA VISUAL EN UN MODELO DE GLAUCOMA EXPERIMENTAL

Bordone M.<sup>1</sup>; Dorfman D.<sup>2</sup>; Rosenstein R.<sup>3</sup>  
Laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, Dpto. Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA- CEFYBO- CONICET<sup>1,2,3</sup>  
melina\_bordone@yahoo.com

El glaucoma, una de las principales causas de ceguera, se caracteriza por la pérdida progresiva de las funciones visuales, que se acompaña de la muerte de células ganglionares retinianas (CGR) y atrofia de la cabeza del nervio óptico. El glaucoma es clásicamente concebido como una enfermedad limitada al ojo; sin embargo, los axones de las CGR son extraoculares, con componentes extraorbitales e intracraneales. El objetivo de este trabajo fue analizar las proyecciones retinianas en un modelo experimental de glaucoma en ratas inducido por inyecciones de condroitín sulfato (CSU). En forma semanal, se inyectó CSU (40%) o vehículo en la cámara anterior del ojo de ratas Wistar macho adultas durante 15 semanas. Se analizó la función de la vía visual a través del registro de potenciales visuales evocados (VEPs). Mediante una estrategia de marcación anterógrada con la subunidad  $\beta$  de la toxina colérica (CTB), se analizaron las principales áreas de proyección retiniana: el colículo superior (CS), el núcleo geniculado lateral (NGL) y los núcleos supraquiasmáticos (NSQ). En animales glaucomatosos se observó una disminución significativa de la amplitud de los VEPs ( $p<0.01$ ) y un déficit significativo ( $p<0.01$ ) en la marcación de CTB en todas las áreas examinadas. Asimismo, se observó una acumulación significativa ( $p<0.01$ ) de la CTB en el nervio óptico de ojos con glaucoma. En el CS contralateral al ojo glaucomatoso se observó un aumento en la reactividad glial (evaluada a través de la inmunomarcación para la proteína gliofibrilar ácida). En suma, estos resultados indican que el glaucoma induce alteraciones significativas en la vía visual extraocular y sugieren que el glaucoma podría provocar una degeneración trans-sináptica en las áreas de proyección retiniana.

#### 567. (233) LOS RECEPTORES AT1 DE ANG II CEREBRAL ESTARÍAN INVOLUCRADOS EN LOS CAMBIOS DURADEROS INDUCIDOS POR ANFETAMINA SOBRE RESPUESTAS CONDUCTUALES A ANG II INTRACEREBRAL: APETITO AL SODIO Y ANSIEDAD

Casarsa B.<sup>1</sup>; Marchese N.<sup>2</sup>; Marinzalda M.<sup>3</sup>; Garelo M.<sup>4</sup>; Richard D.<sup>5</sup>; Baiardi G.<sup>6</sup>; Bregonzio C.<sup>7</sup>  
Laboratorio de Neurofarmacología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba<sup>1,3,4,5,6,7</sup>; IFEC-CONICET, Facultad de Ciencias Químicas, UNC<sup>2,7</sup>  
brenda\_casarsa@yahoo.com.ar

La Angiotensina II (Ang II), es un neuropéptido pleiotrópico, que actuando a través de receptores AT1, es el principal efector del Sistema Renina Angiotensina (SRA) cerebral y participa en

la regulación de las respuestas endócrinas, autonómicas y conductuales al estrés. Es ampliamente conocido que los receptores AT1 (R-AT1) de Ang II cerebral están involucrados en el apetito al sodio y además se ha demostrado que median las respuestas cardiovasculares a cocaína. Los psicoestimulantes producen cambios persistentes en las células y circuitos neuronales de recompensa, que conducen a hiper-sensibilidad a largo plazo en esos sistemas, que se pone de manifiesto ante la exposición a la misma sustancia u otras, así como a estrés. La depleción de  $\text{Na}^+$  repetida, estimula el SRA cerebral y periférico, produce sensibilización cruzada con anfetamina y promueve el apetito por soluciones ricas en NaCl. El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar las respuestas conductuales a Ang II intracerebral en animales tratados con anfetamina y bloqueante de los R-AT1 (candesartán). Se usaron ratas Wistar macho (250-320g), en condiciones estándar de laboratorio, pre-tratadas con candesartán (3mg/kg)/vehículo vo. por 10 días. Inyectamos anfetamina (2.5mg/kg)/salina ip. del día 5 al 10. El día 10, se colocaron las cánulas icv. Una semana después, día del experimento, recibieron Ang II (4nmol/4ul) icv., inmediatamente después se realizaron las pruebas de apetito al sodio (libre elección agua y NaCl 2%) y luego plus maze. Los controles recibieron salina icv. Resultados: El pre-tratamiento con anfetamina disminuyó el apetito por el sodio inducido por Ang II icv., el bloqueo AT1 incrementó esta respuesta. Asimismo, el bloqueo AT1 aumentó el tiempo de permanencia en el brazo abierto, en animales tratados con anfetamina. Concluimos que los cambios duraderos inducidos por anfetamina en las respuestas estudiadas involucrarían a los R-AT1 de Ang II cerebral.

#### 568. (354) ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE DETERMINAN LA AGREGACIÓN ERITROCITARIA EN PACIENTES CON ATAQUE CEREBRAL ISQUÉMICO.

Capriotti Corrente J.<sup>1</sup>; Tavolini D.<sup>2</sup>; Raimondi E.<sup>3</sup>; Svetaz M.<sup>4</sup>; Urli L.<sup>5</sup>; Luquita A.<sup>6</sup>  
Servicio de Neurología, Hospital Provincial del Centenario<sup>1</sup>; Servicio de Neurología, Hospital Provincial del Centenario, Cátedra de Neurología, Facultad de Cs. Médicas, UNR<sup>2</sup>; Facultad Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR<sup>3</sup>; Cátedra de Biofísica, Facultad Cs. Médicas, UNR<sup>4,5,6</sup>  
jorgecapriotti@yahoo.com.ar

La condición de ataque cerebral se acompaña de perturbaciones en la circulación periférica y cambios en los parámetros hemorreológicos. Los eritrocitos cambian en número, incrementan su agregabilidad (AE) y disminuyen su deformabilidad. Los cambios en las propiedades plasmáticas se manifiestan en elevaciones del fibrinógeno junto a otras proteínas. Objetivo: Encontrar asociación entre la agregación eritrocitaria, fibrinógeno plasmático y volumen corpuscular medio eritrocitario (VCM) en pacientes hospitalizados que han sufrido un accidente cerebrovascular isquémico (ACVI). Métodos: En sangre de 28 pacientes y sus controles, previo consentimiento por escrito, se midió concentración de fibrinógeno plasmático en gramos/litros [FB] (por método coagulométrico), VCM en  $\mu\text{m}^3$  (por hematocitometría) y AE (por densitometría óptica, obteniéndose dos parámetros: T que estima el tamaño promedio de los agregados y V que estima la velocidad inicial del proceso). El análisis estadístico de AE, [FB] y VCM se realizó por t de student. Resultados: los pacientes con ACVI tenían en comparación con los controles: mayor VCM [(media  $\pm$  ES):  $90,52 \pm 0,50$  vs.  $88,08 \pm 0,49$  ( $p<0,05$ )], mayor V [(media  $\pm$  ES):  $1,04 \pm 0,16$  vs.  $0,50 \pm 0,27$  ( $p<0,01$ )] y mayor [FB] [(media  $\pm$  ES):  $5,36 \pm 0,90$  vs.  $3,00 \pm 0,33$  ( $p<0,01$ )]. En los pacientes con ACVI se calculó el coeficiente de correlación entre V y [FB]:  $r=0,80$  ( $p<0,0000$ ), entre T y [FB]:  $r=0,81$  ( $p<0,0000$ ). Además se encontró una correlación significativa entre V y VCM [ $r=0,76$  ( $p<0,0000$ )]. Conclusión: En el presente trabajo fue demostrado que los pacientes con ACVI presentan aumentada la agregación eritrocitaria. Además se determinó que este proceso se realiza a mayor velocidad que en los controles. Este fenómeno está afectado primordialmente por factores globulares (VCM) y plasmáticos, en particular por fibrinógeno. La identificación de estos factores es de relevancia clínica ya que podría tener incidencia en las estrategias terapéuticas.

**569. (366) ANÁLISIS MULTIVARIADO DE LA ASOCIACIÓN DE CALIDAD DE SUEÑO Y ACTIVIDAD DEL SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO CON RIESGO CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON SÍNDROME METABÓLICO**

Vidal M.<sup>1</sup>; Odzak A.<sup>2</sup>; Frider B.<sup>3</sup>; Cardinali D.<sup>4</sup>; Vigo D.<sup>5</sup>  
*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA, Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina<sup>1</sup>; División Hepatología, Servicio de Clínica Médica, Hospital General de Agudos "Dr. Cosme Argerich"<sup>2,3</sup>; Departamento de Docencia e Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina, CONICET<sup>4,5</sup>*  
 flovidal@hotmail.com

Introducción: el síndrome metabólico aumenta el riesgo cardiovascular (RCV) global. Asimismo, se lo ha vinculado a alteraciones en la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA) y en la calidad de sueño. Sin embargo, no ha sido estudiado de qué manera se asocian estos factores con el RCV en este grupo de pacientes. Objetivo: determinar en forma multivariada el grado de asociación estadística de indicadores de actividad del SNA y de calidad de sueño con RCV elevado en pacientes con síndrome metabólico. Diseño del estudio: se estudió una muestra de 38 pacientes con síndrome metabólico sin eventos cardiovasculares, que se dividió en dos grupos en función de la mediana de RCV a 10 años, evaluado por el score de Framingham. Se analizó el patrón de actividad autonómica mediante indicadores lineales y no lineales de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) y la calidad de sueño mediante el Índice de Calidad de Sueño de Pittsburgh (PSQI). Se evaluaron las diferencias entre los dos grupos mediante un test de T para muestras independientes, expresándose las variables como media  $\pm$  error estándar. Se determinaron predictores de RCV elevado mediante un modelo de regresión logística en el que se incluyeron los distintos indicadores de VFC y las distintas dimensiones del PSQI mediante un método de selección por pasos hacia adelante. Resultados: en el análisis univariado, un mayor RCV se asoció con un mayor valor del indicador de correlación fractal alfa1 ( $T = 2.39$ ;  $p = 0.022$ ) y con un menor tiempo de horas destinadas al sueño ( $T = -2.70$ ;  $p = 0.011$ ). En el análisis multivariado solamente el tiempo destinado al sueño se asoció a un mayor RCV ( $B = -0.581$ ;  $p = 0.023$ ). Conclusión: el aumento de RCV se asoció en forma independiente con una disminución de las horas destinadas al sueño. Estos hallazgos son importantes en tanto la calidad de sueño es un factor sobre el cual se puede intervenir desde la prevención en todos sus niveles.

**570. (367) LA HORMONA TIROIDEA INDUCE A LA TRANSFERINA DURANTE LA MIELINIZACIÓN.**

Marziali L.1; Franco P.2; Pasquini J.3  
*Cát. de Qca Biol Patol. FFYB-UBA IQUIFIB-CONICET<sup>2,3</sup>*  
 marziali.l@gmail.com

Una variedad de factores humorales y locales son necesarios para la mielinización del SNC. La hormona tiroidea (T3) acelera la mielinización induciendo la diferenciación de progenitores gliales y la transferrina (Tf) favorece dicho proceso. Nuestra hipótesis sugiere que T3 utiliza a Tf como un intermediario para producir la mielinización prematura. Dado el efecto activador de T3 sobre el eje GH-IGF, es necesario evaluar el estado del mismo para independizar su posible influencia sobre Tf del efecto de T3. Se analizó el impacto de T3 sobre la expresión de Tf a los 10 y 20 días de vida (inicio y pico de la mielinización); para ello se utilizó un modelo de hipertiroidismo en el cual un grupo de animales (Hiper, n=3) recibió inyecciones subcutáneas diarias de T3 a partir del día 1 posnatal. Se utilizó además un modelo de hipotiroidismo en el cual las madres reciben agua ad libitum conteniendo propil tiouracilo (PTU) a partir del día 18 de gestación (Hipo, n=4). El grupo control (Ctrol, n=6) fue inyectado diariamente con solución salina. Por último un grupo de animales Hipo recibió apoTf intracranalmente (Hipo+Tf, n=4). Se midió en homogeneizados de cerebro por RT-PCR la cantidad relativa de RNA mensajero (mRNA) de Tf e IGF-I. Utilizando extractos proteicos de estos mismos cerebros, se determinó la cantidad relativa de Tf por

Western blot. Los animales Hiper mostraron un aumento del 55% del mRNA de Tf ( $p < 0,001$ ) sin registrarse cambios en IGF-I y un aumento del 87% del contenido de proteína Tf ( $p < 0,001$ ). Los animales Hipo mostraron una caída del 25% del mRNA de Tf ( $p < 0,001$ ) sin registrarse cambios tanto en el mRNA de IGF-I como el contenido de Tf proteína. Los Hipo + Tf mostraron una caída del 27% del mRNA de Tf ( $p < 0,001$ ) sin registrarse cambios respecto del control, tanto en el mRNA de IGF-I como contenido de proteína Tf. Nuestros hallazgos sugieren un posible rol; independiente de GH-IGF; de la Tf como mediador de los efectos de T3.

**571. (379) DOWNSTREAM TARGETS OF NRF-2 MEDIATES THE NEUROPROTECTIVE ACTIVITIES OF THE INFLAMMATORY MARKER, NEOPTERIN**

Ghisoni K.<sup>1</sup>; Remor A.<sup>2</sup>; Rial D.<sup>3</sup>; Prediguer R.<sup>4</sup>; Olivera S.<sup>5</sup>; León C.<sup>6</sup>; Quincozes A.<sup>7</sup>; Gottfried C.<sup>8</sup>; Barbeito L.<sup>9</sup>; Latini A.<sup>10</sup>  
*Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/Sc, Brazil<sup>1,2,10</sup>; Departamento de Farmacología, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, Brazil<sup>3,4</sup>; Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay<sup>5,6,9</sup>; Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil<sup>8</sup>*  
 kahghisoni@gmail.com

Neopterin (Neo), an endogenous pteridine, is found at increased levels in cerebrospinal fluid of patients with brain inflammation and neurodegeneration. However, the role of this compound is virtually unknown. Therefore, the effect of Neo on behavioural and neurochemical parameters was investigated in Swiss male mice and glial cells. Swiss animals of 30 days received Neo intracerebroventricularly (0.4 and 4pmol; 2µL) and 30 min later were submitted to the open field and step down tests. Afterwards, mice were killed and the cerebral cortex was dissected and handled for measuring thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS) and non-proteinic sulfhydryl groups (NPSH) levels, the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and the activities of the respiratory complexes I to IV. In addition, C6 lineage astroglial cells and striatal primary astrocytes were exposed to Neo (50 and 500nM) alone or in combination with H2O2 (0.1 and 1 mM) or azide (5 mM) for 3 hours, in order to assess free radical production (2',7'-dichlorofluorescein oxidation), Neo and lactate release, as well as, hemeoxygenase-1 immuncontent. The results demonstrated a facilitated step-down inhibitory avoidance short and long-term memory induced by Neo administration, without modifying locomotor activity in Swiss mice. Reduction of TBA-RS and increment of NPSH levels and increased GPx activity was observed in cortical preparations from Neo-treated animals. Similarly, reduction in free radical generation was observed in both, lineage and primary Neo-exposed glial cells and an increased hemeoxygenase-1 immuncontent. The other biochemical parameters were not altered. These data indicate that Neo might possess central antioxidant properties and could suggest that increased Neo levels in brain disorders might represent a protection to neuronal injury possibly by Nrf-2-mediated inhibition of free radical production.

**572. (390) CARACTERIZACIÓN DEL DETERIORO COGNITIVO EN RATAS SENILES UTILIZANDO EL LABERINTO DE BARNES**

Morel G.<sup>1</sup>; Hereñú C.<sup>2</sup>; Cambiaggi V.<sup>3</sup>; Zuccolilli G.<sup>4</sup>; Coll L.<sup>5</sup>; Goya R.<sup>6</sup>  
*INIBIOLP<sup>1,2,5,6</sup>; Instituto de Anatomía-Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP<sup>3,4</sup>*  
 gustavmorel@med.unlp.edu.ar

Es sabido que con el envejecimiento aumenta la incidencia de enfermedades neurodegenerativas, siendo el hipocampo una de las regiones más afectadas, lo cual se asocia a una pérdida progresiva de memoria. La rata hembra senil Sprague-Dawley de 29-31 meses, es un excelente modelo de neurodegeneración espontánea con la edad. En experimentos previos hemos demostrado que la terapia génica intrahipotalámica con el factor

de crecimiento insulino-símil tipo 1 (IGF-1) restaura los valores de prolactina de los animales seniles, y que la terapia génica intracerebroventricular (icv) con IGF-1 restaura parcial pero significativamente la aptitud motora de estos animales. Estudios de otros laboratorios en la rata senil demostraron que la administración icv de IGF-1 restaura parcialmente su déficit cognitivo. Con el objetivo futuro de realizar terapia génica neuroprotectora para IGF-1 en el hipocampo de ratas seniles, procedimos a caracterizar la aptitud mnemónica de estos animales empleando un test de memoria espacial, el laberinto de Barnes, que es una plataforma circular con 20 orificios donde los animales tienen 60 segundos para recordar la ubicación de una caja de escape que se encuentra emplazada en uno de ellos. Los entrenamientos con caja se realizaron durante tres días, seguidos de dos ensayos de prueba sin caja. Estudiamos ratas hembras jóvenes de 6 meses; y seniles de 26 y 30 meses. Al finalizar el entrenamiento todos los animales de 6 y 26 meses cumplieron con la prueba versus el 80% de las ratas de 30 meses. Cuando los animales fueron sometidos a un ensayo de prueba sin caja con la mitad del tiempo para encontrar el agujero meta, alrededor del 80% de los animales de 6 y 26 meses completaron la prueba, versus solo un 35% de los animales de 30 meses. Concluimos que los animales de 30 meses presentan un importante déficit cognitivo para completar el ensayo de prueba, y que los animales de 26 meses de edad presentan sutiles diferencias cognitivas con los animales jóvenes.

**573. (393) ANÁLISIS DE LA N-GLICOSILACIÓN DE UNA VARIANTE DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE CON REDUCIDA ACTIVIDAD ERITROPOYÉTICA Y CONSERVADA ACCIÓN NEUROPROTECTORA**

Mattio M.<sup>1</sup>; Ceaglio N.<sup>2</sup>; Oggero M.<sup>3</sup>; Perotti N.<sup>4</sup>; Forno G.<sup>5</sup>; Kratje R.<sup>6</sup>; Etcheverrigaray M.<sup>7</sup>

Laboratorio de Cultivos Celulares- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas- UNL<sup>1 2 3 4 6 7</sup>; Zelltek S. A- Santa Fe- Argentina<sup>5</sup>  
mmattio@fcb.unl.edu.ar

La eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) es una molécula que exhibe un amplio espectro de acciones terapéuticas, entre ellas capacidad neuroprotectora. En nuestro laboratorio hemos desarrollado un proceso de purificación de una variante de rhEPO, que denominamos neuroepoetin (rhNEPO), caracterizada por un perfil de glicosilación diferente a rhEPO, mayor velocidad de depuración plasmática y escasa actividad estimulante de la hematopoyesis. En el presente trabajo, se propuso analizar las estructuras N-glicosídicas presentes en la rhNEPO con el fin de correlacionarlas con la menor vida media plasmática de la molécula y su consecuente menor actividad eritropoyética. Para ello, los oligosacáridos de tipo N se liberaron mediante tratamiento enzimático y se analizaron mediante HPAEC-PAD en condiciones nativas. La rhNEPO demostró mayor contenido de estructuras neutras, mono-, di- y tri-sialadas (en total 81,4% vs. 30% existentes en rhEPO). En consecuencia, la rhNEPO evidenció menor porcentaje de oligosacáridos tetrasialados (13,6%) con respecto a la rhEPO (58,1%). El análisis de los oligosacáridos neutros demostró mayor proporción de estructuras menos ramificadas (di- y tri-antenarias) en la molécula con menor actividad eritropoyética con respecto a la rhEPO (49,0 % vs. 23,4%, respectivamente). Teniendo en cuenta que tanto el tamaño como tipo de ramificación y el contenido de ácido siálico terminal de los N-glicanos son factores determinantes de la vida media plasmática de una proteína, se pudo concluir que el diferente perfil de glicosilación de la rhNEPO incrementa su clearance plasmático y, en consecuencia, disminuye su capacidad hematopoyética. No obstante, a pesar de su reducida vida media en plasma, la rhNEPO ingresa al líquido cefalorraquídeo más rápidamente que su contraparte hematopoyética en concentraciones dentro del rango de citoprotección, postulándose como posible candidato para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

**574. (427) INFLUENCIA DEL AMBIENTE ENRIQUECIDO SOBRE LA RESPUESTA NEUROBIOLÓGICA HIPOCAMPAL**

**EN UN MODELO DE ESTRÉS TEMPRANO EN RATAS**

Vivinetto A.<sup>1</sup>; Suarez M.<sup>2</sup>; Rivarola M.<sup>3</sup>

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales-UNC<sup>1 2 3</sup>  
arivarola@efn.uncor.edu

Las experiencias ambientales participan de manera relevante en la determinación del fenotipo. Desde el momento de su nacimiento, el contexto del individuo puede afectar numerosos parámetros fisiológicos de importancia. Dentro de los centros que regulan las respuestas al entorno se encuentra el hipocampo, una región especialmente plástica y vulnerable y componente sustancial en el control de diversas funciones biológicas. Teniendo en cuenta el papel que juega la experiencia en el desarrollo definitivo del Sistema Nervioso se plantea como objetivo analizar los efectos de diferentes calidades ambientales postnatal y postdestete en la fisiología del hipocampo, con énfasis en la determinación de la expresión de Fos y Receptores de Glucocorticoides (GR) en las subáreas del hipocampo dorsal. Las manipulaciones ambientales consistieron en la aplicación sobre ratas macho derivadas de Wistar de un protocolo de estrés por separación materna temprana 4,5 h/día hasta el destete y un ambiente enriquecido postdestete hasta el día 60 pn. La densidad de células positivas para Fos y GR se determinó mediante técnicas inmunohistoquímicas. El área CA1 presentó alta susceptibilidad a los factores ambientales: el enriquecimiento generó un incremento en la expresión de Fos ( $p < 0,001$ ) tanto en los individuos criados como separados de su madre y la interacción entre los factores resultó significativa para la inmunomarca GR en la misma región ( $p < 0,05$ ). La separación materna generó una tendencia a la disminución de Fos en Girus Dentado ( $p = 0,06$ ) y un aumento de GR en CA3 ( $p = 0,05$ ). Los individuos criados con su madre y mantenidos en ambiente enriquecido presentaron la mayor densidad de células positivas para Fos y GR. Estos resultados proporcionan evidencia tanto del efecto independiente de los cambios ambientales como de las interacciones entre ellos. A su vez demuestran la gran capacidad plástica y la heterogeneidad en la susceptibilidad y formas de respuesta de las subáreas hipocámpales.

**575. (440) ANÁLISIS DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN HIPOCAMPAL EN RATAS SOMETIDAS A SEPARACIÓN MATERNA TEMPRANA Y ESTRÉS CRÓNICO VARIABLE EN EDAD ADULTA**

Zalosnik M.<sup>1</sup>; Trujillo V.<sup>2</sup>; Suárez M.<sup>3</sup>; Durando P.<sup>4</sup>

Cátedra Fisiología Animal, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, UNC<sup>1 2 3 4</sup>  
ines\_zalosnik@hotmail.com

Estudios epidemiológicos han comprobado que los eventos estresantes sufridos durante la niñez aumentan el riesgo de desarrollar psicopatologías en la adultez. Un modelo animal ampliamente usado para representar tales experiencias adversas es el de la separación materna temprana. Este paradigma causa alteraciones en la reactividad neuroendocrina (liberación de glucocorticoides y catecolaminas) y emocional al estrés, las que se manifestarían cuando el individuo debe enfrentar situaciones adversas en la edad adulta. Se ha demostrado que el incremento de glucocorticoides altera la estructura y funcionalidad del hipocampo. En este trabajo se propone analizar si ratas macho sometidas a separación materna temprana y a estrés crónico en la edad adulta, sufren alteraciones en el volumen total del hipocampo dorsal. Para ello, se sometieron ratas macho a separación materna temprana (4,5 h, del día 1 al 21 postnatal [PN] inclusive). Desde el día 50 PN, se les aplicó -durante 24 días- un protocolo de estrés crónico variable aleatorio: ruido (4 h), anestesia etérea, dos inyecciones, ayuno (24 h) e inmovilización (1 h). El volumen de los hipocámpos dorsales se calculó por la técnica estereológica. Los volúmenes de los hipocámpos de las ratas criadas con su madre y sometidas a estrés crónico variable resultaron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) a los de las ratas criadas con su madre sin estrés y a las separadas de su madre con estrés. Estos resultados cuestionarían la teoría clásica según la cual, los cuidados maternos escasos representarían una "adversidad" para generar una respuesta al estrés. En contraposición, tenderían a sustentar la teoría del



“match –mismatch” o del ajuste entre el ambiente del desarrollo temprano y el contexto de la adultez. Así, los animales criados con sus madres sufrirían disminución en sus volúmenes hipocámpales al enfrentar situaciones estresantes en su vida adulta, pues no estarían en el contexto adecuado a su desarrollo temprano.

**576. (448) VARIANTES DE SPLICING DEL RECEPTOR DE ENDOTELINA TIPO A (ETAR) EN EL MODELO DE HIPERTENSION ARTERIAL GOLDBLATT-1**

Morales V.<sup>1</sup>; Pane A.<sup>2</sup>; Hope S.<sup>3</sup>; Guil M.<sup>4</sup>; Bianciotti L.<sup>5</sup>; Vatta M.<sup>6</sup>

FFyB-UBA, *Cátedra Fisiología- IQUIMEFA- CONICET*<sup>1 2 3 4</sup>  
<sup>5</sup>; FFyB-UBA, *Cátedra de Fisiopatología*<sup>6</sup>  
 vany9bio@yahoo.com

Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que las endotelinas (ETs) regulan la transmisión noradrenérgica en diferentes regiones del sistema nervioso central, en muchos casos a través de receptores atípicos o no convencionales. Estos comportamientos atípicos intentan ser explicados por diversas teorías que postulan, la existencia de un tercer receptor en mamíferos, la dimerización de receptores (homo y/o heterodimerización), modificaciones post-traduccionales y/o la presencia de variantes de splicing las que se expresan en distintas situaciones con comportamientos diferentes. Recientemente, se reportó la existencia cuatro de variantes de splicing del receptor ETA de ETs(ETAR) (C13, U8, U3 y L) en pituitaria de rata, de las cuales solo ETAR-C13 tiene similares características a ETAR. Sobre esta base, el objetivo del presente trabajo consiste en determinar la presencia de las distintas variantes de splicing del ETAR en distintos tejidos que participan en la regulación de la presión arterial y su posterior cuantificación en el modelo de hipertensión arterial Goldblatt-1. Utilizando primers específicos para cada variante de splicing de ETAR se determinó por RT-PCR la presencia de ETAR, ETAR-C13 y ETAR-U8 tanto en bulbo olfatorio (BO), corazón, hipotálamo anterior y posterior y medula adrenal (MA), y ausencia de producto ETAR-U3 y ETAR-L en BO. En el modelo de hipertensión Goldblatt-1 se cuantificó la expresión de los mRNA de ETAR por medio de PCR en Tiempo Real, observándose en BO una disminución en los animales hipertensos vs. control ( $p < 0.001$ ) y un incremento en la MA ( $p < 0.001$ ). Estos resultados muestran la existencia de la expresión de variantes de splicing de ETAR tejido y región específica. Además se observó niveles diferentes de ETAR en el BO y MA de animales hipertensos Goldblatt-1.

**577. (452) LA SOBREENPRESION DE IGF-I EN EL HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL-EMINENCIA MEDIA (HMB-EM) PREVIENE LA DISMINUCIÓN DE LA CICLICIDAD NORMAL EN LA RATA HEMBRA DE MEDIANA EDAD.**

Rodríguez S.<sup>1</sup>; Schwerdt J.<sup>2</sup>; Reggiani P.<sup>3</sup>; Barbeito C.<sup>4</sup>; Zucollilli G.<sup>5</sup>; Bohn M.<sup>6</sup>; Goya R.<sup>7</sup>

INIBIOLP, *Cátedra de Histología B, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP*<sup>1 2 3 7</sup>; *Facultad de Ciencias Veterinarias; UNLP*<sup>4 5</sup>; *Children's Memorial Research Center, Northwestern University, USA*<sup>6</sup>  
 srodriguez@aetos.med.unlp.edu.ar

El deterioro en la función reproductiva femenina se asocia a la edad en mamíferos. En la rata hembra, el envejecimiento reproductivo se caracteriza por una disminución gradual de la ciclicidad estral normal ocasionada principalmente por la alteración en la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Existe evidencia que sugiere un rol regulador del factor de crecimiento insulino tipo I (IGF-I) sobre la función reproductiva, posiblemente a través de la modulación de las neuronas GnRH. Además, las ratas de mediana edad poseen en HMB-EM niveles de ARNm del IGF-I más bajos de que en ratas jóvenes. Nosotros estudiamos si el incremento de los niveles de IGF-I en HMB-EM de ratas de mediana edad prevenía la disminución de la ciclicidad estral. Se utilizaron tres grupos de ratas hembras de 34 semanas de edad: 1- Grupo Control, ratas intactas, 2- Grupo AAV-DsRed2, inyectadas intrahipotalámicamente con un vector adenoasociado (AAV) que transporta el gen que codifica para

una proteína fluorescente roja (DsRed2) y 3- Grupo AAV-IGF-I-DsRed2, inyectadas intrahipotalámicamente con un AAV que transporta el gen que codifica para el IGF-I y la DsRed2. Para estudiar la ciclicidad estral se realizaron a diario extendidos vaginales hasta el momento del sacrificio en la semana 49,5 de edad. Los niveles de IGF-I en HMB-EM y corteza cerebral (CC) fueron medidos por radioinmunoensayo. El nivel de IGF-I en HMB-EM respecto de CC fue mayor ( $p < .05$ ) en el grupo AAV-IGF-I-DsRed2 respecto del grupo control. Las frecuencias de animales con ciclicidad estral normal, irregularización del ciclo y un estado de estro constante fueron significativamente diferentes ( $p < .05$ ) en función del tratamiento que recibieron, observándose una ciclicidad estral normal únicamente en ratas del grupo AAV-IGF-I-DsRed2. Estos resultados nos permiten sugerir que el aumento en los niveles de IGF-I en HMB-EM retarda el cese de los ciclos reproductivos y altera sus características en ratas hembras.

**578. (455) EFECTOS DE LA SEPARACIÓN TEMPRANA MADRE-CRÍA SOBRE PARÁMETROS NEUROCONDUCTUALES DE LAS MADRES EN RATAS WISTAR**

Aguggia J.<sup>1</sup>; Suárez M.<sup>2</sup>; Rivarola A.<sup>3</sup>

*Cátedra de Fisiología Animal, FCFEY UN*<sup>1 2 3</sup>  
 jull\_aguggia@hotmail.com

Si la relación vincular entre la madre y sus crías se interrumpe, como en la separación materna temprana, ambos miembros del par podrían verse afectados evocando un estrés emocional que aumenta, consecuentemente, la vulnerabilidad al padecimiento de desórdenes del ánimo como la ansiedad y la depresión. Considerando que la depresión postparto es una patología frecuente cuya etiología y sustrato neurobiológico son poco conocidos, el presente trabajo propone evaluar el efecto de la separación materna prolongada durante las primeras semanas del postparto, sobre el perfil conductual de las madres. Se utilizaron ratas hembras nulíparas de 200-250 g, en las cuales se indujo la gestación por cópula fértil con un macho. A partir del día postnatal 1, las crías fueron separadas de las madres 4,5 hs/día durante las 3 primeras semanas de vida. El comportamiento maternal se evaluó mediante el test de recuperación de las crías en los días postnatales 3, 6 y 9. Las madres que fueron separadas de sus crías (SC) mostraron un aumento del tiempo en reunir la camada el día postnatal 3 ( $p = 0.02$ ) con respecto al grupo control (sin separación materna). Luego del destete se analizaron conductas relacionadas a la ansiedad y depresión. Se observó una tendencia en aumento de la ansiedad en ratas SC, ( $p = 0.07$ ) en test de plus maze. En la prueba de natación forzada (modelo para evaluar depresión), las variables analizadas no mostraron diferencias significativas. Finalmente, para examinar procesos de memoria y aprendizaje, que podrían afectarse en situaciones de estrés emocional, se utilizó el paradigma de evitación inhibitoria en el cual se registró una significativa disminución del tiempo de latencia a las 24 hs ( $p = 0.0027$ ), lo cual denota una deficiencia de memoria a largo plazo en las ratas SC. Estos resultados muestran que la separación de las crías repercute negativamente en las madres, provocando menor atención hacia sus crías, mayor ansiedad y deterioro de la memoria a largo plazo.

**579. (457) MOUSE BRAIN METHYLMERCURY-INDUCED MITOTOXIC EFFECTS ARE PREVENTED BY DIPHENYL DISELENIDE ADMINISTRATION AND CORRELATES SYSTEMICALLY WITH IMPAIRED PLATELET OXYGEN CONSUMPTION**

Martins R.<sup>1</sup>; Glaser V.<sup>2</sup>; Scheffer D.<sup>3</sup>; Wannamacher C.<sup>4</sup>; Prediger R.<sup>5</sup>; De Oliveira P.<sup>6</sup>; Rocha J.<sup>7</sup>; De Paul A.<sup>8</sup>; Mukdsi J.<sup>9</sup>; Torres A.<sup>10</sup>; De Bem A.<sup>11</sup>; Farina M.<sup>12</sup>; Latini A.<sup>13</sup>  
*Laboratório de Bioenergética e Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – Sc, Brazil*<sup>1 2 3 11 13</sup>; *Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas Da Saúde, Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre – Rs, Brazil*<sup>4</sup>; *Departamento de Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil*<sup>5 6</sup>;

*Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - Rs, Brazil*; *Centro de Microscopia Eletrônica, Faculdade De Ciências Médicas, UNC<sup>9 10</sup>; Laboratório de Experimentação Em Neuropatologias, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - Sc, Brazil*<sup>12</sup>  
 robertamartinss@gmail.com

Considering that methylmercury (MeHg) exposure causes severe neurological damage in animals and humans, we investigated the effects of MeHg poisoning on mitochondrial physiology in mouse brain. Initially, adult male mice were exposed to MeHg (20 and 40mg/L) for 3 weeks. Treated mice showed reduced ability for short-term object-recognition and reduced latency to fall in the rotarod test. The altered behavior, indicating discriminative learning and motor coordination impairments, correlated with reduced cortical NADH dehydrogenase activity and with impaired systemic platelet oxygen consumption. Next, the energy deficit was studied in detail by evaluating the in vitro effect of MeHg exposure (0-1.500µM) in brain preparations. Exposed cortical slices showed increased hydrogen peroxide production and marked reduction of NADH dehydrogenase activity. In addition, MTT reduction inhibition and increased lactate formation were observed. Since, in vivo MeHg exposure induced energy deficiency and mitochondrial oxidative stress, we also investigated the protective effect of diphenyl diselenide (DD) subcutaneous administration (5µmol/kg). Electron microscopy analysis showed enlarged and fused mitochondria that lead to a reduced number of the organelles in the MeHg-exposed cerebral cortex. Furthermore, the cortical creatine kinase activity (CK; oxidative stress sensor) was abolished by the treatment. DD treatment prevented from both, the ultrastructural changes and mitochondrial content, and from the inhibitory effect on CK activity. Concluding, these data strongly indicate that MeHg poisoning compromises cell viability probably by inducing mitochondrial oxidative stress, which could in turn induce mitochondrial fusion in order to conserve brain energy status. Furthermore, we also demonstrated that impaired systemic platelet oxygen consumption, is a sensitive and non-invasive marker of the brain energy deficits induced by MeHg poisoning.

#### 580. (472) ALTERNATIVA NATURAL DE TRATAMIENTO CON INFUSION (TÉ) DE HYPERICUM PERFORATUM EN UN MODELO ANIMAL DE DEPRESIÓN

Santa Cruz M.<sup>1</sup>; Trujillo V.<sup>2</sup>; Levin G.<sup>3</sup>; Suarez M.<sup>4</sup>  
*Cátedra de Fisiología-Animal, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC<sup>1 2 4</sup>; Hospital Ricardo Gutiérrez<sup>3</sup>*  
 msuarez@efn.uncor.edu

Cuando los factores estresantes resultan crónicos, podrían desencadenar depresión. La Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), al igual que los antidepressivos tricíclicos inhibe la recaptación de monoaminas pudiendo ser utilizada como terapia alternativa. El objetivo fue comprobar el efecto del tratamiento con la infusión de esta hierba (té) en ratas adultas sometidas a un modelo de depresión, sobre los niveles de catecolaminas plasmáticas, índices de anhedonia, de ansiedad y procesos de memoria y aprendizaje. Se utilizaron ratas Wistar macho de 50 días de edad que fueron sometidas a estrés crónico variable durante 24 días y al suministro de infusión de Hierba de San Juan, 1g/kg de peso corporal. La ansiedad, se midió con el test de laberinto en cruz elevada, mientras que los niveles de catecolaminas plasmáticas fueron determinados por HPLC. Los índices de anhedonia se evaluaron por la preferencia y consumo de sacarosa. El estudio de la memoria y aprendizaje fue realizado a través del test de evitación pasiva. Los resultados mostraron que la hierba, disminuye los niveles de Dopamina en los animales estresados (P<0,05) y el aumento de Noradrenalina también fue revertido por el tratamiento con esta planta (P<0,05). En cuanto a los niveles de Adrenalina no hubo diferencias significativas. Con respecto al índice de anhedonia, el volumen de la solución de sacarosa consumido fue menor en los animales deprimidos (P<0,05) y la infusión de la hierba logró incrementarlo de ma-

nera similar al grupo Control. El modelo de depresión produjo un aumento de los índices de ansiedad (P<0,05) y también se observó alteraciones en la memoria y aprendizaje pero la infusión del té logró aumentar la memoria a largo plazo (P<0,05) Estos resultados indican que la Hierba de San Juan suministrada como infusión podría revertir la activación del sistema nervioso simpático, disminuir el cuadro anhedónico y reforzar la memoria y aprendizaje producidos por la depresión.

## ONCOLOGÍA 9

#### 581. (239) CPS49 Y FLAVOPIRIDOL: UNA NUEVA COMBINACIÓN DE DROGAS SELECTIVA PARA EL CÁNCER DE PRÓSTATA AVANZADO.

Zalazar F.<sup>1</sup>; De Luca P.<sup>2</sup>; Elguero B.<sup>3</sup>; Meiss R.<sup>4</sup>; Moiola C.<sup>5</sup>; Cotignola J.<sup>6</sup>; Vazquez E.<sup>7</sup>; De Siervi A.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Apoptosis y Cáncer, Depto Química Biológica, FCEN, UBA<sup>1 2 3 5 6 7 8</sup>; Academia Nacional de Medicina<sup>4</sup>*  
 fzalazar@qb.fcen.uba.ar

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en Argentina y actualmente no existen terapias efectivas para la etapa resistente a la castración hormonal de esta enfermedad. Previamente, en nuestro laboratorio determinamos que la administración de Flavopiridol (Fp) (inhibidor de kinasas dependientes de ciclinas) y CPS49 (inhibidor de angiogénesis) a ratones nude, redujo significativamente el desarrollo de tumores derivados de células PC3 creciendo como xenotrasplantes. En este trabajo, evaluamos la viabilidad celular de un panel de líneas tumorales y no tumorales expuestas a CPS49 y Fp. Detectamos tres grupos de líneas celulares según su sensibilidad: i) altamente sensibles: PC3 (GI50: 5,1 mM) y C4-2 (GI50: 7,6 mM); ii) medianamente sensibles: PC3.BRCA1 (línea estable que sobre-expresa BRCA1) y 22RV1; iii) resistentes: 293HEK (no tumoral) y LNCaP. Además, mediante un array de RT-qPCR que contiene 26 genes realizado a partir del RNA de células PC3 expuestas a la combinación de CPS49 y Fp, determinamos que este tratamiento "apagó" genes involucrados en ciclo celular, respuesta al daño al ADN y progresión tumoral. El análisis histológico (H&E) y la tinción tricrómica de Masson en los tumores xenotrasplantados determinó que el tratamiento indujo amplia necrosis celular, evidenciando estroma con trama colapsada en las áreas pre-necróticas. Debido a que el Paclitaxel (PTX) es un agente utilizado en el tratamiento del PCa avanzado, evaluamos la eficacia de la combinación de CPS49 con PTX. Las líneas tumorales PC3 y LNCaP resultaron altamente sensibles a esta combinación, mientras que las 293HEK y 22RV1 fueron resistentes. Sin embargo, al estudiar la eficacia del PTX (12mg/Kg/día) y CPS49 (6mg/Kg/día) in vivo, encontramos que esta combinación no redujo significativamente el volumen tumoral. Estos resultados indican que el CPS49 y el Fp es una combinación efectiva y selectiva para tumores avanzados de PCa en estudios preclínicos.

#### 22. (340) SENSIBILIDAD DIFERENCIAL AL CADMIO ENTRE LÍNEAS CELULARES TUMORALES HELA Y MDA-MB-231

Alvarez Olmedo D.<sup>1</sup>; Losinno A.<sup>2</sup>; Martinis E.<sup>3</sup>; Montt M.<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 6 7</sup>; Laboratorio de Citoesqueleto y Ciclo Celular, IHEM<sup>2</sup>; Laboratorio de Investigación y Servicios Ambientales, QUIANID, LISAMEN, CCT-Mendoza, CONICET<sup>3 5</sup>; Laboratorio de Biología Tumoral, IMBECU, CCT-Mendoza, CONICET<sup>4</sup>*  
 ciberdaiana@gmail.com

El Cadmio (Cd) es un metal tóxico, ingresa al organismo mediante la dieta y/o a través del humo del cigarrillo; es carcinógeno tipo 1. Está asociado con distintos tipos de cáncer humanos, actúa en todos los estadios del proceso oncogénico y afecta distintas vías intracelulares. La respuesta al Cd depende de la concentración, tiempo de aplicación y el tipo celular. El objetivo de este trabajo fue comparar la sensibilidad al Cd

entre dos líneas celulares tumorales y explorar si proteínas relacionadas con adhesión celular y golpe de calor podrían ser posibles factores endógenos involucrados en la respuesta al Cd. Células tumorales HeLa y MDA-MB-231 se trataron con concentraciones de Cd (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ ) durante 3 horas. La citotoxicidad al Cd se evaluó por MTT y ensayo clonogénico. La captación de Cd en las líneas tumorales se analizó mediante espectrometría de absorción atómica (ETAAS). La expresión y localización de beta-catenina, HSP27 y cav-1 se evaluó por inmunocitoquímica y la colocalización entre beta-catenina-HSP27 y entre beta-catenina-cav-1 se analizó por microscopía confocal. Los ensayos clonogénicos y citotóxicos mostraron que las células MDA-MB-231 son más resistentes al Cd (viabilidad 85%) que las células HeLa (viabilidad 25%). La acumulación de Cd en las células aumentó a medida que se incrementaron las concentraciones de Cd en el medio. En células HeLa se observó localización paranuclear de beta-catenina y HSP27 bajo el tratamiento (50 y 100  $\mu\text{M}$  Cd) y un aumento significativo de su colocalización en 50  $\mu\text{M}$  Cd (CP 0,65,  $p < 0,05$ ). En células MDA-MB-231 se observó localización paranuclear de beta-catenina y HSP27 desde 0  $\mu\text{M}$  Cd y de cav-1 desde 50  $\mu\text{M}$  Cd. La colocalización se evidenció desde 0  $\mu\text{M}$  Cd (CP > 0,5). El posible cross talk entre las proteínas presentadas, inducido en células HeLa o existente en células MDA-MB-231, podría ser responsable de la diferencia en la sensibilidad al Cd encontrada en las líneas celulares tumorales estudiadas.

**583. (269) UNA NUEVA FUNCIÓN PARA BRCA1 EN LA SUPRESIÓN TUMORAL: EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS CELULAR A TRAVÉS DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE HO-1**

Labanca E.<sup>1</sup>; De Luca P.<sup>2</sup>; Vazquez E.<sup>3</sup>; De Siervi A.<sup>4</sup>

Laboratorio de Apoptosis y Cancer- Dpto de Química Biológica- FCEN- UBA<sup>1,2,3,4</sup>

estefania.labanca@gmail.com

El mantenimiento de la integridad genómica es esencial para prevenir la acumulación del daño en el ADN, lo cual lleva a la desregulación del crecimiento y al fenotipo celular transformado. El gen de la susceptibilidad al cáncer de mama, BRCA1, es un supresor tumoral que es considerado el guardián del genoma por su rol en la respuesta al daño en el ADN. Estudios previos de nuestro grupo y de otros autores reportaron que BRCA1 induce genes que participan en la respuesta al estrés, como por ejemplo enzimas antioxidantes y genes involucrados en el metabolismo/resistencia a agentes genotóxicos. Además, BRCA1 junto con Nrf2 co-regulan genes que contienen elementos de respuesta a estrés (AREs) en sus promotores. La Hemo oxigenasa 1 (HO-1), una enzima antioxidante responsable del mantenimiento de la homeostasis celular involucrada en la carcinogénesis prostática, posee sitios ARE en su promotor. Con el objetivo de investigar el rol de BRCA1 en la citoprotección contra el estrés oxidativo, en este trabajo estudiamos la posible co-regulación transcripcional de HO-1 por BRCA1 y Nrf2. Comprobamos que la sobreexpresión de BRCA1 induce la expresión de la proteína HO-1, activando significativamente la transcripción (4,8 veces) y la actividad del promotor (11 veces) de HO-1 en líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y LNCaP). Consistentemente, este aumento desapareció al silenciar la expresión de BRCA1 en las mismas líneas celulares. Además, la sobreexpresión de BRCA1 "apagó" la expresión de MMP9, un gen que previamente reportamos es reprimido por HO-1 en cáncer de próstata. Finalmente, la inducción de la actividad del promotor de HO-1 por sobreexpresión de BRCA1 aumentó significativamente en presencia de Nrf2. Estos resultados sugieren que BRCA1 podría cumplir su rol protector contra el estrés oxidativo a través de la co-regulación transcripcional de HO-1 junto a Nrf2, implicando así a BRCA1 en una nueva vía que se asocia a su función supresora de tumores.

**584. (288) EL ÁCIDO RETINOICO REDUCE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA: ROL DEL RECEPTOR DE ÁCIDO RETINOICO BETA**

Flamini M.<sup>1</sup>; Vargas Roig L.<sup>2</sup>

CONICET, Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo – CONICET.DR.<sup>1,2</sup>  
mflamini@mendoza-conicet.gob.ar

El cáncer de mama es la neoplasia más común en mujeres produciéndose el 98% de las muertes por la aparición de metástasis a distancia. En el 50% de los carcinomas invasores de mama se produce una pérdida de la expresión del Receptor de Ácido Retinoico  $\beta$  (RAR $\beta$ ) comparado con el tejido normal, por lo que hipotetizamos que cuando este gen se expresa estaría evitando la aparición de metástasis. Objetivos: 1) Verificar en células de adenocarcinoma mamario humano MCF-7, que presentan el gen RAR $\beta$  metilado y silenciado, si la re-expresión del gen, luego de un tratamiento con ácido retinoico (AR), produce inhibición de la migración/invasión celular. 2) Identificar los posibles mecanismos moleculares por los cuales el AR ejerce su efecto. Metodología: En células MCF-7 se realizaron tratamientos de dosis (10<sup>-8</sup> a 10<sup>-5</sup> M) y tiempo dependencia (24 a 96hs) con AR. Se realizaron ensayos de migración e invasión celular. Mediante western blot se evidenció la expresión de RAR $\beta$ , moesin, c-Src, HSP27 (HSPB1) y actina. Resultados: La administración de AR en células MCF-7 induce la expresión del gen RAR $\beta$  que es máxima luego de 72hs y con una concentración 1  $\mu\text{M}$ . Observamos que a mayor concentración de AR y a mayor expresión de RAR $\beta$  se obtiene un 60% de inhibición de la migración celular ( $p < 0,01$ ). Paralelamente luego del tratamiento con AR disminuye significativamente la expresión de proteínas que estimulan la migración como c-Src y moesin (60% y 50% de inhibición respectivamente) y aumenta en un 60% la expresión de la proteína HSP27 que inhibe la polimerización de la actina. Conclusión: el AR por medio del RAR $\beta$  inhibe la migración modulando la expresión de proteínas involucradas en la migración/invasión celular. Estos resultados aumentan nuestra comprensión de la biología celular del cáncer de mama y tienen relevancia clínica para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la prevención y control del cáncer mamario así como también para interferir con la aparición de metástasis.

**585. (330) LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES ALFA2-ADRENÉRGICOS EN CÉLULAS TUMORALES DE MAMA HUMANA PROVOCA UN AUMENTO DE LA FOSFORILACIÓN DE ERK1/2 DEPENDIENTE DE C-SRC.**

Bruzzone A.<sup>1</sup>; Gargiulo L.<sup>2</sup>; Pérez Piñero C.<sup>3</sup>; Castillo L.<sup>4</sup>; Sénard J.<sup>5</sup>; Paris H.<sup>6</sup>; Luthy I.<sup>7</sup>

IBYME-CONICET<sup>1,2,3,4,7</sup>; INSERM U858, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Toulouse, France<sup>5,6</sup>  
ariana.bruzzone@gmail.com

Hemos descripto la presencia de receptores  $\alpha 2$ -adrenérgicos ( $\alpha 2$ -RA) en líneas tumorales de mama humana. Su estimulación se asocia a un aumento de la proliferación celular y del crecimiento tumoral. Se desconocen los mecanismos moleculares implicados en esta respuesta. El objetivo fue estudiar el efecto de los compuestos  $\alpha 2$ -RA sobre la fosforilación de Erk1/2 (p-Erk) y Akt en estas líneas. La fosforilación de Erk y Akt se midió por Western Blot. Las células se transfectaron con lipofectamina 2000 y la activación de la luciferasa se midió con un luminómetro. En la línea MCF-7 la Adrenalina (Ad), y los agonistas  $\alpha 2$ -RA: dexmedetomidina (Dex) y UK-14304 (UK) (concentración 2  $\mu\text{M}$ ) causaron un aumento de p-Erk. El aumento fue dosis-dependiente a partir de 1 pM para UK ( $p < 0,05$ ) y 0,1 nM para Dex ( $p < 0,01$ ) y a partir de los 10 min para Dex y 20 min para UK. El efecto de Ad se pudo revertir con antagonistas  $\alpha 2$ -específicos. En las líneas HS-578T y MDA-MB-231 el UK provocó un aumento de p-Erk. Se transfectaron las células MCF-7 con el plásmido pFA2-Elk1 unido a pFR-Luc. Erk regula la actividad transcripcional de Elk1. El UK y la Dex (2  $\mu\text{M}$ ) aumentan la actividad de la luciferasa con respecto al control. El inhibidor de c-src (PP2) bloqueó el efecto de la Dex. Esto se confirmó cotransfectando con diferentes formas de c-src (wild type, constitutivamente activa y la inactiva) y con el plásmido Erk2-GFP. La expresión de la forma activa provoca un aumento de p-ErkGFP con respecto a la fosforilación provocada por la expresión de c-src wild type, mientras que la forma inactiva inhibe por completo la p-ErkGFP. La Dex provoca un aumento de

p-ErkGFP cuando se expresa la forma wild type de c-src, pero no cuando se sobreexpresa la forma activa o la inactiva. Se evaluó la activación de vía de Akt involucrada en la supervivencia celular. La Dex aumenta la p-Akt a partir de los 120 minutos. En conclusión en la línea MCF-7 la estimulación de  $\alpha$ 2-RA induce un aumento de p-Erk dependiente de c-src.

**586. (337) MUTACIONES BRAF EN MELANOMA MALIGNO**  
Ibañez M.<sup>1</sup>; Bianchini M.<sup>2</sup>; Duzelman V.<sup>3</sup>; Aris M.<sup>4</sup>; Mordoh J.<sup>5</sup>  
*Centro de Investigaciones Oncológicas-Fundación Cancer<sup>1 2 3 4</sup>; Centro de Investigaciones Oncológicas-Fundación Cáncer, Fundación Instituto Leloir /IIBB CONICET<sup>5</sup>*  
pau\_i888@hotmail.com

Los melanomas cutáneos poseen alta incidencia (50 %) de mutaciones en el oncogén BRAF, en su mayoría V600E y una minoría V600K. Los pacientes (pts) con melanoma cutáneo y BRAF mutado tratados con el inhibidor específico PLX 4032 poseen alta tasa de respuesta, alrededor del 50 %, aunque la mayoría de los pts recaen al cabo de pocos meses. El propósito de este trabajo fue: I) Investigar en líneas celulares y en cortes histológicos de biopsias de melanoma, la existencia y frecuencia de mutaciones en BRAF. II) Explorar la hipótesis de que la alta tasa de recaída de los pts con mutaciones en BRAF pudiera deberse a la coexistencia de células malignas con BRAF mutado y wild type (WT). Para determinar la presencia de mutaciones en BRAF, se extrajo y se analizó mediante secuenciación el ADN de 9 biopsias tumorales de pts y de 11 líneas celulares de melanoma. Para fundamentar la hipótesis de que la resistencia a PLX 4032 pudiera deberse a la presencia de células con BRAF WT, 4 líneas celulares de melanoma heterocigotas para la mutación BRAF V600E fueron clonadas en metilcelulosa, se picaron colonias y se analizó BRAF en cada colonia. De los 9 pts analizados, 4 fueron heterocigotas V600E; 1 fue homocigota V600K; 1 fue heterocigota V600K y 3 fueron WT. De las 11 líneas celulares estudiadas, 3 (27%) tenían BRAF WT; de las restantes 8 (73 %), 5 poseían mutaciones heterocigotas V600E; 1 fue homocigota V600E y 2 líneas fueron homocigotas V600K. Con respecto al análisis de las colonias, en la línea celular (#1) 13/13 colonias mantuvieron la heterocigosidad para BRAF; en la línea (# 2) se detectaron 18/20 colonias con BRAF heterocigota y 2/20 colonias con BRAF WT; en la línea (#3) 16/17 colonias fueron heterocigotas para BRAF y 1/17 colonias fue BRAF WT; y en la línea (#4) coexistían colonias con mutaciones BRAF V600E y V600K. Por lo tanto, la persistencia en algunos tumores de células malignas con BRAF WT podría explicar la rápida resistencia observada al inhibidor PLX 4032.

**587. (343) LA PROTEINA QUINASA C BETA (PKCB) INHIBE LA PROGRESIÓN TUMORAL DE CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA PANCREÁTICO HUMANO PANC1.**  
Cirigliano S.<sup>1</sup>; Mauro L.<sup>2</sup>; Grossoni V.<sup>3</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>4</sup>; Colombo L.<sup>5</sup>; Puricelli L.<sup>6</sup>; Urtreger A.<sup>7</sup>  
*Instituto de Oncología Ángel Roffo, Área de Investigación<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
smcirigliano@gmail.com

El cáncer de páncreas es una enfermedad letal con una supervivencia a 5 años cercana al 5%. Los tratamientos convencionales tienen poco impacto en la evolución de la enfermedad, por lo que se requiere nuevas opciones terapéuticas. Los miembros de la familia de PKC pueden actuar como moduladores de la progresión del cáncer de páncreas aunque la relevancia de cada isoforma no es clara. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la sobreexpresión de PKCb, sobre determinantes críticos de la progresión tumoral empleando la línea celular PANC1. Como control se utilizó esta línea transfectada con el vector de expresión vacío (pMTH-PANC1). In vitro, PKCb indujo una importante reducción en la capacidad proliferativa (tiempo de duplicación: 98,4±7,1 vs 60,3±4,2 hs en pMTH-PANC1), que se asoció con una disminución en los niveles de ERK1/2 fosforilado. Además, las células PKCb-PANC1 fueron más resistentes a la apoptosis inducida por privación de suero (% de supervivencia 58,54±4,1% vs 39,29±4,2% en pMTH-PANC1 p<0,05). Mediante citometría de flujo se demostró que la privación

de suero promueve el arresto de las células PKCb-PANC1 en la etapa G1 del ciclo celular (% de cél en G0/G1 86,7±1,0 vs 45,5±0,8 en pMTH-PANC1, p<0,05). Por otro lado, las células PKCb-PANC1 fueron más sensibles a la apoptosis inducida por doxorubicina (Dox) (45,43±4,8% vs 67,60±4,3% en pMTH-PANC1, 6uM Dox, p<0,05). Además, la sobreexpresión de PKCb redujo la capacidad invasiva in vitro en cámaras transwell (célx10 campos: 2,22±0,9 vs 10,10±2,6 en pMTH-PANC p<0,05) comportamiento que se asoció con la inhibición de la secreción de proteasas (uPA: 4,11±0,8 vs 12,32±4,1 UI/mg/24hs en pMTH-PANC1 p<0,05 y MMP-9: 15,24±0,03 vs 24,89±2,6 UA/mg en pMTH-PANC1 p<0,05). En conclusión, nuestros resultados sugieren que isoforma PKCb genera cambios compatibles con la inhibición de la progresión tumoral en células pancreáticas humanas PANC1.

**588. (348) EFECTOS DE LA HIPERTERMIA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PROTEÍNAS DE GOLPE DE CALOR Y EN EL DAÑO AL ADN INDUCIDO POR CISPLATINO EN CÉLULAS TUMORALES DEFICIENTES Y NO DEFICIENTES EN HMLH1.**  
Sottile M.<sup>1</sup>; Ciocca D.<sup>2</sup>; Vargas-roig L.<sup>3</sup>; Nadin S.<sup>4</sup>  
*Instituto de Medicina y Biología Experimental de Cuyo, CCT-Mendoza-CONICET<sup>1 2 3 4</sup>*  
msottile@mendoza-conicet.gob.ar

La exposición a una hipertermia moderada induce la síntesis de proteínas de golpe de calor (HSPs). HSP27 y HSP72 son críticas para la proliferación y supervivencia celular y se han asociado con resistencia a drogas antineoplásicas como cisplatino (CPT). CPT produce uniones cruzadas en el ADN, reconocidas por el sistema de reparación "Mismatch Repair" (MMR). Aún se desconoce si HSPs están vinculadas con el sistema MMR. Objetivo: Analizar la expresión a nivel de ARNm de HSP27, HSP72, HSF1, hMLH1 y hMSH2 y el daño al ADN inducido por hipertermia y/o CPT en líneas celulares de adenocarcinoma colorectal deficientes y no deficientes en sistema MMR (hMLH1). Métodos: Las líneas HCT116 y HCT116+ch2 (MMR incompetente) y HCT116+ch3 (MMR competente) fueron expuestas a: 1- Golpe de calor (GC) a 41 y 42°C (1 hora); 2- CPT, 10  $\mu$ M (1 hora); 3- GC+CPT, 10  $\mu$ M (1 hora) 24 horas después de un GC a 42°C (1 hora). Las células fueron recolectadas a tiempo 0, 4 y 24 hs después de los tratamientos. Se realizó qRT-PCR y alkaline comet assay. Resultados: La expresión constitutiva de HSP27 y HSP72 en HCT116+ch3 fue significativamente mayor que en HCT116. Luego del GC, la transcripción de HSP27, HSP72 y HSF1 aumentó significativamente en todas las líneas celulares, siendo mayor en HCT116+ch3. El GC incrementó la expresión de hMLH1 (P<0,001) y de hMSH2 (P< 0,001) en HCT116+ch3. CPT disminuyó la expresión de HSP27 en HCT116+ch3. 24 horas después de GC+CPT, se observó un incremento en la expresión de HSF1 (P<0,001) y hMLH1 (P<0,001) en HCT116+ch3, cuyos niveles fueron superiores a los de la línea parental (P<0,001). El GC redujo un 30% la formación de aductos de CPT en HCT116+ch3 (P<0,001). Conclusiones: la expresión de los genes HSP27, HSP72, HSF1, hMLH1 y hMSH2 se modifica en respuesta al estrés térmico en presencia de un sistema MMR deficiente. La hipertermia modula la sensibilidad a CPT en células con un sistema MMR competente, lo cual sugiere su participación en la respuesta al estrés.

**589. (400) SÍNTESIS DE QUINONAS E HIDROQUINONAS SINTETIZADAS A PARTIR DE ÁCIDOS BILIARES. ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL.**  
Knott M.<sup>1</sup>; Siless G.<sup>2</sup>; Puricelli L.<sup>3</sup>; Palermo J.<sup>4</sup>  
*Instituto de Oncología Ángel H Roffo<sup>1 3</sup>; UMYMFOR - Departamento de Química Orgánica, FCEN, UBA<sup>2 4</sup>*  
helenknott85@gmail.com

La mayoría de las drogas citotóxicas empleadas en la terapéutica de pacientes oncológicos tiene efectos colaterales, siendo importante la búsqueda de nuevos compuestos con alta efectividad antitumoral y menor toxicidad. Los productos naturales derivados de invertebrados marinos poseen estructuras moleculares novedosas. Como su obtención es sumamente difícil, nuestro objetivo fue sintetizar quinonas (Q) e hidroquinonas (HQ), compuestos or-

gánicos presentes frecuentemente en organismos marinos, a partir de sustancias naturales de fácil acceso, como los ácidos biliares (AB). **Materiales y Métodos:** Síntesis de Q e HQ: Estas se prepararon a partir de AB utilizando una reacción de descarboxilación fotoquímica de ésteres de Barton como paso clave, con posterior captura por benzoquinona de los radicales libres resultantes. Para la descarboxilación fotoquímica se irradió con una lámpara de tungsteno de 300W en atmósfera de N<sub>2</sub>, manteniendo la T a 0° en baño de hielo. Estudio de la actividad citotóxica/citostática: Esta se evaluó sobre las líneas LM3 (carcinoma de mama murino) y PANC1 (carcinoma ductal de páncreas humano) mediante el cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC50) utilizando el método MTS, luego de 72 hs de incubación. Como control positivo se usó el quimioterápico Doxorubicina (Dox). **Resultados.** Se sintetizaron y caracterizaron por técnicas de 2D NMR doce Q e HQ (PM= 370-540). Si bien la mayoría de estos presentó actividad citostática/citotóxica in vitro con valores de IC50 >20 µM, el compuesto LQH (23-hydroquinoyl-3a-hydroxy-24-nor-5b-colano) presentó una importante actividad antiproliferativa [IC50 (µM) LM3:LQH 5,6±1,0 vs Dox: 0,5±0,1; PANC1:LQH 12,1±7,5 vs Dox: 20,2±3,3]. **Conclusiones.** De los doce compuestos sintetizados LQH demostró ser altamente citotóxico en la línea LM3, con una IC50 diez veces menor respecto del quimioterápico Dox, y tener similar actividad citotóxica que Dox sobre la línea de cáncer de páncreas altamente quimiorresistente PANC1.

**590. (404) EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE ISOFORMAS DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA DETERMINA LA RESPUESTA TUMORAL A ANTIPROGESTAGENOS Y PROGESTÁGENOS.**

Wargon V.<sup>1</sup>; Novaro V.<sup>2</sup>; Lanari C.<sup>3</sup>

IBYME<sup>1,2,3</sup>

victoria.wargon@gmail.com

En un modelo de carcinogénesis mamaria murina inducida por la administración de medroxiprogesterona (MPA) hemos demostrado que tanto la resistencia de novo como la adquirida a los antiprogéstágenos RU486 y ZK230211 están asociadas a una menor expresión de la isoforma A del receptor de progesterona (RPA). La expresión de RPA está silenciada por metilación de su promotor sólo en los tumores 59-HI y C4-2-HI que presentan resistencia de novo. El silenciamiento de RPA puede revertirse mediante un tratamiento corto con el agente desmetilante 5azadC combinado con un inhibidor de las HDAC, TSA, sensibilizando a los tumores al tratamiento con RU486. Curiosamente el crecimiento del tumor C4-2-HI es estimulado por RU486. En otros dos tumores con resistencia adquirida no se conoce aún el mecanismo de regulación de la expresión de RPA. El objetivo de este trabajo fue por un lado generar nuevas variantes tumorales con resistencia adquirida al RU486 y validar el cambio en la expresión de isoformas de RP previamente observado, y por otro, evaluar si los tumores resistentes de novo C4-2-HI con bajos niveles de RPA que son estimulados por RU486 pueden ser inhibidos con MPA. Obtuvimos dos variantes nuevas con resistencia adquirida, C7-2-HIR y 32-2-HIR y ambas mostraron una inhibición marcada de RPA por lo que contamos ahora con cuatro variantes resistentes con bajos niveles de RPA reforzando la hipótesis que postula que los tumores con bajos niveles de RPA no responden al RU486. Con respecto al tumor C4-2-HI, mostramos una inhibición significativa del crecimiento tumoral con el tratamiento con MPA (p<0.001). Más aún, el efecto inhibitorio del MPA en los tumores C4-2-HI se revierte mediante el co-tratamiento con 5azadC y TSA el cual logra reexpresar RPA. En conclusión, hemos demostrado con estos resultados que el patrón de expresión de RPA/RPB determina la respuesta al tratamiento con progestágenos o antiprogéstágenos.

**591. (437) ANÁLISIS DE LA METILACIÓN EN EL CÁNCER COLORRECTAL (CCR)**

Pellegrini M.<sup>1</sup>; Vaccaro C.<sup>2</sup>; Argibay P.<sup>3</sup>; Redal M.4; Gomez D.<sup>5</sup>

Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>1,3,4</sup>; Servicio de Cirugía

General del Hospital Italiano de Buenos Aires<sup>2</sup>; Laboratorio de Oncología Molecular, UNQ<sup>5</sup> maria.pellegrini@yahoo.com.ar

La metilación del ADN es una propiedad epigenética involucrada en la regulación de la expresión de genes con impronta genómica (IG). Actualmente los cambios epigenéticos han tomado mayor importancia en la carcinogénesis. En el CCR se encuentran implicadas alteraciones en la metilación de una región del cromosoma 11p15.5, involucrando los genes IGF2 y H19. El IGF2, involucrado en la proliferación celular, presenta IG, expresándose el alelo paterno, se localiza río arriba del H19, el cual también presenta IG. H19 ha sido propuesto como un potencial gen supresor de tumores. La expresión de ambos genes se encuentra asociada a zonas diferencialmente metiladas (DMRs). La modificación del patrón de metilación de los DMRs altera la expresión génica y predispone a la formación de tumores. El objetivo del trabajo fue evaluar la metilación en la región comprendida entre los genes IGF-2 y H19 en muestras de mucosa normal y tumor de CCR. Previa firma del consentimiento informado, se analizaron 9 muestras de tumores junto con su correspondiente mucosa normal pertenecientes a pacientes diagnosticados con adenocarcinoma colorrectal estadio I, II y III, del Servicio de Cirugía del Hospital Italiano de Bs As. Todas las muestras se trataron con bisulfito para diferenciar las zonas metiladas. Luego se amplificó con primers específicos la región de interés y se digirió el producto con la enzima de restricción HhaI 5'ACGT3' analizando el estado de la metilación. Dos tumores presentaron el sitio metilado en ambos alelos mientras que en la mucosa normal se encontró la hemimetilación. Otras dos tumores presentaron el sitio hemimetilado mientras que el par normal no se observó metilación en ambos alelos. Las restantes presentaron hipometilación tanto en el tumor como en la mucosa normal. Los resultados obtenidos representan un enfoque inicial del estado de la metilación del sitio CpG analizado. Sugieren que la metilación se va diseminando desde el tumor hacia el tejido adyacente normal.

**592. (619) LA HIPOXIA INDUCE UNA DISMINUCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE RAC3 Y BCL-2/XL FAVORECIENDO LA AUTOFAGIA EN ETAPAS AVANZADAS DEL DESARROLLO TUMORAL**

Fernandez Larrosa P.<sup>1</sup>; Alvarado C.<sup>2</sup>; Rubio F.<sup>3</sup>; Ruiz Greco M.<sup>4</sup>; Panelo L.<sup>5</sup>; Costas M.<sup>6</sup>

IDIM-CONICET<sup>1,2,3,4,5,6</sup>

pabloferla@hotmail.com

Durante el desarrollo tumoral, la autofagia actúa inicialmente como supresor pero en etapas más avanzadas protege a las células tumorales de las condiciones de ayuno y de hipoxia. Previamente, nuestro grupo ha demostrado que RAC3, un coactivador de hormonas esteroideas y del factor de NF-κB, puede ejercer acciones citoplasmáticas modulando kinasas, inhibiendo la apoptosis y regulando la autofagia. Sin embargo, resulta difícil responder que ocurre a nivel de etapas tardías, en condiciones de hipoxia. Con este fin, células de la línea HEK293 (con niveles autolimitantes de RAC3) y de las líneas tumorales T84, HCT116, Lovo y T47 (con altos niveles de RAC3) fueron incubadas en hipoxia o en condiciones normales (control) y se evaluó la expresión de RAC3 y los Bcl-2 y -xL, mediante cuantificación de ARNm por qRT-PCR o de proteína por Western Blot, y los niveles de autofagia. En condiciones de hipoxia, se observó una disminución drástica y significativa de los niveles de expresión de RAC3 (aproximadamente 40% con respecto los controles, p<0,01), Bcl-2 (aprox. 40% con respecto los controles, p<0,01) y Bcl-xL (aproximadamente 30% con respecto los controles, p<0,01; a excepción de T84 que mostraron un 50% de los niveles controles, p<0,05). Dicha bajada correlacionó con un aumento de los niveles de autofagia, condicionándose con lo esperado según la bibliografía. En conclusión, las condiciones de hipoxia inducen una disminución en la expresión de RAC3 y de las proteínas Bcl-2/xL permitiendo que ocurra la autofagia en etapas avanzadas. De esta manera, se favorecería la sobrevida tumoral hasta que ocurra la angiogénesis.

**593. (646) EFECTO ANTITUMORAL DEL TRASTUZUMAB EN UN MODELO DE CRECIMIENTO EN 3D DE CÉLULAS DE TUMOR DE MAMA HUMANO**

Rodriguez C.<sup>1</sup>; Moverer L.<sup>2</sup>; Reidel S.<sup>3</sup>; Marino L.<sup>4</sup>; Bal De Kier Joffé E.<sup>5</sup>; Jasnis M.<sup>6</sup>; Fiszman G.<sup>7</sup>  
*Instituto de Oncología A.H. Roffo, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*  
*crisinaerodriguez@gmail.com*

El receptor HER2, sobreexpresado en 20-25% de tumores de mama invasivos, se asocia a una baja supervivencia libre de enfermedad. El Trastuzumab (Tz), Ac monoclonal anti HER2, se utiliza como inmunoterapia de los tumores de mama HER2+; pero cerca del 60% no responde. El objetivo del trabajo es estudiar el efecto del Tz sobre el crecimiento en 3D (esferoides) de células de adenocarcinoma de mama humano HER2+ (línea BT474). Los esferoides crecieron en suspensión en medio líquido (uno por pozo sobre una capa de agar 1,5%) hasta llegar a 2,5mm de diámetro a los 62 días. Se observó expresión positiva de HER2, Rc Progesterona, Rc Estrógeno, HIF-1, Bcl-2 y Ki67 por inmunohistoquímica; mostrando una morfología tumoral con células proliferantes, quiescentes y apoptóticas hacia el centro hipóxico del esferoide. Se analizó el efecto de Tz (10 y 50 ug/ml/ esferoide, 3 veces/semana) sobre el crecimiento de los esferoides BT474, iniciándose con un volumen de 0,233 ± 0,03 mm<sup>3</sup>. Como control negativo se usó IgG comercial que no mostró diferencias significativas respecto al control sin tratar. Tz 10 ug/ml detuvo el crecimiento de los esferoides a partir del día 7 (3 dosis) mientras que Tz 50 ug/ml indujo una reducción del volumen desde la primera dosis hasta alcanzar, al día 24, un 71% de inhibición del crecimiento respecto al control sin tratar (0,120 ± 0,04 mm<sup>3</sup> vs 0,449 ± 0,03 mm<sup>3</sup>, respectivamente, p<0,001). Los esferoides mostraron menor sensibilidad al efecto inhibitorio del Tz 10 ug/ml, comparado con las mismas células cultivadas en monocapa. El medio condicionado (MC) de esferoides + Tz 50 ug/ml indujo un aumento de más de 3 veces en la producción de MMP-9 por monocitos de sangre periférica de dadores normales vs el MC de esferoides sin tratar (p<0,01). El Tz no sólo ejerció un efecto citotóxico directo sobre el crecimiento en 3D de células BT474, sino que moduló en forma indirecta la producción de MMP9 por monocitos circulantes.

**594. (661) GENERACIÓN DE UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE LA MODULACIÓN DE LA QUIMIORESISTENCIA MEDIANTE EL USO DE ARN DE INTERFERENCIA ACOPLADO A NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

Batalla M.<sup>1</sup>; Cerda M.<sup>2</sup>; Benedetti L.<sup>3</sup>; Podhajcer O.<sup>4</sup>; Zysler R.<sup>5</sup>; Plank C.<sup>6</sup>; Duran H.<sup>7</sup>; Policastro L.<sup>8</sup>  
*Comisión Nacional de Energía Atómica<sup>1</sup>; Comisión Nacional de Energía Atómica, CONICET<sup>2 5 8</sup>; Fundación Instituto Leloir<sup>2</sup>; Fundación Instituto Leloir, CONICET<sup>2</sup>; Institute of Experimental Oncology and Therapy Research of the Technische Universität München, Alemania<sup>3</sup>; Comisión Nacional de Energía Atómica, CONICET, UNSAM<sup>4</sup>*  
*milenabatalla@hotmail.com*

La quimioresistencia es una de las principales causas de fracaso de los tratamientos oncológicos. En particular, el 5-fluorouracilo (5-FU) es la droga quimioterapéutica más utilizada para el tratamiento del cáncer colorectal. Sin embargo, la respuesta de los pacientes es solo del 15%, y en combinación con otras drogas como el oxaliplatino se obtiene una mejora en la respuesta del 40-50%. El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo en cáncer de colon para futuros estudios de quimiosensibilización mediada por el silenciamiento de genes asociados a la quimioresistencia utilizando nanovectores. Hemos desarrollado tres sublíneas celulares resistentes al 5-FU a partir de las líneas Caco-2, T-84 y HCT-116, denominadas Caco-2R, T-84R y HCT-116R respectivamente. Las sublíneas resistentes (SLR) se desarrollaron a partir de cultivos de las líneas parentales (LP) en dosis crecientes de 5-FU durante 6 meses. Las SLR mostraron 8-10 veces un incremento en la dosis inhibitoria 50 (IC50) respecto de las LP (p<0.01). La tasa de proliferación fue significativamente menor en las SLR respecto de las LP (p<0.01). Por otro lado, también hemos obtenido un clon

de la línea Caco-2 expresando la luciferasa de manera estable, a fin de generar un sistema de estudio para la optimización de nanovectores portadores de miRNA o siRNAs. En este sentido, hemos clonado el miARN contra la luciferasa en el plásmido pcDNA3 y lo hemos acoplado a nanopartículas magnéticas. Estos complejos silenciaron la expresión de la luciferasa en presencia de un campo magnético (p<0.01). De este modo, hemos generado un modelo para futuros estudio de silenciamiento de genes asociados a la quimioresistencia mediante el uso de ARN de interferencias (siRNA o miRNA) acoplados a nanovectores.

**595. (693) LA ESTIMULACIÓN CON CITOQUINAS DE MADURACIÓN CAMBIA LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS HUMANAS DE MELANOMA APOPTÓTICAS-NECRÓTICAS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS**

Pizzurro G.<sup>1</sup>; Madorsky Rowdo F.<sup>2</sup>; Copati A.<sup>3</sup>; Pujol-Ireles L.<sup>4</sup>; Quesada-allué L.<sup>5</sup>; Roberti M.<sup>6</sup>; Teillaud J.<sup>7</sup>; Levy E.<sup>8</sup>; Barrio M.<sup>9</sup>; Mordoh J.<sup>10</sup>

*Centro de Investigaciones Oncológicas - Fundación Cáncer<sup>1 3 6 8 9 10</sup>; Fundación Instituto Leloir/IIBBA CONICET<sup>2 4 5 10</sup>; Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Paris<sup>6</sup>; UMER-S 872, INSERM UMR-S 872, Université Paris Descartes UMR-S 872, F-75006, France<sup>7</sup>*  
*gabriela.pizzurro@gmail.com*

El rol de las células dendríticas (CD) en la inmunidad anti-tumoral está en estudio. Previamente demostramos que cocultivando CD inmaduras (CDi) con células de melanoma cutáneo (CMC) irradiadas a 70 Gy (RT), se obtiene una vacuna (CD/Apo-Nec), que presenta con eficiencia los antígenos (Ags) MART-1 y gp100 a linfocitos T CD8+. En este trabajo, analizamos la interacción entre CD y CMC RT. 48h post-RT, las CMC presentaron 12,2% necrosis, 16,2% apoptosis temprana y 55,8% apoptosis tardía (Apo-Nec). Por tinción con BODIPY 493/503 se determinó un aumento de vesículas lipídicas en Apo-Nec 24-48h post-RT, disminuyendo a las 72h post-RT. En el análisis bioquímico se vio el doble de triglicéridos y el triple de fosfatidilcolina, esfingomiélin y fosfatidiletanolamina que en CMC viables. Dada la variación en contenido lipídico, presunto inhibidor de presentación de Ags, comparamos el cocultivo de CDi con Apo-Nec 0h-post-RT (Apo-NecT0) y 72h-post-RT (Apo-NecT72). En ambos casos, CD/Apo-Nec mostró niveles intermedios de maduración respecto de CD+LPS (ej. CDi/ CD/Apo-NecT0/ CD+LPS CD80: 10,9±6,9%/ 29,8±14,1%/ 52,9±25,4%; CD83: 8,4±4,5%/ 9,2±3,0%/ 28,1±23,8%). Ambos cocultivos presentaron eficientemente MART-1 a un clon CD8+ específico (CDi/ CD/Apo-NecT0/ CD/Apo-NecT72 1852±13/ 7011±93/ 8665±85 pg/ml IFN $\gamma$ ), pero fueron pobres estimuladoras de una reacción linfocitaria mixta (MLR) (CDi/ CD/Apo-NecT0/ CD/Apo-NecT72 1490±360/ 2002±803/ 1590±730 cpm 3[H]dTd). Cuando se agregó un cóctel de citoquinas (CC) (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 y PGE2) al cocultivo, la maduración de CD/Apo-Nec fue más consistente (ej. CD/Apo-NecT0/ CD/Apo-NecT72 CD80: 71,9±14,6%/ 73,0±21,0% CD83: 64,2±10,2%/ 58,3±23,2%), se generó una MLR robusta (p<0.001) y se preservó la capacidad de presentar MART-1. Sugerimos que al cocultivar CDi con Apo-NecT0 la presencia de lípidos no interfiere en su capacidad inmunogénica si se agrega el CC, siendo ésta aún más eficiente. Se presentará un modelo que engloba los hallazgos observados.

**TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES 5**

**596. (19) REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL EN FIBROSIS QUISTICA**

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

*Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica Argentina<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</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>). Estudios previos de nuestro laboratorio confirman que existe una falla mitocondrial en FQ localizada en el 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, estudiamos la posible regulación por CFTR de la expresión de IL-1 $\beta$ . Mediciones previas por RT-PCR semicuantitativa en dos modelos de FQ mostraron un aumento en la expresión del ARNm de la citoquina en las células FQ con respecto a los controles. Se procedió a confirmar estos resultados por Real Time PCR. Las mediciones se realizaron en tres líneas celulares: IB3-1 (mutación  $\Delta$ F508 que afecta el transporte de Cl<sup>-</sup>), S9 y C38 (IB3-1 corregidas mediante un vector viral que expresa CFTR wt). Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa de expresión de IL-1 $\beta$  en IB3-1 comparada con las células controles (S9 y C38). Por otro lado, se determinó el efecto de IL-1 $\beta$  en la actividad mitocondrial en estas mismas tres líneas celulares. Se incubaron las células con IL-1 $\beta$ , se aislaron mitocondrias y se midió la actividad del mCx-I mediante la técnica "Blue Native Gels". En las células controles, al estimular con IL-1 $\beta$ , se observó una disminución de la actividad del mCx-I, mientras que en las células FQ la actividad basal baja no se vio afectada. 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 próximo objetivo es estudiar cuales son las vías involucradas en la regulación de la actividad del mCx-I por IL-1 $\beta$ . Agradecimientos: Subsidios CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT-2007,0628) y UCA. Becas CONICET (AGV, GS, MMMC), ANPCYT (MC) y UCA (FS, GLT, MLT).

**597. (22) PARP1 ESTÁ INVOLUCRADO EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DEL RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

Aprile Garcia F.<sup>1</sup>; Senin S.<sup>2</sup>; Antunica Noguero M.<sup>3</sup>; Liberman A.<sup>4</sup>; Arzt E.<sup>5</sup>  
Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, DFBMC, FCEN, UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>1 2 3 4 5</sup>  
faprile@fbmc.fcen.uba.ar

Los receptores P2X7 son canales de calcio activados por ATP. En sistema nervioso central, regulan la liberación de neurotransmisores y citoquinas, y la activación glial frente a situaciones inflamatorias. Sus efectos son mediados por activación de la vía de las MAPK que incluye a Braf y ERK1/2. Con el objetivo de buscar proteínas involucradas en la transducción de señales de P2X7 asociadas a inflamación, realizamos ensayos de inmunoprecipitación (IP) de Braf en condiciones basales o estimuladas con Bz-ATP (50 $\mu$ M) en células neuronales expresoras de P2X7. Los inmunoprecipitados se resolvieron por SDS/PAGE y las bandas diferenciales fueron identificadas por espectrometría de masa. Así detectamos a la Poli ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP1) cuya interacción con Braf disminuye tras el estímulo con Bz-ATP. PARP1 media la respuesta celular a procesos inflamatorios. Su activación produce la Poli-ADP ribosilación de proteínas blanco, lo que lleva, entre otros efectos, a la expresión de genes involucrados en inflamación. Mediante Co-IP en líneas celulares HT22 (murina hipocámpal) y 1321-N1 (astrocitaria humana) expresoras de P2X7, corroboramos los resultados del análisis proteómico. Estudiamos distintos niveles de participación de PARP1 en la activación y señalización de P2X7. Medimos el ingreso de calcio extracelular en células HEK293 sobreexpresoras de P2X7 por microscopía de fluorescencia: RNA de interferencia (RNAi) contra PARP1 aumentó significativamente la entrada de calcio ( $p < 0.01$ ). Mediante ensayos de Western Blot detectamos disminución en la fosforilación de ERK1/2 con RNAi contra PARP1. Por otra parte, Bz-ATP produjo un aumento de los niveles totales de Poli-ADP ribosilación. Este fenómeno fue revertido por: PD98059 (200 $\mu$ M) (inhibidor de MEK), EGTA (10mM) (quelante de calcio) y RNAi

contra PARP1. Estos resultados identifican a PARP1 como modulador de la transducción de señales de P2X7, y describen por primera vez a P2X7 como activador de PARP1.

**598. (42) VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DEL MC4R EN ASTROCITOS**

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

Las melanocortinas (ACTH,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -MSH) son neuropéptidos con acciones anti-inflamatorias y neuroprotectoras. Se identificaron 5 subtipos de receptores (MCRs), de los cuales el MC3R y el MC4R son los que se expresan en el cerebro. Previamente demostramos que el  $\alpha$ -MSH ejerce una acción anti-inflamatoria a través del MC4R en el hipotálamo de ratas macho y en astrocitos. Los astrocitos expresan el MC4R, siendo el único MCR presente en estas células. Recientemente, demostramos que la activación del MC4R por el análogo NDP-MSH induce la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) a través de la vía AMPc-proteína quinasa A-CREB en astrocitos. En el presente trabajo, investigamos otras vías de señalización utilizadas por el MC4R en astrocitos. Para esto preincubamos por 15 min a las células con inhibidores de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K)/Akt. Luego, los astrocitos fueron incubados por 1 h con NDP-MSH y se determinaron los niveles del ARNm de BDNF por real time PCR. Dentro de las MAPKs, solo el inhibidor de las ERKs (PD98059 10  $\mu$ M) bloqueó el aumento en la expresión del BDNF inducido por NDP-MSH (Control: 1,000 $\pm$ 0,108; NDP-MSH: 2,034 $\pm$ 0,020\*\*; PD: 1,175 $\pm$ 0,006; NDP-MSH+PD: 1,304 $\pm$ 0,014; \*\* $p < 0.01$ ). Por otro lado, la presencia del inhibidor de la PI3K (LY294002 20  $\mu$ M) disminuyó la expresión basal de BDNF así como la inducida por NDP-MSH (Control: 1,000 $\pm$ 0,052; NDP-MSH: 1,802 $\pm$ 0,214\*; LY: 0,804 $\pm$ 0,063\*; NDP-MSH+LY: 0,927 $\pm$ 0,129; \* $p < 0.05$ ). Sin embargo, el inhibidor de Akt (0.5  $\mu$ M) no modificó los niveles del ARNm de BDNF basales o inducidos por NDP-MSH. Además, medimos la fosforilación de ERK por western blot en extractos proteicos de astrocitos tratados 30 min con NDP-MSH. pERK1y2 aumentó en presencia de la NDP-MSH. Estos resultados sugieren que la activación del MC4R en astrocitos, además de activar la vía cAMP-PKA-CREB, induce la vía de las ERK1/2 y de la PI3K pero independientemente de Akt.

**599. (78) EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA DE GH SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE EGF**

Díaz M.<sup>1</sup>; Gonzalez L.<sup>2</sup>; Miquet J.<sup>3</sup>; Micucci G.<sup>4</sup>; Sotelo A.<sup>5</sup>; Turyn D.<sup>6</sup>  
Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas<sup>1 2 3 4 5 6</sup>  
m\_euge\_diaz@hotmail.com

La hormona de crecimiento (GH) interviene en la estimulación del crecimiento postnatal y tiene también importantes acciones metabólicas. Se utiliza en la práctica endocrinológica para el tratamiento de diversas condiciones clínicas; se administra por vía subcutánea y en forma intermitente. El uso crónico de GH tiene importantes efectos colaterales, entre ellos, el aumento en la incidencia de tumores. La GH activa vías relacionadas con la oncogénesis no sólo mediante la activación de su receptor específico, sino también mediante la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Además, la GH modula la expresión de este receptor. El objetivo de este estudio fue analizar los efectos de la administración subcutánea de GH sobre la señalización de EGF en hígado. Para ello, ratones hembra de la cepa Swiss fueron inyectados por vía subcutánea con GH (1 mg/kg) durante una semana. Finalizado el período de tratamiento, los animales recibieron un estímulo agudo con EGF o solución salina 10 minutos antes del sacrificio para evaluar los efectos de la exposición prolongada a GH sobre la activación de las vías de señalización del EGF. Los resultados mostraron un aumento del contenido proteico del EGFR y de su fosforilación en tirosinas tras el estímulo con EGF en los ratones tratados en forma intermitente con GH. Asimismo, se observó en estos animales un leve aumento de la activación de Erk1/2 y Akt, y

un incremento muy significativo de la activación de STAT3 y STAT5 por EGF. Sin embargo, el contenido proteico de estas proteínas no sufrió variaciones tras el tratamiento con GH. La administración intermitente de GH estimuló la expresión de las proteínas urinarias mayoritarias (MUPs), evidenciando el patrón pulsátil de administración de la hormona. En conclusión, inyecciones intermitentes de GH aumentan la expresión del EGFR y consecuentemente la activación de sus vías de señalización, fundamentalmente las mediadas por las STATs.

**600. (53) ROL DE MODULADORES NEGATIVOS EN EL CRECIMIENTO DE RATONES QUE SOBREEXPRESAN LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)**

Martínez C.<sup>1</sup>; Piazza V.<sup>2</sup>; Miquet J.<sup>3</sup>; Ramírez M.<sup>4</sup>; Becu-villalobos D.<sup>5</sup>; Turyn D.<sup>6</sup>; Sotelo A.<sup>7</sup>

*Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas UBA-CO-NICET<sup>1 2 3 6 7</sup>; IBYME<sup>4 5</sup>*  
carolinasmartinez@gmail.com

Ratones transgénicos que sobreexpresan la hormona de crecimiento (GH) presentan un crecimiento acelerado a partir de la tercera semana de vida, y alcanzan el doble de tamaño corporal que los hermanos de camada no transgénicos. La principal vía de señalización de la GH relacionada con el crecimiento corporal, la vía JAK2/STAT5, se encuentra desensibilizada en animales transgénicos adultos, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la activación de STAT5 y la expresión de moduladores negativos de esta vía durante el período de crecimiento. Ratones normales y transgénicos PEPCK-bGH de 2, 4 y 9 (adulto joven, referencia) semanas de vida recibieron 5 µg/g de peso corporal de GH, durante 7,5 minutos. Se evaluó en hígado la activación de STAT5a/b (fosforilación del residuo Tyr694/699) y la expresión proteica y génica de los supresores de la vía, por Western-blotting y RT-PCR en tiempo real, respectivamente. Se observa un aumento en la fosforilación de STAT5 en ratones normales estimulados con GH para las tres edades (p<0,001), pero no en los transgénicos. La fosforilación basal de STAT5 tampoco es mayor en los ratones transgénicos respecto de los normales a pesar de la mayor concentración de GH que presentan. Los niveles del supresor de la señal de citoquinas CIS y de la fosfatasa PTP1B están aumentados en los transgénicos en todas las edades (p<0,05 y p<0,01). Los niveles proteicos de SOCS2 y 3 se encuentran disminuidos en ratones transgénicos (p<0,05); sin embargo los niveles de ARNm están aumentados (p<0,05), lo que sugiere que estos supresores estarían actuando sobre la vía y degradándose. Las fosfatases SHP1 y SHP2 no varían por edad ni genotipo. Por lo tanto, si bien los ratones transgénicos presentan mayor tamaño corporal, en hígado tienen desensibilizada la principal vía de traducción de la GH en todas las edades estudiadas. Esto podría explicarse por la mayor expresión de supresores que actúan sobre la vía.

**601. (118) EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VDAC1 EN UN MODELO CELULAR DE FIBROSIS QUÍSTICA.**

Taminelli G.<sup>1</sup>; Valdivieso A.<sup>2</sup>; Sánchez F.<sup>3</sup>; Clauzure M.<sup>4</sup>; Mas-sip Copiz M.<sup>5</sup>; Schulman G.<sup>6</sup>; Teiber M.<sup>7</sup>; Santa Coloma T.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Programa de Investigaciones Biomédicas UCA-CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Pontificia Universidad Católica<sup>1 2 3 4 5 6 7 8</sup>*  
gtaminelli@gmail.com

En nuestro laboratorio hemos trabajado durante varios años en el estudio de la expresión diferencial de algunas proteínas mitocondriales como CISD1 (Taminelli, 2008) y MTND4 (Valdivieso, 2007) y en la medición de la actividad NADH deshidrogenasa del Complejo I de la cadena respiratoria (Valdivieso, 2011, en prensa), en modelos celulares de FQ. La actividad NADH deshidrogenasa medida in gel mediante BN-PAGE fue normalizada inicialmente usando la densitometría de las bandas de proteínas teñidas con Coomassie. Posteriormente, con el objeto de contar con un estándar interno mitocondrial, se procedió a realizar WBs en paralelo con los BN-PAGE. En dichos WBs hemos medido la expresión de la subunidad UQCRC1 del Complejo III de la cadena respiratoria y la subunidad VDAC1. La proteína VDAC1

(Voltage Dependent Anion Channel 1) del poro mitocondrial es ampliamente utilizada como estándar interno para "Western blots" (WBs), en experimentos realizados en el estudio de expresión y actividad de proteínas mitocondriales. Inesperadamente, nuestros estudios evidencian un patrón de expresión diferencial de VDAC1 respecto de la proteína UQCRC1 en líneas celulares C38, S9, IB3-1 del modelo celular de fibrosis quística, tratadas con 20 µM isoproterenol, 500 µM IBMX y 200µM db-AMPC. Recientemente se ha observado una expresión diferencial de VDAC1 en líneas celulares de cardiomiocitos en distintos estadios de diferenciación tratadas con isoproterenol (Branco, 2011). El tratamiento de las células C38 con la mezcla de activadores del CFTR provocó una disminución de la expresión de VDAC1. Dicho efecto no fue observado en las células S9 e IB3-1, por lo que la delección en la región amino terminal del CFTR que portan las células C38 podría intervenir, al menos en parte, en el comportamiento diferencial de la expresión de VDAC1. Agradecimientos: Subsidios del CONICET (PIP 2009-2011), ANPCYT (PICT2007, 0628) y UCA. Becas CONICET (AGV, GS y MMMC), ANPCYT (MC) y UCA (GLT, FS, MLT).

**602. (178) LA ACTIVACIÓN DE LA GLUCÓGENO SINTASA QUINASA 3 β (GSK-3β) EN CÉLULAS DE LA PAPIA DÉRMICA (DPC) IMPIDE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO PILOSO (HFSC) EN LA ALOPECIA ANDROGENÉTICA.**

Leirós G.<sup>1</sup>; Castellanos M.<sup>2</sup>; Kusinsky A.<sup>3</sup>; Balañá M.<sup>4</sup>

*Instituto de Ciencia y Tecnología César Milstein; Fundación Cassará<sup>1 2 3 4</sup>*  
gleiros@fundacioncassara.org.ar

Las células madre del folículo piloso (HFSC) migran a la matriz del pelo e inician su división y diferenciación bajo la influencia de factores paracrinos producidos por la papila dérmica. Durante el desarrollo de la alopecia androgenética, los andrógenos que actúan a través de la DP, provocan la miniaturización de los folículos sensibles del cuero cabelludo. Por el contrario, la vía Wnt/β-catenina afecta positivamente el crecimiento del pelo de mamífero. Resultados previos de nuestro laboratorio indican que los andrógenos inhiben significativamente, vía DPC, la diferenciación a pelo de las HFSC. Dicho efecto es revertido cuando las DP se tratan con LiCl, activador de la vía de la β-catenina. Este estudio propone estudiar la interacción de la vía androgénica con la vía de señalización Wnt/β-catenina en las DPC e investigar los efectos de los andrógenos sobre la diferenciación de las HFSC. En cultivos primarios de DPC tratados con dihidrotestosterona (DHT), la relación de expresión de β-catenina citoplasmática/total es 5 veces (p<0.01) menor respecto al control, indicando una inhibición de la vía canónica de Wnt. La GSK-3β promueve la degradación de la β-catenina libre en citosol y se inactiva por fosforilación. La formación de complejos proteicos es otra manera de regular su actividad. La presencia de DHT en cultivos primarios de DPC regula positivamente la expresión de GSK-3β (p<0.05) y promueve su interacción física con el receptor de andrógenos, evidenciado por inmunoprecipitación. El LiCl inhibe GSK-3β por fosforilación en Serina-9 (GSK-3βP). En los cultivos de DPC tratados con LiCl, el aumento del nivel de GSK-3βP observado por Western blot se bloqueó cuando las células fueron cultivadas en presencia de LiCl y DHT (p<0.001). Estos resultados sugieren que la activación de GSK-3β en presencia de andrógenos inhibe la vía canónica Wnt en DPC, que resultaría necesaria para la secreción de factores paracrinos que intervienen en la diferenciación de las HFSC.

**603. (196) ACTIVACIÓN DE LAS PRINCIPALES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GH) EN MÚSCULO DURANTE EL PERÍODO DE CRECIMIENTO EN RATONES**

Piazza V.<sup>1</sup>; Martínez C.<sup>2</sup>; Miquet J.<sup>3</sup>; Turyn D.<sup>4</sup>; Sotelo A.<sup>5</sup>  
*IQUIFIB - Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas<sup>1 2 3 4 5</sup>*

vero\_piazza@hotmail.com

La hormona de crecimiento (GH) promueve el crecimiento corporal posnatal, actuando principalmente sobre hígado, músculo y



huesos largos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el grado de activación de las principales vías de señalización de la GH, las vías de STATs, MAPK y PI3K, en tejido muscular durante el período de crecimiento. Se trabajó con ratones de tres edades representativas: 1 semana (crecimiento independiente de GH), 2,5 semanas (crecimiento dependiente de GH) y 9 semanas (adulto joven). Se utilizaron ratones de ambos sexos, ya que el perfil de secreción de la hormona presenta dimorfismo sexual. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de GH o de solución salina 7,5 minutos antes del sacrificio. Se extrajo el músculo de las patas traseras, tejido en que se analizó el grado de activación y el contenido proteico de los mediadores de las vías en estudio por inmunotransferencia. La vía JAK2/STAT5 es la principal estimulada por la GH. Al evaluar STAT5 se observó que los animales de 1 semana de edad no responden al estímulo con hormona, mientras que los de 2,5 y 9 semanas de vida sí lo hacen, en coincidencia con el inicio del período de crecimiento dependiente de GH. Se evaluaron mediadores centrales de las otras cascadas activadas por la GH relacionadas con crecimiento. Se analizó ERK1/2 de la vía MAPK, y Akt, GSK3 y mTOR de la vía PI3K. Se observó que estas vías no responden a un estímulo exógeno de GH, al menos en el mismo tiempo que la vía principal. En todos los casos se observó que el contenido proteico disminuye con la edad, y que la fosforilación basal exhibe la misma tendencia aunque no en todos los casos se encontraron diferencias estadísticamente significativas. En ningún caso observamos variación por sexo. La mayor abundancia de estos mediadores a edades tempranas, como también su mayor grado de activación basal, estarían contribuyendo al aumento de la masa muscular, fundamental en las primeras semanas de vida.

**604. (247) LA SEÑALIZACIÓN AMPK/PKA MODULA LA PRODUCCIÓN MITOCONDRIAL DE ROS Y LA ACTIVACIÓN APOPTÓTICA EN HEPATOCITOS ANTE RESTRICCIÓN DE GLUCOSA**

Ferretti A.<sup>1</sup>; Mattaloni S.<sup>2</sup>; Taborda D.<sup>3</sup>; Larocca M.<sup>4</sup>; Favre C.<sup>5</sup>  
*IFISE, CONICET-UNR<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
*anacecisky@hotmail.com*

La ausencia de glucosa induce estrés oxidativo y apoptosis en diversos tipos celulares. Sin embargo, la regulación de la supervivencia ante carencia de glucosa en hepatocitos no ha sido aclarada. Previamente, demostramos que en hepatocitos cultivados sin glucosa durante 6 h se induce muerte apoptótica, asociada a un aumento temprano de especies reactivas del oxígeno (ROS). Tanto el desbalance de ROS como la apoptosis son totalmente prevenidos al inhibir la actividad o el anclaje de PKA. Por otro lado, reportamos que la inhibición de PKA durante la privación de glucosa produce un aumento en los niveles de ARNm de Sod1 y Cat. Está descrito que PKA puede regular la producción de ROS al modular la actividad de la cadena respiratoria. En el presente estudio analizamos la generación mitocondrial de ROS en hepatocitos privados de glucosa y el rol de PKA en esta producción. Observamos que el desacoplamiento parcial de la respiración en células tratadas con CCCP 0.5  $\mu$ M eliminó el aumento de ROS inducido por ausencia de glucosa. Verificamos que PKA se expresaba equitativamente en mitocondrias de hepatocitos en presencia ó ausencia de glucosa. La falta de glucosa indujo aumentos de 89 y 95% ( $p < 0,05$ ) en los niveles de AMPK en lisados de hepatocitos y en fracciones mitocondriales, respectivamente. Por último, estudiamos la participación de PKA en la producción de ROS en mitocondrias aisladas: La liberación mitocondrial de ROS durante la respiración con malato-piruvato ó succinato (no mostrado) aumentó en presencia de un activador de PKA (db-AMPC), mientras que disminuyó en presencia de inhibidores de PKA (H89/Rp-AMPC) (Control: 100%; dbAMP: 128,8 $\pm$ 10,2%; H89: 60,9 $\pm$ 5,9%, \* $p < 0,05$ ). Los resultados indican que la respiración contribuye al desbalance de ROS durante la ausencia de glucosa y sugieren que PKA regula la producción de ROS en esta condición. Proponemos un eje mitocondrial modulado por cAMP/PKA capaz de ejecutar el suicidio celular en respuesta a la falta de glucosa.

**605. (313) RELEVANCIA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE AKT SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS**

Romorini L.<sup>1</sup>; Fernandez Espinosa D.<sup>2</sup>; Bluguermann C.<sup>3</sup>; Videla Richardson G.<sup>4</sup>; Questa M.<sup>5</sup>; Sevlever G.<sup>6</sup>; Guberman A.<sup>7</sup>; Miriuka S.<sup>8</sup>  
*Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, LIAN, FLENI, Escobar<sup>1 2 3 4 5 6 8</sup>; Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA<sup>7</sup>*  
*leoromo@qb.fcen.uba.ar*

Las células madre embrionarias humanas (CMEh) presentan gran capacidad para diferenciarse in vitro y enorme potencial para ser usadas como fuente celular en medicina regenerativa. El factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) es fundamental para la supervivencia y el mantenimiento de la pluripotencia y auto-renovación de CMEh. bFGF activa la vía de PI3K/AKT en CMEh, por ende el objetivo de este trabajo es estudiar la relevancia y mecanismos moleculares involucrados en la supervivencia celular mediada por AKT en CMEh. Para ello, se cultivaron las líneas de CMEh WA01 (H1) y WA09 (H9) en presencia de bFGF hasta confluencia, y luego su naturaleza pluripotente fue validada mediante inmunofluorescencia y RT-PCR de los marcadores: TRA1-60, TRA1-81, SSEA-4, Oct-4 y Nanog. La viabilidad celular, medida con el ensayo de XTT, disminuyó de manera concentración dependiente luego del tratamiento durante 24 h tanto con los inhibidores de la PI3K, LY294002 y wortmanina, como con inhibidores que actúan río abajo, como el inhibidor IV de AKT, específico de una quinasa que activa a AKT; el inhibidor VIII de AKT, que impide la unión de AKT a membrana y GSK690693, que bloquea el sitio de unión del ATP a AKT; (LY294002 10 $\mu$ M: 57 $\pm$ 3,8% y 56,6 $\pm$ 7%; wortmanina 100nM: 38,6 $\pm$ 3,3% y 42,5 $\pm$ 7,2%; I. IV 1 $\mu$ M: 64,9 $\pm$ 6,8% y 82,2 $\pm$ 7,6%; I.VIII 10 $\mu$ M: 57,4 $\pm$ 4,4% y 47,1 $\pm$ 4%; GSK690693 1 $\mu$ M: 51,2 $\pm$ 3% y 51,8 $\pm$ 5%, vs. vehículo para H9 y H1, respectivamente). Por otro lado, se observó un aumento en la fragmentación del ADN, cuantificado por ensayo fotométrico de ELISA, en H9 y H1, al inhibir AKT durante 8 h (1,8 y 1,4 veces de inducción vs. vehículo I. IV 1 $\mu$ M; 3,3 y 2,7 I. VIII 10 $\mu$ M; 2 y 1,9 GSK690693 1 $\mu$ M). Por último, se observó la activación de caspasa-3 y el clivaje de PARP, ambos medidos por Western Blot, a partir de 4 h de tratamiento con los inhibidores mencionados. Finalmente, podemos concluir que la señalización mediada por AKT es anti-apoptótica y por ende relevante en la supervivencia celular de CMEh.

**606. (319) EL 17 $\beta$ -ESTRADIOL Y LA TESTOSTERONA INHIBEN LA APOPTOSIS EN MÚSCULO ESQUELÉTICO**

La Colla A.<sup>1</sup>; Pronsato L.<sup>2</sup>; Ronda A.<sup>3</sup>; Milanese L.<sup>4</sup>; Vasconsuelo A.<sup>5</sup>; Boland R.<sup>6</sup>  
*Laboratorio de Química Biológica, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, UNS<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
*alacolla@criba.edu.ar*

El 17 $\beta$ -estradiol (E2) y la Testosterona (T) son hormonas ligadas a funciones reproductivas. Sin embargo, prácticamente toda célula/tejido/órgano animal responde a estas hormonas. Así, el músculo esquelético es blanco de su acción. En el envejecimiento, se han observado patologías degenerativas de la masa muscular como la sarcopenia, asociadas a bajos niveles de T o E2. Si bien no se han esclarecido los mecanismos moleculares subyacentes a esta patología, la apoptosis estaría involucrada. Previamente, demostramos que el E2 y la T inhiben la apoptosis inducida por H2O2 en células musculares esqueléticas. Nuestro objetivo es investigar las bases moleculares de la regulación hormonal de la apoptosis en músculo esquelético. Utilizamos como modelo experimental la línea celular de músculo esquelético murino C2C12. Ensayos de competición, inmunocitoquímica, inmunoblotting y el uso del antagonista del receptor de andrógenos (AR), flutamida, evidenciaron que el AR media el efecto antiapoptótico de la T. Así, la T promueve variaciones en la expresión y localización subcelular de las proteínas Bax y 14-3-3, que son revertidas por la flutamida. Además demostramos una localización no clásica en microdominios y mitocondrias para

el AR. Asimismo, se comprobó por citometría de flujo con la sonda fluorescente JC-1 que la T y el E2 son capaces de revertir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo con calceína-AM observamos que el pretratamiento con E2 revierte la apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La inhibición, por los esteroides, de la translocación de Bax a mitocondria sugiere su participación en dicha apertura. Los datos presentados profundizan el conocimiento de las bases moleculares de la sarcopenia relacionada con estados de déficit de hormonas sexuales.

**607. (324) EFECTO MODULADOR DE CLOFIBRATOS Y WY14643, AGONISTAS PPAR $\alpha$ , SOBRE PARÁMETROS INFLAMATORIOS EN CÉLULAS CARDÍACAS INFECTADAS CON TRYPANOSOMA CRUZI**

Hovsepian E.<sup>1</sup>; Cevey A.<sup>2</sup>; Mirkin G.<sup>3</sup>; Penas F.<sup>4</sup>; Goren N.<sup>5</sup> *CEFIBRO-CONICET*<sup>1,2,4,5</sup>; Dto. Microbiología, Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, UBA<sup>3</sup> eughehovsepian@yahoo.com.ar

La infección por *Trypanosoma cruzi* (Tc) genera una respuesta inflamatoria en diversos órganos, entre ellos el corazón. Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) participan en el metabolismo lipídico y en la regulación de la inflamación. Nos propusimos analizar el papel de ligandos PPAR $\alpha$  en la modulación de la inflamación en células cardíacas infectadas con Tc. Cultivos primarios de miocardiocitos (MC) de ratón fueron infectados con la cepa aguda RA de Tc detectándose expresión de Oxido Nitrico (NO) Sintasa Inducible (NOS-2) y aumento en los niveles de NO respecto a MC control ( $\mu$ M: C 8+2; Tc 52+4). Para analizar el efecto de los agonistas PPAR $\alpha$  (Clofibrato(Clof), Wy14643(W)) sobre MC infectadas, las células fueron pre-tratadas con dosis crecientes de Clof y W e infectadas por 24h. Observamos mediante ensayos de Griess que 0,5mM de Clof y 100 $\mu$ M de W fueron las mínimas concentraciones capaces de inhibir la producción de NO inducida por la infección (Clof 59.0%+4.5 W 28.4%+3.0; p<0.05). Además, observamos mediante Wb que ambos agonistas inhiben significativamente la expresión de NOS-2 en MC infectados. Asimismo, determinamos mediante Wb en nuestro modelo de infección degradación citosólica del inhibidor I $\kappa$ B- $\alpha$  a los 30 min indicando activación de NF- $\kappa$ B. El pre-tratamiento con los agonistas PPAR $\alpha$ , Clof y W. revirtió dicho efecto detectando la presencia citosólica de I $\kappa$ B- $\alpha$ . Con el objeto de estudiar de que manera los agonistas PPAR $\alpha$  regulan la vía de NF- $\kappa$ B, analizamos los niveles del ARNm de I $\kappa$ B- $\alpha$  en los MC tratados con Clof y W. Mediante Q-RT-PCR determinamos que ambos regulan de manera positiva la expresión de dicho ARNm 4h post tratamiento (Clof 8 veces y W 5 veces respecto del control; p<0.05) Concluimos que los agonistas PPAR $\alpha$  serían potenciales moduladores inflamatorios en las infecciones por Tc. inhibiendo la expresión de NOS-2 y la activación de NF- $\kappa$ B en MC infectados.

**608. (410) T $\beta$ RII-B SE EXPRESA EN UN AMPLIO RANGO DE TIPOS CELULARES DE MODO ESPECÍFICO DE TIPO CELULAR Y SU MUTANTE, CARENTE DEL DOMINIO INTRACELULAR, NO FUNCIONA COMO DOMINANTE NEGATIVO.**

Carrea A.<sup>1</sup>; Rodríguez T.<sup>2</sup>; Saldías A.<sup>3</sup>; Irigo M.<sup>4</sup>; Gallo R.<sup>5</sup>; Perone M.<sup>6</sup>; Dewey R.<sup>7</sup>

Laboratorio de Terapia Génica y Células Madre, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Instituto Tecnológico de Chascomús<sup>1,2,7</sup>; Servicio de Cirugía Plástica Estética y Reparadora Hospital Italiano de La Plata<sup>3,4,5</sup>; Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (DFBMC FCEN-UBA), Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires (CONICET) - Instituto Partner de la Sociedad Max Planck<sup>6</sup>. acarrea@intech.gov.ar

TGF- $\beta$  es miembro de una familia de citoquinas que regulan una amplia variedad de procesos biológicos. La mayoría de las respuestas a TGF- $\beta$  están mediadas por los receptores T $\beta$ RI y

T $\beta$ RII, que presentan una pequeña región extracelular, un dominio simple transmembrana y una región citoplasmática con un dominio serina/treonina quinasa. T $\beta$ RII-B es una variante de splicing de T $\beta$ RII que resulta en la adición de 25 aa en la región N-terminal del receptor maduro. T $\beta$ RII-B se expresa en unos pocos tipos celulares, pero su presencia en otros tipos celulares no ha sido estudiada en detalle. En este trabajo, analizamos la expresión de T $\beta$ RII-B en líneas celulares y en células sanguíneas. Inicialmente, pudimos identificar por RT-PCR la presencia de ambas variantes en todos los tipos celulares estudiados. Además, analizamos por qPCR los niveles relativos de las variantes en distintas líneas celulares. En la mayoría, T $\beta$ RII-B se encuentra disminuida con respecto a T $\beta$ RII de 2 a 17 veces (p<0,01). También determinamos que la expresión de ambas variantes varía entre las líneas celulares estudiadas (p<0,01), demostrando expresión específica de tipo celular. Además, analizamos si la sobreexpresión de un mutante de T $\beta$ RII-B carente del dominio citoplasmático (T $\beta$ RII $\Delta$ c) podría funcionar como un mutante dominante negativo. Para ello, generamos un vector lentiviral conteniendo T $\beta$ RII-B $\Delta$ c, transdujimos células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y evaluamos por qPCR el efecto de la sobreexpresión de T $\beta$ RII-B $\Delta$ c sobre la expresión de T $\beta$ RII. Vimos que cuando se expresa T $\beta$ RII-B $\Delta$ c en presencia de TGF- $\beta$ 1, T $\beta$ RII aumenta su expresión sugiriendo que no actúa como un receptor dominante negativo. Este resultado pudimos confirmarlo mediante estudios de inhibición de la proliferación por TGF- $\beta$ 1. En resumen, pudimos establecer una distribución celular generalizada de T $\beta$ RII-B; con variaciones específicas de tipo celular y que T $\beta$ RII-B $\Delta$ c no es un mutante dominante negativo.

**609. (422) LA EXPRESIÓN DE R-SPONDIN 3 SE ASOCIA CON LOS NIVELES DE BETA-CATENINA EN CÉLULAS MAMARIAS.**

Tocci J.<sup>1</sup>; Goddio M.<sup>2</sup>; Rubinstein N.<sup>3</sup>; Tanos T.<sup>4</sup>; Briskin C.<sup>5</sup>; Kordon E.<sup>6</sup>

LEGMA, Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (CONICET), Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA<sup>1,2,3,6</sup>; Institut Suisse de Recherche Experimentale sur le Cancer<sup>4,5</sup>.

jtocci@qb.fcen.uba.ar

En el desarrollo embrionario y tumoral, R-spondin 3 (Rspo3) induce la activación de la vía canónica de Wnt que lleva a la traslocación de beta-catenina al núcleo, donde actúa como co-activador del factor de transcripción TCF-LEF. La activación de esta cascada se ha asociado a la pluripotencialidad de células progenitoras mamarias. Previamente, reportamos que el gen que codifica para Rspo3 es un sitio común de inserción para el virus MMTV en tumores mamarios murinos, los cuales muestran activación de la vía Wnt. Nuestro objetivo es determinar si Rspo3 es responsable de la activación de la vía canónica de Wnt en células mamarias. Encontramos por análisis de Western Blot o qRT-PCR que los niveles de Rspo3 son indetectables en células mamarias lumbales normales. Sin embargo, hallamos que Rspo3 se expresa en células mamarias mesenquimales y en líneas celulares tumorales humanas y murinas, las cuales muestran altos niveles totales de beta-catenina. Por otro lado, encontramos que las células mamarias murinas no-tumorigénicas HC11, que se caracterizan por presentar cierta pluripotencialidad, no ser puramente lumbales y ser capaces de generar matriz extracelular, expresan Rspo3. Llamativamente, los niveles de expresión de esta proteína y de beta-catenina son más bajos en HC11 en estado proliferativo y ambas aumentan cuando las células alcanzan la competencia, esto es al permanecer confluentes por varios días y generar matriz extracelular. Además, encontramos que, en esta última condición, las HC11 presentan niveles detectables de actividad del TCF-LEF, utilizando un plásmido reportero específico para este factor, indicando la traslocación y actividad transcripcional de beta-catenina. En conclusión, estos datos sugieren que Rspo3 podría estar involucrado en la activación de la vía Wnt en células mamarias, lo cual estaría asociado al desarrollo tumoral y al mantenimiento de la pluripotencialidad requerida para el crecimiento y funcionamiento de la glándula mamaria.

**610. (529) CARACTERIZACIÓN DE LA INTERFERENCIA DE LA SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES POR PARTE DEL RECEPTOR H1 A HISTAMINA.**

Zappia C.<sup>1</sup>; Granja Galeano G.<sup>2</sup>; Alonso N.<sup>3</sup>; Shayo C.<sup>4</sup>; Davio C.<sup>5</sup>; Fitzsimons C.<sup>6</sup>; Monczor F.<sup>7</sup>

*Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA<sup>1 2 5 7</sup>; Laboratorio de Patología y Farmacología Molecular, IBYME, CONICET<sup>3</sup>; Center for Neuroscience, Swammerdam Institute for Life Sciences, University of Amsterdam<sup>6</sup>; danielzappia@hotmail.com*

Diversos reportes indican la interacción entre la señalización de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y el receptor a glucocorticoides (GR). El objetivo del presente trabajo es estudiar la modulación de la actividad del GR por parte de ligandos del receptor H1 a histamina (rH1, un GPCR acoplado a Gq/11). Para ello se cotransfectaron células HEK293T con el rH1, el GR, y un sistema reportero TAT3-LUC. En dicho sistema el tratamiento con histamina 100  $\mu$ M inhibe significativamente la respuesta a dexametasona 100 nM (50 $\pm$ 5%). Este fenómeno es revertido tanto por antagonistas del rH1 (mepiramina y triprolidina) como por la sobreexpresión de GRK3 (una quinasa involucrada en la desensibilización del rH1). Evidencias recientes sugieren que, tanto miembros de las cascadas clásicas de señalización (PLC/PKC) como la disponibilidad de subunidades G $\beta$ / $\gamma$  de las proteínas G, regulan la actividad del GR. Nuestros resultados muestran que el inhibidor de PLC, U73122, es capaz de revertir el efecto de histamina sobre la activación del GR, mientras que el dominio de homología pleckstrin de GRK2, secuestrador de subunidades G $\beta$ / $\gamma$ , no lo revierte, sugiriendo la participación de los efectores clásicos de señalización. Por otra parte, dado que el GR transloca al núcleo para ejercer sus efectos transcripcionales, se cotransfectaron las células con el rH1 y una quimera fluorescente YFP-GR. En estudios de microscopía, se observa que dexametasona 100 nM promueve la translocación del GR al núcleo, tanto en ausencia como en presencia de histamina 100  $\mu$ M, indicando que si bien la histamina interfiere en la actividad del GR, no lo hace a este nivel. Nuestros resultados muestran una clara modulación de la actividad del GR por parte del rH1, lo cual resulta relevante considerando que los blancos terapéuticos con mayor cantidad de drogas aprobadas por la FDA son el rH1 y el GR, y además, existen numerosas situaciones en las que ligandos de ambos sistemas son administrados en forma conjunta.

## REPRODUCCIÓN 7

**611. (171) MECANISMOS MOLECULARES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN FUNCIONAL POR LACTATO DE LAS CÉLULAS GERMINALES.**

Galardo M.<sup>1</sup>; Riera M.<sup>2</sup>; Regueira M.<sup>3</sup>; Pellizzari E.<sup>4</sup>; Cigorraga S.<sup>5</sup>; Meroni S.<sup>6</sup>

*CEDIE-CONICET<sup>2 3 4 5 6</sup>; mngalardo@cedie.org.ar*

La espermatogénesis ocurre en un microambiente particular constituido por productos de secreción de las células de Sertoli. Entre ellos se destaca el lactato (L), sustrato energético de las células germinales (CG). Anteriormente, observamos que L incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y que activa PKB y p38-MAPK (p38) en CG. Se desconocen los mecanismos que utiliza L para incrementar la producción de ROS y los mecanismos utilizados por ROS para activar PKB y p38 en CG. El objetivo de este trabajo fue estudiar posibles mecanismos por los cuales L genera ROS en CG y como las mismas activan PKB y p38. Se utilizaron CG (espermatoцитos y espermátides) aisladas de testículos de rata de 31 días de edad. Las células fueron cultivadas por diferentes períodos de tiempo en ausencia o presencia de L 20mM conjuntamente con: oxamato (O) 20 $\mu$ M -inhibidor de LDH-, rotenona (R) 1 $\mu$ M -inhibidor del Complejo I NADH deshidrogenasa-, alopurinol (Al) 100 $\mu$ M -inhibidor de xantina oxidasa-, apocinina (Ap) 100 $\mu$ M -inhibidor de las NAD(P)H oxidasas. Se analizó por TBARS la presencia de malondialdehído (MDA). Observamos que el estímulo por

L a los 30 minutos es inhibido por O y por Ap. (B: 0.85 $\pm$ 0.09a, L: 1.26 $\pm$ 0.08b, L+O: 0.82 $\pm$ 0.09<sup>a</sup>, L+R: 1.31 $\pm$ 0.10b, L+Al: 1.20 $\pm$ 0.09b, L+Ap: 0.93 $\pm$ 0.08a, pmoles MDA/ $\mu$ g proteína, X $\pm$ DS, n=3, distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas P<0.05). Asimismo, por western blot se determinaron los niveles de PKB y p38 fosforiladas en presencia de wortmanina (W) 0.1 $\mu$ M -inhibidor de PI3K- y PP2 20 $\mu$ M -inhibidor de Src. Observamos que el estímulo por L de los niveles de P-PKB fue inhibido por W y el de P-p38 por PP2. Los resultados sugieren que L debe ser oxidado por la LDH para producir NADH el cual es utilizado por la NAD(P)H oxidasa para incrementar la producción de ROS. Dichas ROS activarían PKB y p38 a través de PI3K y Src respectivamente. (PIP 2008 N°806; PICT 2007 N°1004).

**612. (167) LA EXPOSICIÓN NEONATAL A BISFENOL A Y DIETILSTILBESTROL ALTERA EL DESARROLLO GLANDULAR UTERINO DE LA OVEJA.**

Varayoud J.<sup>1</sup>; Ramos J.<sup>2</sup>; Rivera O.<sup>3</sup>; Belmonte N.<sup>4</sup>; Muñoz-de-toro M.<sup>5</sup>; Luque E.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL<sup>1 2 5 6</sup>; Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora<sup>3 4</sup>; varayoud@fbc.unl.edu.ar*

Previamente demostramos que el bisfenol A (BPA) y el dietilstilbestrol (DES) alteran el desarrollo uterino afectando la reproducción de la rata hembra. Concretamente, demostramos que la exposición temprana a ambos xenoestrógenos disminuye el número de sitios de implantación en el útero. En el presente trabajo, estudiamos los efectos de la exposición neonatal a BPA o DES sobre el desarrollo uterino de la oveja, evaluando parámetros que caracterizan la adenogénesis (formación de glándulas uterinas). En esta especie el desarrollo glandular se completa durante la vida postnatal temprana y es clave para la funcionalidad uterina. Se utilizaron corderas cruce que fueron inyectadas (vía sc) desde el día postnatal 1 (DPN1) hasta el DPN14 con vehículo (control), BPA (50  $\mu$ g/kg/día) o DES (5  $\mu$ g/kg/día) y estudiadas el PND30. Biopsias de útero fueron incluidas en parafina o conservadas a -80°C. La evaluación morfológica de los úteros mostró alteraciones en el desarrollo glandular, específicamente un menor número de invaginaciones glandulares en las corderas expuestas a los xenoestrógenos (control: 9.4 $\pm$ 0.4, DES: 7.7 $\pm$ 0.4, BPA: 7.6 $\pm$ 0.4; p<0.05) y una mayor proliferación celular en las células epiteliales glandulares (control: 13.1 $\pm$ 0.61, DES: 16.0 $\pm$ 0.62, BPA: 16.9 $\pm$ 0.98; p<0.05). La proliferación fue cuantificada en cortes histológicos inmunomarcados para la proteína Ki-67. Mediante RT-PCR en tiempo real, se detectó que los animales expuestos a BPA o DES presentaron menor expresión del ARNm de un gen clave para el desarrollo glandular como es el Wnt7a (control: 1.0 $\pm$ 0.2, DES: 0.5 $\pm$ 0.1, BPA: 0.4 $\pm$ 0.1, p<0.05), sin cambios en la expresión de los genes Hoxa10 y Hoxa11. Concluimos que la exposición a BPA o DES alteró el normal desarrollo del útero de la oveja, induciendo modificaciones en la regulación del desarrollo y diferenciación de las glándulas endometriales. Estos efectos podrían traducirse en alteraciones en la capacidad funcional del útero y en la implantación del embrión.

**613. (209) EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL INDUCIDA POR VARIANTES GLICOSILADAS DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) EN LA LÍNEA CELULAR DE GRANULOSA HUMANA KGN.**

Loreti N.<sup>1</sup>; Fresno C.<sup>2</sup>; Barrera D.<sup>3</sup>; Ambao V.<sup>4</sup>; Fernandez E.<sup>5</sup>; Larrea F.<sup>6</sup>; Campo S.<sup>7</sup>

*CEDIE/CONICET Hospital de Niños R Gutierrez<sup>1 4 7</sup>; Facultad de Ingeniería, Universidad Católica de Córdoba<sup>2 5</sup>; Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México<sup>3 6</sup>; loretinazareth@hotmail.com*

Hemos demostrado que las glicofomas de FSH, resultantes de la adición diferencial de ácido siálico (sialilación: AC y BA) así como de la complejidad de la estructura de sus oligosacáridos

dos (NR y FR), inducen efectos específicos sobre la síntesis de esteroides e inhibinas en la línea celular KGN. En base a estas observaciones nos propusimos analizar en esta línea celular los efectos de las glicofomas de FSHrh sobre la expresión génica de enzimas esteroideogénicas (CYP19A1, 17 $\beta$ HSD8, STAR, CYP11A1, P450SCC, HSD3B2) y subunidades de inhibinas (INHA, INHBA), incluyendo el patrón de expresión génica global. Por isoelectroenfoque preparativo se obtuvieron análogos de carga acídicos (AC; pH<4) y básicos (BA; pH>5) y por cromatografía en Concanavalina A glicofomas con oligosacáridos con estructuras complejas (NR) e híbridas (FR). Las células se incubaron con las diferentes variantes de FSHrh por 24 h. Se obtuvo el ARN para el análisis de la expresión por PCR en tiempo real y por microarreglos de ADN, seguido del análisis de ontologías. Los resultados demostraron que el grado de sialilación de la FSHrh indujo la expresión diferencial de 17 $\beta$ HSD8 ( $p<0,01$ ) en cambio el grado de complejidad afectó la expresión de CYP19A1 ( $p<0,001$ ). Ambas características moleculares de la FSHrh afectaron la expresión de STAR, CYP11A1, P450SCC, HSD3B2, INHA ( $p<0,05$ ) y no alteraron la de INHBA. El análisis de ontologías permitió determinar que el grado de sialilación de la hormona modificó la expresión de genes asociados a la homeostasis celular, proteínas de unión a esteroides y diferenciación celular, entre otros. Por otra parte el grado de complejidad de los oligosacáridos afectó la expresión de genes asociados a muerte celular programada, metabolismo de esteroides y desarrollo folicular, entre otros. Estos resultados sugieren que el grado de glicosilación diferencial de la FSHrh está involucrado en los procesos que modulan la expresión de genes blanco de esta gonadotropina.

**614. (302) PARTICIPACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK P42/44 Y PI3K/AKT EN LA ACTIVACIÓN DE LAS ACCIONES BIOLÓGICAS INDUCIDAS POR EL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE GRANULOCITOS EN CÉLULAS TROFOBLÁSTICAS.**

Furmento V.<sup>1</sup>; Marino J.<sup>2</sup>; Roguin L.<sup>3</sup>  
 IQUIFIB, FFyB, UBA<sup>1 2 3</sup>.  
 alejandra\_furmento@hotmail.com

Previamente determinamos la presencia del receptor para el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) en una línea de células trofoblásticas humanas de primer trimestre (Swan 71). Asimismo, demostramos que el G-CSF produce un aumento de la actividad proteolítica de la metaloproteinasa-2 (MMP-2) y de la secreción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). El propósito de este trabajo fue investigar la participación de algunas vías de señalización en la inducción de estas acciones biológicas. En primer lugar, luego de incubar células durante distintos tiempos con 1  $\mu$ g/ml de G-CSF, estudiamos las cinéticas de fosforilación de la MAPK p42/44 y de Akt mediante ensayos de Western Blot (WB). Los niveles máximos de fosforilación de la MAPK p42/44 (1.86 $\pm$ 0.05 veces respecto al control,  $p<0,001$ ) y de Akt (1.7 $\pm$ 0.2,  $p<0,005$ ) se alcanzaron luego de 60 y 15 minutos de incubación, respectivamente. Como la vía PI3K/Akt está relacionada con la activación de NFkB, decidimos investigar la cinética de degradación de su inhibidor específico (IkB). Ensayos de WB revelaron que los niveles de IkB disminuyen un 52 $\pm$ 1% ( $p<0,001$ ) luego de 16 horas de incubación con 1  $\mu$ g/ml de G-CSF. Consecuentemente, sobre la base de estos resultados estamos evaluando la translocación nuclear de NFkB. Por otro lado, ensayos preliminares indicaron que luego de preincubar las células con 1  $\mu$ M de LY 294002 (inhibidor de PI3K/Akt), 0.5  $\mu$ M de BAY 11-7082 (inhibidor de la quinasa de IkB) y 1  $\mu$ M de PD 98059 (inhibidor de p42/44), los tres inhibidores bloquean los incrementos en la actividad de la MMP-2 (zimografía) y en los niveles de secreción de VEGF (WB) inducidos por el G-CSF. En su conjunto, los resultados obtenidos revelan que el G-CSF activa las vías MAPK p42/44 y PI3K/Akt en células trofoblásticas. Estas cascadas de transducción estarían mediando algunas acciones biológicas estimuladas por la citoquina, tales como el aumento en la actividad de la MMP-2 y en la secreción de VEGF.

**615. (507) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA REVERSION POR PROGESTERONA DE LA PERDIDA GESTACIONAL TEMPRANA INDUCIDA POR LIPOLISACÁRIDO.**

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>  
 CEFYBO, CONICET-Facultad de Medicina, UBA<sup>1 2 3 4 5</sup>  
 jaisemberg@yahoo.com.ar

La administración de lipopolisacárido (LPS, 1  $\mu$ g/g) a hembras BALB/c en el día 7 de gestación produce 100% de reabsorción embrionaria en 24 h. Antecedentes propios muestran una disminución en los niveles séricos de progesterona (P) a las 6 h de tratamiento y una reversión parcial de la reabsorción al suplementar con la hormona. En concordancia con lo que ocurre in vivo, observamos un incremento in vitro en los niveles uterinos de prostaglandina E (PGE) y óxido nítrico (NO), efecto que es revertido por la adición de P o LIF al cultivo. Nuestro objetivo fue profundizar los estudios sobre la participación de la P como factor fundamental del éxito gestacional. Utilizando nuestro modelo medimos los niveles de P en suero (RIA) hasta las 24 h post-inyección. Evaluamos en la interface materno-fetal la expresión (western blot) de los receptores de P (PR) y su rol en la regulación de los niveles de PGE y NO (RIA y Griess) en ensayos in vitro utilizando agonistas y antagonistas específicos. La producción uterina de NO se evaluó in vivo luego del tratamiento con LPS y P. La disminución inicial de la P sérica (10%) es mayor a las 12 y 24 h post-inyección de LPS (60%, control vs. LPS:  $p<0,001$ ). Se observó menor expresión de PRA (control vs. LPS:  $p<0,01$ ) en la decidua a las 6 h de tratamiento. La co-incubación con P y RU486 revirtió la modulación negativa ejercida por la hormona sobre los niveles de PGE (LPS+P vs. LPS+P+RU486:  $p<0,05$ ) inducidos por LPS. Una disminución en la producción inducida de NO sólo se observó al incubar con dexametasona ( $p<0,01$ : LPS vs. LPS+DEX). Los estudios in vivo corroboran lo observado in vitro: la P modula negativamente los niveles uterinos de NO ( $p<0,001$ : LPS vs. LPS+P) incrementados por la infección. Estos resultados refuerzan los previos sugiriendo una alteración funcional de la P como parte del mecanismo de la reabsorción y un papel modulador protector de la hormona ante la inflamación inducida por LPS.

**616. (519) LA PROGESTERONA REGULA VÍA NOTCH LA FUNCIONALIDAD DEL CUERPO LÚTEO DE LA PREÑEZ EN UN MODELO IN VITRO.**

Hernandez F.<sup>1</sup>; Bas D.<sup>2</sup>; Irueta G.<sup>3</sup>; Tesone M.<sup>4</sup>  
 IBYME-CONICET<sup>1 2 3 4</sup>, FCEyN- UBA<sup>4</sup>  
 fatimhernandez@gmail.com

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). Al unirse el ligando con el receptor, el complejo gamma secretasa libera el dominio intracelular (NICD) que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes involucrados en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. 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 que la administración de prostaglandina F2 $\alpha$  disminuye los niveles de los ARNm y la expresión proteica de los mismos. Además, el bloqueo intraovárico del sistema Notch disminuyó los niveles de Progesterona (P4) sérica y aumentó la expresión de proteínas pro apoptóticas en el CL. La hipótesis del presente trabajo es que P4 cumple un rol clave en la regulación de la vía de Notch en el CL de ratas preñadas. Se aislaron CL de ovario de ratas en el día 16 de gestación y se cultivaron en presencia de aminoglutetímida (inhibidor del citocromo P450scc 0.15 mM), DAPT (inhibidor de la gamma secretasa 20 $\mu$ M), ambos inhibidores juntos y de los inhibidores con el agregado de P4 (500ng/ml) durante 4 horas. Se evaluó la funcionalidad luteal midiendo los niveles de P4 en el medio por RIA, y por Western la expresión de miembros de la familia Notch. El tratamiento de los CL con cada inhibidor disminuyó significativamente los niveles de P4 ( $P<0,05$ , n= 5) en el medio de cultivo y este efecto se potenció en presencia de ambos.

Además estos inhibidores disminuyeron los niveles proteicos del fragmento intracelular de Notch1 (NICD) comparado al grupo control ( $P < 0.05$ ,  $n=5$ ). Sin embargo no se observaron diferencias significativas del NICD de Notch4. Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo regulatorio entre Progesterona y la vía de señalización de Notch involucrado en la funcionalidad del CL de la preñez.

**617. (626) EFECTOS DE LA INSULINA Y LA HIPOXIA SOBRE LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA DEL SINCICIOTROFOBLASTO HUMANO.**

Castro Parodi M.<sup>1</sup>; Reca A.<sup>2</sup>; Mariana J.<sup>3</sup>; Maskin B.<sup>4</sup>; Fernandez Tomé M.<sup>5</sup>; Damiano A.<sup>6</sup>

Laboratorio de Biología de la Reproducción, Cátedra de Biología Celular y Molecular, Depto. de Ciencias Biológicas, FFyB, UBA<sup>1 2 5 6</sup>; Hospital Nacional "Doctor Profesor Alejandro Posadas"<sup>3 4</sup>  
mcastroparodi@gmail.com

La preeclampsia (PE) se caracteriza por desarrollar un tejido trofoblástico relativamente hipóxico y las mujeres con PE presentan hipersinsulinemia. Previamente observamos un aumento de la expresión de AQP9 no funcional y demostramos que esta proteína no responde a la regulación negativa por insulina. Además vimos alteraciones en la membrana del sinciotrofoblasto (STh) de placentas con PE donde se inserta AQP9 y postulamos que podrían ser la causa de la falta de funcionalidad de esta proteína. El objetivo de este trabajo fue estudiar los posibles factores que alteran la composición lipídica de las membranas plasmáticas del STh, particularmente la hipoxia y la insulina. Para ello cultivamos explantos de placenta normal con diferentes concentraciones de insulina y en diferentes condiciones de oxigenación. Las vesículas de membrana Apicales (MVM) y basales (BM), fueron preparados por centrifugación diferencial. Los Lípidos fueron extraídos por el método de Bligh-Dyer y cuantificados por Fiske-Subarrow. El colesterol se determinó por un método enzimático. También se realizaron experimentos funcionales de incorporación de agua. El tratamiento con insulina no produjo cambios en la concentración total de fosfolípidos en el BM. Por el contrario, MVM mostraron un aumento en el contenido de lípidos totales hasta alcanzar un valor constante a 100  $\mu$ UI / ml de insulina, a expensas de un aumento en esfingomiélna y fosfatidilcolina ( $n=12$ ;  $p < 0,05$ ). En hipoxia/reoxigenación también los lípidos totales aumentaron con respecto al control a expensas de esfingomiélna y fosfatidilcolina ( $n=12$ ;  $p < 0,05$ ). Ningún tratamiento mostró cambios en el contenido de colesterol, en ambas vesículas. Sin embargo la incorporación de agua fue similar al control en todos los casos. Estos resultados sugieren que si bien la hiperinsulinemia y la hipoxia modifican las membranas lipídicas, otros factores afectarían la funcionalidad de la AQP9.

**618. (662) EXPRESION DE RECEPTORES HORMONALES EN OVARIO DE LAGOSTOMUS MAXIMUS Y SU CORRELACION CON PERFIL HORMONAL EN HEMBRAS GESTANTES.**

Fraunhofer N.<sup>1</sup>; Meilerman A.<sup>2</sup>; Willis M.<sup>3</sup>; Inserra P.<sup>4</sup>; Dorfman V.<sup>5</sup>; Vitullo A.<sup>6</sup>

Centro de Estudios Biomédicos, Biotecnológicos, Ambientales y de Diagnóstico –CEBBAD-Universidad Maimonides<sup>1 2 3 4 5 6</sup>

fraunhofer.nicolas@maimonides.edu

LAGOSTOMUS MAXIMUS (L. m.) presenta características reproductivas distintivas: periodo gestacional prolongado (155 días) con eventos ovulatorios y reabsorción embrionaria selectiva. El objetivo fue analizar los niveles hormonales y la expresión de los receptores ováricos de FSH, LH, Progesterona (P4), 17 $\beta$ Estradiol (E2) y 4 $\Delta$ Androstenediona ( $\Delta$ 4). Se analizaron los niveles hormonales séricos por quimioluminiscencia y la expresión de sus receptores en ovario por inmunohistoquímica en 90 hembras preñadas cuya edad gestacional se determinó por longitud cráneo-caudal fetal. FSH se mantuvo en un rango entre 1.27 $\pm$ 0.46mUI/ml y 0.61 $\pm$ 0.14mUI/ml del día 31 al 70, aumentando para alcanzar su máximo al día 101 (3.74 $\pm$ 0,70mUI/ml) y descendiendo hacia final

de la gestación. E2 mostró valores que variaron entre 22.11 $\pm$ 4.48 y 24.28 $\pm$ 3,21pg/ml entre el día 31 y 70, y un pico máximo al día 71 (81.25 $\pm$ 38.46pg/ml), descendiendo hacia fin de la gestación. P4 presentó un comportamiento bimodal con valores máximos al día 61 (35.12 $\pm$ 4.42ng/ml) y al día 111 (30.75 $\pm$ 9.66ng/ml).  $\Delta$ 4 presentó tres picos: uno al día 31 (0.85 $\pm$ 0.22ng/ml), el segundo al día 71 (0.55ng/ml) y el tercero al final de la gestación (1.22 $\pm$ 0.24ng/ml). En folículos primordiales se observó localización de receptor de E2 (RE) y receptor de andrógenos (RA) en núcleo de oocito, En folículos preantrales y antrales se localizó RE, RA y receptor de FSH en células de la granulosa y receptor de LH en células tecaes y en folículos antrales en proceso de luteinización. Los cuerpos lúteos fueron positivos para receptor de progesterona (RP), RE y RA. El tejido intersticial mostró marcación positiva para RE y el epitelio de superficie para RP, RE y RA. Estos resultados sugieren que durante la gestación L. m. presenta una activa dinámica ovárica, con reclutamiento y crecimiento folicular que dan sustento al proceso ovulatorio favorecido por altos niveles de FSH.

## HEMATOLOGÍA 2

**619. (122) EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE INTERFERÓN TIPO I EN EL LINAJE MEGACARIOCÍTICO.**

Negrotto S.<sup>1</sup>; Jaquenod De Giusti C.<sup>2</sup>; Laponni M.<sup>3</sup>; Etulain J.<sup>4</sup>; Rivadeneyra L.<sup>5</sup>; Pozner R.<sup>6</sup>; Gomez R.<sup>7</sup>; Schattner M.<sup>8</sup>  
Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina<sup>1 3 4 5 6 8</sup>; Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, UNLP<sup>2 7</sup>  
solenegrotto@hematologia.anm.edu.ar

Recientemente demostramos que la infección de células CD34+ con virus Junín inhibe la trombopoyesis a través de la vía de interferon tipo I (IFN $\alpha$  y  $\beta$ ), lo cual explicaría la trombocitopenia y la hemorragia observadas en la Fiebre Hemorrágica Argentina y otras enfermedades virales. Dado que el receptor de IFN tipo I (IFNAR) en el linaje megacariocítico no ha sido estudiado, en este trabajo analizamos la expresión y funcionalidad del mismo en la línea megacarioblástica MEG01, progenitores CD34+, megacariocitos (mcs) inmaduros (día 6 de cultivo), mcs maduros (día 12 y 18) y plaquetas (plaq) ( $n=6-7$ ). Nuestros resultados indican que el ARNm del IFNAR se expresa en todas las etapas de megacariopoyesis (RT-PCR). Ensayos de inmunofluorescencia y citometría de flujo revelaron que todos los tipos celulares, excepto las plaq, expresan IFNAR1 a nivel de proteína. Por Western blot, se detectó la presencia de IFNAR1 y 2 en todos los tipos celulares, aunque en plaq estaban muy levemente expresadas. Con respecto a IFNAR1, se observaron dos bandas de 130 y 90 kD en MEG01, y dos bandas de 130 y 60 kD en CD34+ y mcs. La estimulación de mcs con IFN $\beta$  (500 U/ml) aumentó la expresión de los genes antivirales MXA e IRF7 (12.3 $\pm$ 2.2 y 54.6 $\pm$ 9.5 veces del control respectivamente,  $p < 0.05$ , PCR cuantitativa) e indujo la fosforilación de STAT1/2 (Western blot), sugiriendo que el IFNAR es funcional en este linaje. Por otro lado, el PolyI:C (100  $\mu$ g/ml), un ARN sintético que simula una infección viral, estimuló la liberación de IFN $\beta$  de los mcs (71.5 $\pm$ 10.2 vs. control=2.2 $\pm$ 1.2 pg/ml,  $p < 0.05$ , ELISA). En conclusión, nuestros hallazgos revelan que los mcs expresan el IFNAR funcional y liberan IFN, demostrando no solo que la regulación de la megacario/trombopoyesis se debe a una interacción específica del IFN con su receptor sino también que los mcs podrían desempeñar un papel en la defensa antiviral por ser respondedores y además productores de IFN tipo I.

**620. (186) INHIBICIÓN DE POSIBLES REGULADORES DE LA PRODUCCIÓN PLAQUETARIA EN MEGACARIOCITOS (MK) PRIMARIOS MEDIANTE ARN DE INTERFERENCIA.**

Glembotsky A.<sup>1</sup>; Benedetti L.<sup>2</sup>; Marta R.<sup>3</sup>; Raslova H.<sup>4</sup>; Podhajcer O.<sup>5</sup>; Molinas F.<sup>6</sup>; Heller P.<sup>7</sup>  
Hematología Investigación, Instituto A. Lanari, IDIM-CONICET-UBA<sup>1 3 6 7</sup>; Laboratorio de Terapia Celular y Molecular, Fundación Instituto Leloir, UBA, CONICET<sup>2</sup>; INSERM, U1009. Institut Gustave Roussy, Villejuif, Francia<sup>4</sup>; Laboratorio de Terapia Celular y Molecular. Fundación Instituto Leloir. UBA. CONICET<sup>5</sup>  
anaglem@gmail.com

Previamente hallamos disminución del receptor c-mpl y de NF-E2 en pacientes con Trombocitopenia Hereditaria causada por mutación del factor de transcripción RUNX1, comprobándose que ambos son blancos del RUNX1 en el MK. Para identificar nuevos reguladores de la producción plaquetaria entre los genes regulados por RUNX1, se inhibió la expresión del factor de transcripción ID1, el cual se halló disminuido en estos pacientes y cuyo rol en la megacariocitopoyesis no ha sido investigado. Se realizó silenciamiento de ID1 en progenitores CD34+ de cordón umbilical mediante ARN de interferencia, evaluándose el efecto en la megacariocitopoyesis. Se efectuó transducción de CD34+ con lentivirus conteniendo shRNA-ID1 obtenidos en células 293FT, con eficiencia 26% en cultivos shRNA-ID1 y 21% en control. Una vez purificada esta población mediante sorting de CD34+GFP+ 48hs post-transducción (pureza 95% y 92%, respectivamente), se cultivó con TPO. Se halló inhibición de la diferenciación hacia MK (CD41+) de las CD34+ transducidas con shRNA-ID1 respecto al control, 64,1% vs 70,8% CD41+, y disminución de la maduración MK, evidenciada por % MK maduros, 29,2% vs 41,6% CD41+CD42b+, y por la fluorescencia (Gm) 42b, 41,3 vs 61,3. Contrario a lo observado en la megacariocitopoyesis, no se halló inhibición de la trombopoyesis, número de proplaquetas en cultivos shRNA-ID1 vs control, 16 vs 13. A pesar de las diferencias fenotípicas halladas en las células tratadas con shRNA-ID1, no se observó disminución del ARNm para ID1 mediante PCR en tiempo real,  $\Delta C_t$  ID1-GAPDH 4,96 vs 4,90, por lo cual se evaluará si la inhibición de la megacariocitopoyesis se debe a un efecto del shRNA en la traducción proteica de ID1. En conclusión, considerando la dificultad existente en la transfección de CD34+ y MK, esta metodología resultó adecuada para evaluar el efecto del silenciamiento génico en MK primarios. La inhibición observada en la megacariocitopoyesis sugeriría un posible rol de ID1 en este proceso.

#### 621. (382) EFECTO DE LA TROMBOPOYETINA EN LA APOPTOSIS DE PLAQUETAS

Contrufo G.<sup>1</sup>; Heller P.<sup>2</sup>; Costas M.<sup>3</sup>; Rubio F.<sup>4</sup>; García A.<sup>5</sup>; Molinas F.<sup>6</sup>; Marta R.<sup>7</sup>  
 Sección Hematología Investigación, UE IDIM-CONICET, Instituto Lanari, UBA<sup>1,2,6,7</sup>; Laboratorio de Biología Molecular y Apoptosis, UE IDIM-CONICET, Instituto Lanari, UBA<sup>3,4</sup>; Servicio de citometría de flujo, CEMIC<sup>5</sup>  
 gery.contrufo@gmail.com

Se ha descubierto que el fenómeno de apoptosis de las células ocurre también en las plaquetas. El objetivo del trabajo fue evaluar si la Trombopoyetina (Tpo), principal citoquina que protege de la muerte al linaje megacariocítico, tiene el mismo efecto sobre plaquetas. Para ello se evaluó por citometría de flujo la expresión de fosfatidilserina en la membrana plaquetaria (unión de Anexina V-FITC) (AV) y los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ , mediante el reactivo JC-1), así como los niveles de caspasa 3 y Bcl-xL por western-blot. Para la inducción de apoptosis las plaquetas normales se incubaron 2 min con ionóforo de calcio (A23187) o 1h con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ambos inductores produjeron aumento de unión de AV y variación del  $\Delta\Psi_m$  en forma concentración dependiente. Se evaluó si la incubación previa con Tpo tenía efecto sobre la apoptosis de plaquetas normales inducida por A23187 (0.5 $\mu$ M). Para ello, las plaquetas se incubaron con 100 ng/ml de Tpo durante 1-2 hs a 37°C y se evaluó la unión de AV y variación del  $\Delta\Psi_m$  tanto en condiciones basales como luego de la inducción de apoptosis. La Tpo tuvo un efecto protector ante el estímulo apoptótico (AV: p=0.0025;  $\Delta\Psi_m$ : p=0.0145; Rangos señalados de Wilcoxon, n=11). Se observó el mismo efecto en las plaquetas no estimuladas con A23187 aunque éste no alcanzó diferencias estadísticas. En las muestras estimuladas con A23187 se observó la disminución de las bandas de caspasa 3 y Bcl-xL. Sin embargo, la presencia de Tpo previa al estímulo apoptótico, en las condiciones ensayadas no modificó estos resultados. Se realizó una curva de concentración de Tpo entre 0 y 100 ng/ml que evidenció que el efecto protector es concentración dependiente (AV: p=0.0007,  $\Delta\Psi_m$ : p=0.0022; Correlación de Pearson, n=3). En conclusión, la Tpo fue

capaz de proteger a las plaquetas frente a un estímulo apoptótico. Resta investigar la participación de otras moléculas como posibles blancos de la acción antiapoptótica de la Tpo.

#### 622. (149) LAS GALECTINAS INDUCEN ANGIOGENESIS MEDIADA POR LA LIBERACIÓN DE MOLÉCULAS DERIVADAS DE PLAQUETAS.

Etulain J.<sup>1</sup>; Negrotto S.<sup>2</sup>; Romaniuk A.<sup>3</sup>; Croci D.<sup>4</sup>; Cattaneo V.<sup>5</sup>; Campetella O.<sup>6</sup>; Rabinovich G.<sup>7</sup>; Schattner M.<sup>8</sup>  
 Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina<sup>1,2,3,8</sup>; Lab. Inmunopatología, IBYME<sup>4,7</sup>; Instituto de Investigación Biotecnológica, Universidad Nacional de San Martín<sup>5,6</sup>  
 juliaetulain@hotmail.com

Recientemente hemos demostrado que las galectinas (Gals) 1 y 8 inducen activación plaquetaria. Considerando que estas lectinas también promueven la angiogénesis y que las plaquetas (PL) contribuyen a la formación de nuevos vasos por la liberación de mediadores angiogénicos, en este trabajo evaluamos la liberación de moléculas angiogénicas luego de la estimulación de PL con ambas Gals. Gal-1 y -8 gatillaron la liberación de VEGF de manera concentración dependiente (EC50: 0.5 $\pm$ 0.1 y 0.25 $\pm$ 0.05  $\mu$ M). Sin embargo, Gal-1 no fue capaz de inducir la secreción de endostatina (Tabla 1). La liberación de VEGF por Gal-8 fue parcialmente inhibida por inhibidores de PKC, p38 y Src (40-50% de inhibición, n=3), mientras que la secreción inducida por Gal-1 fue únicamente inhibida por el bloqueo de ERK1/2 (32%). Arrays de moléculas angiogénicas liberadas al sobrenadante de PL activadas mostraron que la Gal-8 liberó dos veces más EGF, ENA-78, IL-2 e IL-1 que Gal-1, mientras que Gal-1 liberó dos veces más MMP-1, MMP-9 and MPC-3. Los sobrenadantes de PL estimuladas por ambas Gals promovieron la proliferación de células endoteliales (MTT) y la formación de nuevos vasos (matrigel) de manera similar.

Sobrenadantes PL (*p<0.05, n=5)	Sin estimular	Gal-1 (5 $\mu$ M)	Gal-8 (1 $\mu$ M)
VEGF (ng/ml)	1.0 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.2*	7.0 $\pm$ 0.2*
Endostatina (ng/ml)	0.40 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.02	1.4 $\pm$ 0.4*
# cél endot. (x103)	30 $\pm$ 2	60 $\pm$ 3*	55 $\pm$ 4*
# Estruct. tubulares	0 $\pm$ 1	72 $\pm$ 5*	73 $\pm$ 5*

Si bien Gal-1 y -8 regulan selectivamente la liberación de moléculas pro- y antiangiogénicas, la activación plaquetaria con ambas lectinas promueve respuestas angiogénicas sugiriendo que la liberación de reguladores angiogénicos provenientes de PL representaría un mecanismo alternativo por el cual las Gals inducen angiogénesis.

#### 623. (564) ESTUDIO DE LOS MECANISMOS SUBYACENTES A LA INHIBICIÓN DE LA TROMBOPOYESIS INDUCIDA POR ANAGRELIDE.

Espasandin Y.<sup>1</sup>; Marta R.<sup>2</sup>; Valentino J.<sup>3</sup>; Glembotsky A.<sup>4</sup>; Molinas F.<sup>5</sup>; Heller P.<sup>6</sup>  
 Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA, IDIM-CONICET<sup>1,2,3,4,5,6</sup>  
 yesie14@hotmail.com

El anagrelide (ANA) disminuye las plaquetas en pacientes con Trombocitemia Esencial. Previamente hallamos que, además de su acción en la megacariocitopoyesis, inhibe la fase final de la producción plaquetaria o trombopoyesis. Sin embargo, esta disminución en la formación de proplaquetas (PP) observada con la dosis ensayada (500nM) se asoció a inhibición concomitante de la maduración y viabilidad del megacariocito (MK). Para discernir entre ambos efectos, se cultivaron MK a partir de CD34+ de cordón umbilical y se incubaron al día 13 con dosis decrecientes de ANA. El %MK formadores de PP en cultivos control fue 3.23 $\pm$ 1.9% y con ANA 500nM, 250nM, 100nM, 50nM, 25nM, 10nM, 5nM, 0.07 $\pm$ 0.1%, 0.07 $\pm$ 0.1%, 0.34 $\pm$ 0.1%, 0.54 $\pm$ 0.2%, 1.48 $\pm$ 0.2, 1.55 $\pm$ 0.1%, 2.22 $\pm$ 0.1%, comprobándose que dosis  $\leq$  100nM no modificaron la viabilidad ni maduración del MK. En experimentos posteriores con ANA 50nM (n=6) vs control, se halló disminución del %PP, 0.31 $\pm$ 0.2% vs 1.47 $\pm$ 1.1%, p=0.03, sin diferencias en la

pureza, %CD41: 70.8±2 vs 70.7±2, maduración, %CD41+42b+: 54.6±2 vs 57.2±2 y viabilidad del MK: 31,6±1% vs 33,7±2%. Para investigar el mecanismo subyacente, nos propusimos estudiar la expresión de factores involucrados en la trombopoyesis. Se incubaron MK, purificados por sortear (pureza 98%), con ANA 50nM y se estudió por PCR en tiempo real el factor de transcripción NF-E2 (isoforma f), cuya expresión relativa (2-DDCt) en MK tratados con ANA (vs control=1) fue 1.1. El estudio de otras moléculas con rol clave en la trombopoyesis, como Rab27b, tubulina, MAL/SRF y la cadena liviana de la miosina, en curso, contribuirá a establecer si el efecto sobre la trombopoyesis está relacionado con la modulación de la expresión génica de los factores que regulan este proceso. La acción directa del ANA sobre las proplaquetas sugiere que el bloqueo de la trombopoyesis contribuye a su efecto reductor de plaquetas, de relevancia en base al aumento de la trombopoyesis descrito recientemente en la Trombocitemia Esencial.

#### 624. (163) EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DEL RECEPTOR TIPO TOLL-3 (TLR3) EN EL LINAJE MEGACARIOCÍTICO.

Datri L.<sup>1</sup>; Etulain J.<sup>2</sup>; Rivadeneyra L.<sup>3</sup>; Laponi M.<sup>4</sup>; Schattner M.<sup>5</sup>

Laboratorio Trombosis I, Academia Nacional de Medicina<sup>1 2 3 4 5</sup>

lpdatri@hematologia.anm.edu.ar

Los receptores de reconocimiento de patógenos del tipo toll (TLRs) son ampliamente expresados en células inmunes. El TLR3 reconoce el ARNdc viral y gatilla la respuesta antiviral de la célula huésped. Aunque la expresión del TLR3 no ha sido descrita en el linaje megacariocítico, previamente demostramos que el tratamiento de células progenitoras hematopoyéticas humanas (CD34+) con Poly(I:C) (un ARNdc sintético) inhibe la generación de plaquetas (plq) en cultivos de megacariocitos (MCs) sugiriendo la presencia del TLR3 en el linaje. El objetivo de este trabajo fue determinar la expresión y caracterizar la funcionalidad del TLR3 en el linaje megacariocítico. Los resultados muestran que el TLR3 se expresa a nivel de mRNA (RT-PCR) y de proteína (western blot (WB) y citometría de flujo (CF) a lo largo de todo el linaje (CD34+, MCs y plq) al igual que en las líneas megacarioblásticas (Meg-01 y DAMI) (n= 3). La estimulación de MCs y plq con Poly(I:C) (100 µg/ml) gatilla la activación de Erk 1/2 y AKT pero no del factor de transcripción NF-κB (WB). La preincubación de las plq con Poly(I:C) no tiene un efecto per se pero potencia de manera significativa la agregación inducida por agonistas plaquetarios clásicos como colágeno (Cg), ADP y Trombina (T), (Cg:30, ADP:194 y T:20% de aumento vs. cada agonista solo), asociada a un incremento en la activación de la integrina αIIbβ3, determinada por la unión del fibrinógeno (C:2±1; T: 64±4.9; T+Poly(I:C):90±4.3\*, \*p<0.05 vs T, CF). El Poly(I:C) también potencia la liberación de ATP desde los gránulos densos de manera concentración dependiente (luminiscencia) (n=3 para cada agonista, p<0.05), sin embargo, no promueve la exposición de la P-selectina contenida en los gránulos alfa. Estos hallazgos indican que la expresión del TLR3 en el linaje megacariocítico es funcional y que su activación puede alterar no solo la trombopoyesis sino también la funcionalidad plaquetaria, adjudicándole un nuevo rol a los TLRs en células no inmunes.

#### 625. (723) ESTUDIO DE LA TROMBOPOYESIS EN TROMBOCITOPENIAS INMUNES

Lev P.<sup>1</sup>; Grodziński M.<sup>2</sup>; Goette N.<sup>3</sup>; Espasandín Y.<sup>4</sup>; Glembofsky A.<sup>5</sup>; Ferrari L.<sup>6</sup>; Heller P.<sup>7</sup>; Molinas F.<sup>8</sup>; Marta R.<sup>9</sup>  
Hematología Investigación, Instituto de Investigaciones Médicas Alfredo Lanari, UBA, IDIM-CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7 8 9</sup>  
rfmarta2005@gmail.com

Durante la trombopoyesis el megacariocito maduro (MK) emite prolongaciones citoplasmáticas llamadas proplaquetas (PP) desprendiéndose de sus extremos (tips) las preplaquetas y plaquetas. La apoptosis citoplasmática localizada parece tener un rol en este proceso. La etiología de la trombocitopenia inmune (TI) es principalmente la destrucción periférica de plaquetas y la inhibición de la megacariopoyesis debidas a autoanticuerpos (autoAc) y a disfunción

de la inmunidad celular. En este trabajo se evaluó la formación de PP y la apoptosis de MK ya que son aspectos no esclarecidos en esta patología. Progenitores CD34+ obtenidos de sangre periférica de 9 pacientes (P) y 5 normales (N) se cultivaron entre 14 a 16 días para obtener MK. En estas muestras se realizó inmunofluorescencia para detectar GPα2bβ3 (BD) y caspasa 3 activa (CST) y citometría de flujo para evaluar pureza (CD61) y madurez (CD42b) de MK. Se midió el diámetro plaquetario máximo (DPM) (software de análisis celular) en frotis de sangre periférica teñidos con May Grunwald Giemsa. La especificidad de los autoAc se determinó por ELISA en el plasma. La pureza de Mk obtenidos el día 13 de cultivo P 60,9%, N 65,4%; la madurez P 35,4%, N 40,3%, el porcentaje de núcleos picnóticos P 25,6%, N 30,2% (Hoesch), de MK positivos para caspasa 3 activa P 19,6%, N 7,5%; y de PP producidas P 1,16% y N 1,39%, fue semejante en P y N. En 4/6 pacientes se observó mayor frecuencia de engrosamiento de PP: P rango 5,9-56,5% (VN 0-23) (p=0.066 Test de Wilcoxon). El área de los tips fue semejante en P 18,7m<sup>2</sup> y N 18,3m<sup>2</sup>, mientras que el DPM estuvo aumentado en 3/6 P: rango 2,4-4,1m (VN=2,03-2,77). No se halló relación entre el área de los tips y el DPM plaquetario. Uno de 6 pacientes tuvo autoAc contra la GPα2bβ3 en plasma y eluido plaquetario y otro contra la GPIIb/IIIa en plasma. En conclusión, se constataron anomalías en la trombopoyesis en TI, mientras que la activación de caspasa 3 en MK de TI fue similar a los normales.

#### MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR II Y PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR II

#### 626. (216) LA FIBRONECTINA QUE INCLUYE EL EXÓN ED-I AUMENTA LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.

Losino N.<sup>1</sup>; Solari C.<sup>2</sup>; Luzzani C.<sup>3</sup>; Waisman A.<sup>4</sup>; Muro A.<sup>5</sup>; Barañao L.<sup>6</sup>; Guberman A.<sup>7</sup>

Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en el Crecimiento, Supervivencia y Diferenciación Celular, FCEN, UBA<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>; International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Trieste, Italy<sup>6</sup>  
losinon@hotmail.com

Las células madre embrionarias de ratón (mCME) pueden ser propagadas en el medio condicionado (MC) por la línea celular de granulosa bovina BGC, preservando sus propiedades básicas y aumentando su proliferación. La propiedad mitogénica de este medio fue reportada sobre células de granulosa, adjudicándole dicho efecto a la isoforma de fibronectina (FN) que incluye el exón ED-I (FN+ED-I). Nuestra hipótesis es que la FN+ED-I secretada por las BGC sería responsable del aumento en la proliferación de las CME. Nuestro objetivo es determinar si la FN+ED-I aumenta la proliferación en CME. Estudiamos este proceso mediante el ensayo de MTT y analizamos el tamaño de las colonias. Evaluamos el efecto de medios condicionados por distintas líneas de fibroblastos embrionarios murinos (MEF). Las CME propagadas en el MC de MEF +/+, que secretan solo FN+ED-I, proliferaron más que en MC MEF wt, que secreta ambas formas y éstas más que en MC de MEF -/-, que secretan solo FN que excluye ED-I. También evaluamos el efecto de un péptido de FN que incluye o no el exón ED-I, agregado al medio de proliferación (MP). El péptido FN+ED-I aumentó la tasa de proliferación de manera dosis dependiente. Al analizar si el MC de BGC afecta la inclusión de ED-I por las CME, para estudiar si hay un efecto sobre la FN endógena, comparamos la expresión de estas dos formas en CME cultivadas en MC y MP. Por RT-PCR detectamos que las CME al igual que la línea BGC, expresan ambas isoformas. Sin embargo, el MC no afectó la inclusión de ED-I por las CME. En síntesis, demostramos que la FN+ED-I aumenta la proliferación en CME. Planificamos silenciar la expresión de FN+ED-I en las BGC para determinar su contribución en este efecto. Resultados preliminares indican que el MC de BGC no afecta la proliferación de células madre pluripotentes inducidas, evidenciando un mecanismo diferente. La comprensión de estos procesos puede contribuir a la futura aplicación terapéutica de las células madre.

**627. (293) ESTUDIO DEL ROL DE LAS ENZIMAS MODIFICADORAS DE LA CROMATINA MYST2 Y PRMT8 EN CELULAS MADRE EMBRIONARIAS.**

Luzzani C.<sup>1</sup>; Waisman A.<sup>2</sup>; Solari C.<sup>3</sup>; Losino N.<sup>4</sup>; Barañao L.<sup>5</sup>; Miriuka S.<sup>6</sup>; Guberman A.<sup>7</sup>

*Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en el Crecimiento, Supervivencia y Diferenciación Celular, Departamento de Química Biológica, FCEN<sup>1 2 3 4 5 7</sup>; Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, Fleni<sup>6</sup> carlosluzzani@qb.fcen.uba.ar*

Las Células Madre Embrionarias (CME) poseen la capacidad de proliferar indefinidamente in vitro y 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. Nuestra hipótesis es que ciertos factores de transcripción específicos de CME, como Oct3/4, SOX2 y Nanog, regulan la expresión de genes que codifican para enzimas modificadoras de la cromatina y que éstas, a su vez, podrían modular la expresión de los primeros. Anteriormente, estudiamos la regulación transcripcional de ciertas enzimas durante la diferenciación de células madre pluripotentes. En este trabajo, estudiamos la relevancia de dos de ellas, Myst2 y Prmt8, sobre el mantenimiento de la pluripotencia y la diferenciación de CME. En primer lugar, realizamos un estudio in silico de sus promotores en búsqueda de posibles sitios de unión de Oct3/4, SOX2 y Nanog y diseñamos primers que nos permitirán confirmar, mediante el ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina, su interacción con los factores de transcripción de CME. Luego, diseñamos una serie de shRNAs (short hairpin RNAs) específicos para cada uno de estos genes con el objetivo de silenciarlos y los clonamos en un vector lentiviral que posee los elementos necesarios para su correcta expresión. Establecimos líneas de CME que expresan establemente estos shRNAs y determinamos por RT-qPCR la disminución de los niveles de mRNA correspondientes. Nos encontramos analizando los marcadores de pluripotencia de estas líneas celulares y estudiando el rol que estas enzimas pueden tener en los procesos de diferenciación, analizando la morfología, el tamaño, la frecuencia de formación y la expresión de marcadores en los cuerpos embrioides derivados de las mismas.

**628. (469) EFECTO DE LA INYECCIÓN INTRAMIOCÁRDICA DE CÉLULAS MESENCIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE EN UN MODELO OVINO DE INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO. RESULTADOS PRELIMINARES.**

Locatelli P.<sup>1</sup>; De Lorenzi A.<sup>2</sup>; Cerdá M.<sup>3</sup>; Olea F.<sup>4</sup>; Hnatiuk A.<sup>5</sup>; Ramirez R.<sup>6</sup>; Sepúlveda D.<sup>7</sup>; Trejo L.<sup>8</sup>; Bercovich A.<sup>9</sup>; Laguens R.<sup>10</sup>; Crottogini A.<sup>11</sup>  
*Universidad Favaloro<sup>1 4 5 6 7 11</sup>; Fundación Favaloro<sup>2 3 8 10</sup>; Bio Sidus<sup>9</sup> plocatelli@favaloro.edu.ar*

Introducción: Hay evidencias de que las células mesenquimales de médula ósea (MSCs) inducen efectos beneficiosos en modelos de infarto agudo de miocardio (IAM). Por otro lado, hemos demostrado que la inyección intramiocárdica de un plásmido que contiene el gen de VEGF165 (pVEGF) en ovejas con IAM disminuye el tamaño del área necrótica y mejora la función ventricular. Por lo tanto, la modificación genética de las MSCs para que sobreexpresen VEGF resultaría en un mayor efecto terapéutico. Objetivo: Nuestro objetivo fue evaluar el efecto de las MSCs transfectadas con pVEGF (MSCs-pVEGF) comparado a las terapias individuales sobre el tamaño de IAM y la función ventricular izquierda (VI) en ovejas con ligadura de la 2ª y 3ª ramas diagonales de la arteria descendente anterior. Métodos: Una semana después de inducido el IAM se inyectó intramiocárdicamente 2x10<sup>7</sup> MSCs-pVEGF (n=5), 2x10<sup>7</sup> MSCs (n=5), 3,8 mg de pVEGF165 (n=5) o placebo (PBS, n=5) en 10 alícuotas iguales. Cuatro días post-IAM y 30 días post-tratamiento se midió función VI por ecocardiografía y tamaño de IAM por resonancia magnética nuclear. La función VI también se evaluó en situación basal previo al IAM. Resultados: La fracción de eyección VI cayó significativamente a los 4 días post-IAM en todos los grupos, pero sólo se recuperó a los 30 días en el grupo

MSC-pVEGF (Basal: 52±10; post-IAM: 31±14%; final: 51±12%, p<0,05 X±DS, ANOVA-Bonferroni). El tamaño de IAM (n=4 por grupo) mostró una tendencia a disminuir en el grupo MSC-pVEGF (de 14±6% a 9±4%), pero estas diferencias no fueron significativas (p=NS). Conclusión: En ovejas con IAM, la inyección intramiocárdica de MSCs modificadas para sobreexpresar VEGF mejora la función ventricular más que las MSCs no modificadas o la inyección directa del plásmido. La mejoría parecería estar asociada a una reducción del 28% del tamaño del IAM, a pesar de que, en este reducido grupo preliminar, esa diferencia no alcanzó significación estadística.

**629. (392) EFECTOS DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MAGEB2 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.**

Ladelfa M.<sup>1</sup>; Peche L.<sup>2</sup>; Sanchez I.<sup>3</sup>; Schnieder C.<sup>4</sup>; Dusetti N.<sup>5</sup>; Monte M.<sup>6</sup>

*Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Dpto Química Biológica, FCEN-UBA<sup>1 6</sup>; Laboratorio Nazionale Cib, Ara Science Park, Trieste, Italia<sup>2 4</sup>; Laboratorio de Fisiología de Proteínas, Dpto de Química Biológica, FCEN-UBA<sup>3</sup>; Laboratorio de Stress Celular, U624-Inserm, Marsella, Francia<sup>5</sup> fladelfa@qb.fcen.uba.ar*

La subfamilia de genes MAGE-I está compuesta por los grupos A, B y C, que presentan expresión específica tumoral y alta homología de secuencia, lo cual presupone que sus funciones puedan ser redundantes. Debido a esto, recién en los últimos años han comenzado a estudiarse las funciones de las proteínas MAGE. Nosotros mostramos que MageA2, mediante su unión a p53 y deacetasas de histonas (HDACs), reprime la respuesta pro-apoptótica de p53 (Monte et al, 2006). Recientemente, observamos que el complejo MageA2/HDAC3 interfiere también sobre la senescencia inducida por el eje PMLIV/p53 (Peche et al, enviado). En este trabajo reportamos los efectos de MageB2 sobre la proliferación celular. Nuestros resultados indican que la expresión de MageB2 aumenta la proporción de células en la fase S del ciclo celular y, bajo condiciones de inhibición de la vía de mTOR, induce un aumento de fosfo-S6. Esto sugirió que MageB2 tendría funciones pro-proliferativas. Debido a ello, estudiamos el efecto de su expresión en la modulación de la vía pRB/E2F. Observamos que MageB2 revierte la inhibición que ejerce pRB sobre E2F1 y además, induce fuertemente la actividad transcripcional de E2F1. MageB2, a diferencia de otros MAGE, es una proteína nucleolar. Hemos observado que su expresión relocaliza una fracción de pRB a los nucléolos, pudiendo esto contribuir al aumento en la actividad transcripcional de E2F. En este sentido, la proteína MageB2ΔNoLS, que carece de su secuencia de localización nucleolar, pierde en su mayoría la capacidad de aumentar la actividad transcripcional de E2F1. Además, observamos que MageB2 interacciona con HDAC1, cuya unión a pRB y rol en la inhibición de E2F ha sido previamente reportada (Puri et al, 2001). En conjunto, estos datos indican que la expresión de MageB2 podría conferir a las células ventajas pro-proliferativas. Comprender su mecanismo de acción permitirá diseñar estrategias para inhibir el potencial proliferativo de las proteínas MAGE-I.

**630. (416) LA FALTA DE AMINOÁCIDOS EN EL MEDIO DE CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATÓN, INDUCE LA SELECCIÓN DE CÉLULAS PRENEOPLÁSICAS.**

Chisari A.<sup>1</sup>; Sancho P.<sup>2</sup>; Caja L.<sup>3</sup>; Bertran E.<sup>4</sup>; Fabregat I.<sup>5</sup>  
*Instituto de Investigaciones Biológicas, Univ. Nac. de Mar del Plata, Biological Clues of the Invasive and Metastatic Phenotype Group, Bellvitge Biomedical Research, Barcelona, Spain<sup>1</sup>; Biological Clues of the Invasive and Metastatic Phenotype Group, Bellvitge Biomedical Research, Barcelona, Spain<sup>2 3 4 5</sup> achisari@mdp.edu.ar*

La malnutrición proteica es un cuadro clínico causado por un desequilibrio entre la ingesta de proteínas y las necesidades metabólicas básicas. La ingesta de dietas carentes de proteínas, alternadas con realimentación normal (20%) aumentó la incidencia de lesiones tempranas en carcinogénesis química en hígado de rata. El objetivo de este trabajo es estudiar la muerte,



proliferación y supervivencia de hepatocitos de ratón, en cultivo, incubados con medio carente de aminoácidos (Aa); y su relación con la generación de células preneoplásicas en el hígado. La incubación en medio sin Aa durante 12, 24 y 48 h significó una disminución de la viabilidad celular (incorporación de H3-timidina) que se correlacionó con una mayor apoptosis (evaluando actividad de caspasa-3). Se seleccionó una subpoblación de células capaz de sobrevivir a la falta de Aa (Sel) que resultó más proliferativa, más resistente a la muerte inducida por TGF- $\beta$  y presentó menos apoptosis comparada con la línea parental (Par). Se evaluó mediante western-blot los niveles de proteínas que participan en las vías de señalización de resistencia a apoptosis: Akt, ERKs, mTOR/GSK-3 y EGFR. En las células Sel los niveles de fosfo-AKT y fosfo-ERK se incrementaron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) en comparación con la Par. Esto a su vez se correlacionó con un aumento ( $p \leq 0,05$ ) de la activación de la vía EGFR/SRC en las Sel ( $p \leq 0,05$ ). Además, las células Sel mostraron mayores niveles ( $p \leq 0,05$ ) de fosfo-p70S6 y fosfo-GSK (sustratos downstream de mTOR=mammalian Target Of Rapamycin.), en comparación con las Par. Los resultados presentados indican que es posible aislar una subpoblación de hepatocitos capaz de sobrevivir en ausencia de Aa y que muestran una mayor capacidad para proliferar y sobrevivir escapando de la muerte inducida por la privación aminoácídica de manera análoga a lo que se observa en células preneoplásicas.

**631. (417) SOBRE-EXPRESIÓN DE CICLO-OXIGENASA-2 (COX-2) INHIBE LA APOPTOSIS HEPÁTICA INDUCIDA POR HIPERGLICEMIA.**

Ingaramo P.<sup>1</sup>; Francés D.<sup>2</sup>; Mayoral Moñibas R.<sup>3</sup>; Martín-sanz P.<sup>4</sup>; Carnovale C.<sup>5</sup>

*Instituto de Fisiología Experimental, IFISE-CONICET<sup>1 2 5</sup>; Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", Madrid, España<sup>3 4</sup>*  
paolaingar@gmail.com

Las COXs catalizan el primer paso en la biosíntesis de las prostaglandinas y tromboxanos. Un aumento de la isoforma COX-2 está asociado a inflamación y a carcinogénesis. Está demostrado que la expresión constitutiva de COX-2 protege al hepatocito de estímulos pro-apoptóticos. Además, se ha observado un aumento de apoptosis hepática en diabetes. Analizamos en hígado de ratones diabéticos las posibles vías de acción de COX-2 como un mecanismo de regulación de apoptosis. Ratones de la cepa C57BL/6JXDBA Wild Type (Wt) y Transgénicos (Tg) en COX-2 fueron separados en: Control (Buffer Citrato) y DBT (Estreptozotocina, 200mg/kg pc) obteniéndose los grupos experimentales (n=4 c/u): Control Wt (CWt), DBT Wt (DWt), Control Tg (CTg), DBT Tg (DTg). Siete días post-inyección, en hígado, se determinó el nivel de activación de la vía de MAPKs por Western Blot, encontrándose un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en DWt vs CWt de P-JNK (300%) y P-p38 (75%), en correspondencia con un Índice Apoptótico (IA) aumentado (130%). DTg mostró una menor activación de P-JNK (210%) y P-p38 (40%) logrando un menor IA (30%) vs CWt. Para analizar la contribución del aumento de glucosa sobre la apoptosis y el rol de COX-2 se utilizó la línea celular CCL-13 [Chang liver (CHL)]. Se transfectaron hepatocitos para expresar establemente COX-2 unida a GFP (CHL-C) o GFP (CHL-V). Se cultivaron 72 horas en: 5 mM de glucosa (simil normoglicemia) y 25 mM (simil hiperglicemia). A 25mM en células CHL-V existió un aumento de activación de JNK y p38 y un aumento de apoptosis (75%; por citometría de flujo) vs las expuestas a 5mM, las células CHL-C mostraron una menor activación emulando lo observado in vivo, evitando el incremento de apoptosis. Los niveles de Mcl-1 y XIAP, proteínas anti-apoptóticas, fueron superiores en CHL-C en comparación a CHL-V en ambas concentraciones de glucosa. Lo expuesto sugiere un papel protector de COX-2 a la apoptosis inducida por hiperglicemia tanto in vitro como in vivo.

**632. (568) LA INMUNOFILINA CYP A SUFRE TRÁNSITO NÚCLEO-CITOPLASMÁTICO Y PRESENTA PROPIEDADES ANTIAPOPTÓTICAS.**

Lagadari M.<sup>1</sup>; Valeiras B.<sup>2</sup>; Daneri Becerra C.<sup>3</sup>; Galigniana M.<sup>4</sup>  
IBYME - CONICET<sup>1 2 3 4</sup>  
mlag2@hotmail.com

Las inmunofilinas (IMMs) comprenden una familia de proteínas intracelulares caracterizadas por poseer un dominio PPLasa. Se clasifican según la droga inmunosupresora que unan: las ciclofilinas (CyPs) unen ciclosporina A (CsA) y las FKBP5 unen FK506. El dominio PPLasa posee actividad de peptidil-prolil-cis/transisomerasa, la que permite el cambio de orientación cis $\leftrightarrow$ trans del aminoácido que precede a una prolina, lo que afecta la conformación y función de las proteínas asociadas. En trabajos previos demostramos que FKBP51 es un factor mitocondrial que sufre tránsito núcleo-mitocondrial. Su sobreexpresión incrementa la supervivencia celular frente a diversos tipos de estímulos apoptóticos y su knock-down favorece la muerte por apoptosis. Diversos tipos de células tumorales muestran una elevada expresión de FKBP51, la que se concentra constitutivamente en el núcleo. Investigando a otras IMMs que podrían tener propiedades semejantes, encontramos que la IMM de 17-kDa, CyPA, también localiza en mitocondrias. CyPA fue la primera IMM identificada como receptor intracelular de CsA. Recientemente se la ha involucrado en numerosos procesos importantes como la activación de células T, patogénesis de enfermedades vasculares, artritis reumatoidea y tumorigénesis, y se la ha descrito sobreexpresada en células tumorales, pero aún se desconoce su rol biológico. En nuestro laboratorio hemos visto que CyPA se asocia a proteínas del citoesqueleto y al complejo motor dineína/dinactina de la misma manera que sus congéneres de alto PM. En este trabajo mostramos que CyPA se localiza en las mitocondrias, y que en células estimuladas con agentes apoptóticos como peróxido y estaurosporina, CyPA se acumula en el núcleo de manera similar a la descripta para FKBP51, aunque con una cinética más lenta. Su sobreexpresión incrementó la supervivencia celular frente a estímulos deletéreos, un efecto que mostró ser independiente de la actividad de PPLasa. Postulamos que CyPA es un nuevo factor antiapoptótico.

**633. (667) EXPRESIÓN DE PEQUEÑOS ARNS TRANSCRIPTOS A PARTIR DEL DNA SATELITAL DURANTE EL CICLO CELULAR.**

Susperreguy S.<sup>1</sup>; Piwien-pilipuk G.<sup>2</sup>  
IBYME - CONICET<sup>1 2</sup>  
susperreguy@fcq.unc.edu.ar

El ciclo celular consiste en una serie de eventos precisamente coordinados que permiten una proliferación celular normal. Los principales componentes de la maquinaria del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estas CDK son reguladas positivamente por las ciclinas y negativamente por las proteínas celulares denominadas inhibidores de las CDK (CKI). En cambio, las células tumorales presentan una desregulación del ciclo celular que les permite mantenerse en estado proliferativo. El conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan este balance entre los estados proliferativo y quiescente, es esencial para entender el modo por el cual una célula normal se puede convertir en tumoral, conocimiento básico que aporta al desarrollo de nuevas estrategias antitumorales. Debido a que observamos cambios en el perfil de expresión de pequeños RNAs transcritos a partir de ADN satelital durante diversos procesos de diferenciación celular que se acompañan de un cese de la proliferación celular, decidimos investigar si existen cambios en los niveles de expresión de dichos RNAs durante el ciclo celular. Para ello analizamos el perfil de expresión de RNAs satelitales en células 3T3-L1, C2C12, Caco-2, y Cos-7 tanto en estado proliferativo como cuando alcanzan quiescencia, observando una disminución en la expresión de estos pequeños RNAs cuando la célula entra en quiescencia por contacto. Interesantemente, las células Caco-2, que no alcanzan confluencia en la placa de cultivo y por lo tanto no entran en quiescencia, no mostraron disminución en el nivel de expresión de los RNA satelitales. Estamos investigando la posible relación funcional entre los RNAs satelitales y las proteínas del

ciclo celular que inhiben a las CDK (CKI) y realizando estudios comparativos del nivel de expresión de RNA satelital entre células normales y tumorales para evaluar la posible implicancia de esos RNAs satelitales en el desarrollo del tumor.

## INMUNOLOGÍA 4 E INFECTOLOGÍA 2

### 634. (461) INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE METÁSTASIS EN UN MODELO TUMORAL MAMARIO MURINO POR INMUNIZACIÓN CON CÉLULAS TUMORALES QUE TIENEN BLOQUEADA LA ACTIVACIÓN DE STAT3.

Tkach M.<sup>1</sup>; Rivas M.<sup>2</sup>; Díaz Flaqué M.<sup>3</sup>; Proietti C.<sup>4</sup>; Izzo F.<sup>5</sup>; Romero L.<sup>6</sup>; Maronna E.<sup>7</sup>; Charreau E.<sup>8</sup>; Elizalde P.<sup>9</sup>; Schillaci R.<sup>10</sup>

IBYME<sup>1 2 3 4 5 6 8 9 10</sup>; Servicio de Patología, Sanatorio Mater Dei<sup>7</sup> mercedes.tkach@gmail.com

Previamente demostramos que la inmunización profiláctica con las células tumorales mamarias progéstágeno-dependiente, C4HD, transfectadas con un vector dominante negativo (DN) de Stat3 e irradiadas, induce una respuesta inmune mediada por linfocitos CD4+ y células NK que inhibe el crecimiento del tumor parental. En este trabajo nos propusimos extender nuestros resultados a un modelo tumoral mamario metastásico que posee Stat3 constitutivamente activa, las células 4T1. Para ello, inyectamos s.c. ratones BALB/c 6, 4 y 2 semanas antes del desafío tumoral con 2x10<sup>6</sup> de células 4T1 transfectadas in vitro con el vector DNStat3, Stat3Y705F, (4T1-DNStat3) e irradiadas. Como control se inmunizaron animales con células 4T1 transfectadas con un vector vacío (4T1-pcDNA 3.1). Observamos una inhibición del crecimiento tumoral del 81% en ratones inmunizados con células 4T1-DNStat3 con respecto al grupo control (p<0,001, n=8) y una disminución del número de colonias metastásicas en pulmón (p<0,05). Al estudiar las poblaciones infiltrantes del tumor, observamos un aumento en el porcentaje de células NK (CD3-DX5+) y una disminución de linfocitos T regulatorios (CD4+CD25+FOXP3+) en ratones inmunizados con 4T1-DNStat3 (p<0,05). Evaluamos la efectividad de esta inmunoterapia en una administración terapéutica. Desafiamos a los animales con 1x10<sup>4</sup> células 4T1 (día 0) y luego los inmunizamos con células 4T1-DNStat3 o 4T1-pcDNA3.1 (días 5, 12 y 19). Observamos una inhibición del 37,5% en el crecimiento tumoral en ratones inmunizados con células 4T1-DNStat3 con respecto al grupo 4T1-pcDNA3.1 (p<0,05) y una disminución en el número de colonias metastásicas en pulmón. En conclusión, nuestros resultados sugieren que el crecimiento de tumores mamarios que tienen activada Stat3 puede ser inhibido mediante la inmunización con células tumorales cuya Stat3 fue bloqueada induciendo una respuesta inmune anti-tumoral sobre el tumor primario y sobre el establecimiento de metástasis en pulmón.

### 635. (473) ESTUDIO FENOTÍPICO Y FUNCIONAL DE CÉLULAS NATURAL KILLER EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL.

Rocca Y.<sup>1</sup>; Roberti M.<sup>2</sup>; Arriaga J.<sup>3</sup>; Amat M.<sup>4</sup>; Bruno L.<sup>5</sup>; Pampena B.<sup>6</sup>; Bravo A.<sup>7</sup>; Sánchez Loria F.<sup>8</sup>; Pairola A.<sup>9</sup>; Huertas E.<sup>10</sup>; Bianchini M.<sup>11</sup>; Mordoh J.<sup>12</sup>; Levy E.<sup>13</sup>

Centro de Investigaciones Oncológicas - Fundación Cáncer<sup>1 2 3 6 11 12 13</sup>; Instituto Especializado Alexander Fleming<sup>5 8 9 10</sup>; Hospital Higa Eva Perón<sup>7</sup> yamirocca@gmail.com

El reconocimiento de las células blanco por parte de los Natural Killers (NK) está modulado por un balance entre señales activadoras e inhibitorias desencadenadas por la unión de receptores de superficie a sus respectivos ligandos. Los NK activan la inmunidad adaptativa y son potenciales efectores de procedimientos de inmunoterapia. Con el objetivo de caracterizar fenotípicamente los NK, se comparó mediante citometría de flujo el porcentaje de expresión de receptores activadores (RA) e inhibitorios (RI), de muestras de sangre periférica (SP) de donantes sanos (DS) y pacientes (Pts) con cáncer colorrectal (CCR). Se observó una disminución signi-

ficativa (p<0.05) de los RA NKp30, DNAM-1 y del KIR CD158a/h en SP de Pts. Asimismo se vio que los NK infiltrantes a tumor (T) presentaron una expresión disminuida (p<0.05) de los RA CD16, NKp46, NKG2D, de los KIRs CD158a, CD158b y de CD94. Los NK de mucosa normal presentaron un perfil intermedio entre NK tumorales y de SP. Determinamos que las células tumorales causan este fenotipo particular mediante cocultivos de NK de DS con líneas tumorales de colon y se evaluaron el efecto de los medios condicionados y el agregado de TGFβ. Con el objetivo de caracterizar funcionalmente a los NK, se realizaron ensayos de actividad lítica en presencia o ausencia de Cetuximab a partir de muestras de SP y, se midió la producción intracelular de IFNγ y la expresión en membrana de CD107a. En el primer caso no se observaron diferencias significativas entre Pts y DS debido a que éstos no presentaron variabilidad en la expresión de CD16, responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo. La producción de IFNγ y CD107a en membrana se vio disminuida en Pts, no obstante dicha tendencia fue revertida por IL-2. Así, el microambiente tumoral modula la acción de los NK mediante la desregulación de la expresión de RA y RI, también observada en SP, a favor de una menor funcionalidad reversible con IL-2 y Cetuximab.

### 636. (511) PERFIL TH1/TH2 EN LAS FASES DE EQUILIBRIO, ESCAPE Y ELIMINACIÓN EN UN MODELO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA MURINO.

Pagura L.<sup>1</sup>; Cáceres J.<sup>2</sup>; Cardinale A.<sup>3</sup>; Rico M.<sup>4</sup>; Lattante R.<sup>5</sup>; Di Masso R.<sup>6</sup>; Rozadas V.<sup>7</sup>

Instituto de Genética Experimental, Facultad de Cs. Médicas, UNR<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>; Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias Médicas, UNR<sup>5</sup> lucpag@hotmail.com

La inmunoección tumoral, consta de tres fases: eliminación (EL), equilibrio (EQ) 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, el tumor presenta 100% de toma. En algunos animales el tumor crece de forma exponencial (ES), en otros es eliminado (EL) y en un tercer grupo entra en estado de EQ, comportamiento asimilable a las tres etapas de la inmunoección. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el perfil inmunológico Th1/Th2 de los animales en los diferentes estadios ES, EQ y EL. Se desafiaron ratones CBI/L FS (N=52) en forma s.c. con M-406, se tomaron muestras de sangre en los distintos estadios de evolución tumoral y se determinó la concentración sérica de IL-2, INFγ (Th1) e IL-4, IL-10 (Th2) por un ensayo de ELISA. Los valores de IL-2 no mostraron diferencias en los distintos estadios; contrariamente, INF-γ fue significativamente mayor en ES comparado con EL y EQ (P<0,0001). La concentración sérica de IL-4 difirió significativamente entre todos los grupos siendo EL> EQ> ES (P<0,0001). Por otro lado, IL-10 fue mayor en EL comparado con EQ (P<0,05). Se observó un 58,3 % de animales con metástasis pulmonares en el grupo ES, en los cuales los niveles de IL-2 e IL-10 fueron menores que los observados para los animales sin metástasis (P<0,001). Los resultados obtenidos, sugieren que aunque los animales en ES muestran valores altos de INF-γ, comparados con EQ y EL, dichos valores no serían suficientes para contribuir al rechazo el tumoral. Por otro lado los niveles de citoquinas séricas Th2 si bien muestran diferencias, no permiten explicar los estadios de ES, EQ y EL, debiendo profundizar el estudio con otros marcadores relacionados con la respuesta inmune antitumoral.

### 637. (525) ACTIVACIÓN DIFERENCIAL Y MENOR FAGOCITOSIS DE CÉLULAS EPITELIALES APOPTÓTICAS DE GLÁNDULA SUBMAXILAR HUMANA POR CÉLULAS INMUNES DE PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN.

Hauk V.<sup>1</sup>; Fraccaroli L.<sup>2</sup>; Grasso E.<sup>3</sup>; Eimon A.<sup>4</sup>; Ramhorst R.<sup>5</sup>; Hubscher O.<sup>6</sup>; Perez Leiros C.<sup>7</sup>

Laboratorio de Inmunofarmacología, Dpto. Qca. Biológica, FCEN, UBA - CONICET<sup>1 2 3 5 7</sup>; Unidad de Reumatología, Dpto de Medicina, CEMIC<sup>4 6</sup> vchauk@qb.fcen.uba.ar

El Síndrome de Sjögren primario (SSp) es una enfermedad autoinmune crónica con prevalencia 0.5-1 % caracterizada por disfunción secretoria salival y lagrimal. La patogenia no ha sido aclarada y se propone que una pérdida de la homeostasis tisular en etapas tempranas con aumento de apoptosis de epitelio secretor predispone a la respuesta autoinmune. La fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos en un ambiente inmunosupresor es un proceso requerido para mantener la homeostasis tisular. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción de células mononucleares de sangre periférica (MNTs) de pacientes con SSp, en particular monocitos, con células epiteliales de glándula submaxilar humana (línea HSG) inducidas o no a apoptosis. MNTs de sangre periférica de 22 pacientes SSp y 10 controles fueron co-cultivados con células HSG inducidas o no a apoptosis con staurosporina, con contacto o usando insertos de 0,4um (transwells). La fagocitosis de HSG por monocitos (30-120 min) y la apoptosis se estudiaron por citometría de flujo con CFSE y anti-CD14 y la síntesis de citoquinas y quimioquinas por RT-qPCR. Observamos que la fagocitosis de células apoptóticas por monocitos es significativamente menor en pacientes con SSp respecto a los controles (media±ES (%), control 23,9±4,42 vs SSp 11,6±1,52 P<0,05). La cinética de fagocitosis fue más lenta en los SSp que en controles. Por otro lado, en el co-cultivo, los MNTs de pacientes SSp inducen un aumento significativo de marcadores inflamatorios y de migración en las HSG, con un aumento de IL-6 (P<0,05), TLR4 y MCP-1 entre otras moléculas, sin inducción de señales de apoptosis (expresión de Bax o exposición de anexina-V en superficie). Los resultados indican que los monocitos de pacientes con SSp presentan menor capacidad de fagocitar células secretorias apoptóticas, mientras que las MNTs de pacientes SSp inducen una activación del epitelio glandular con mediadores inflamatorios sin señales de apoptosis.

**638. (476) ESTUDIO IN VIVO DE LA INTERACCIÓN CELULAR ENTRE LA RESPUESTA INMUNE EN UN MODELO MURINO DE ADENOCARCINOMA DE MAMA.**

Cáceres J.<sup>1</sup>; Pagura L.<sup>2</sup>; Capello M.<sup>3</sup>; Rico M.<sup>4</sup>; Di Masso R.<sup>5</sup>; Rozados V.<sup>6</sup>

*Instituto de Genética Experimental-UNR<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
jmcaceres2000@gmail.com

El adenocarcinoma de mama M-406 surgió espontáneamente en una hembra de la línea CBI-IGE y desde entonces se lo mantiene in vivo por injertos intraperitoneales en su huésped singéneo, donde presenta 100% de letalidad. CBI es la línea testigo de un experimento de selección artificial por conformación corporal de la que derivan las líneas CBI- y CBI/L. Cuando ratones CBI- son desafiados con M-406 éste crece y regresa en el 100% de los individuos. El desafío de ratones CBI/L pone en evidencia tumores con crecimiento exponencial (ES), tumores en estado de equilibrio (EQ) y tumores en eliminación (EL). Con el objetivo de caracterizar el rol del sistema inmune en la tumorigénesis diferencial exhibida por estas líneas se llevó a cabo un ensayo de Winn. Se inocularon ratones CBI vía i.d. con suspensiones de células de bazo (7\*10<sup>6</sup> células/ml) de animales CBI- (G1, n=11) o CBI/L (G2, n=7) en EL junto con células de M-406 (4\*10<sup>5</sup> células/ml). Como Grupo Control (GC, n=14) se inocularon animales CBI con una suspensión de 4\*10<sup>5</sup> células/ml de M-406. El patrón de crecimiento tumoral se ajustó a un modelo exponencial creciente  $V_t = Y_0 * e^{(kt)}$ . La velocidad de crecimiento tumoral (k) y el Tiempo de duplicación tumoral (TDup=0,69/k) no mostraron diferencias significativas (P=0,146) entre grupos. El Tiempo de Latencia fue mayor en G2 (P=0,011), y mostró una asociación inversa con Y0 que fue significativamente mayor en GC que en G2 (P<0,05). Se observaron diferencias significativas en los tiempos de supervivencia (G2>G1>GC, P=0,001). Si bien el número de células tumorales inoculadas fue el mismo, su interacción con las células esplénicas de animales sensibilizados con el tumor determinaría diferencias en el número de células tumorales que efectivamente proliferan (Y0), hecho que se traduce en un mayor tiempo hasta que el tumor se torna detectable (latencia) sin afectar la velocidad de crecimiento tumoral posterior.

**639. (719) ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DEL RIESGO DE INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI EN ESCUELAS DE LA CIUDAD DE MAIPÚ. MENDOZA. ARGENTINA.**

Carrizo L.<sup>1</sup>; Salomón M.<sup>2</sup>; López Cavallotti M.<sup>3</sup>; Chiaramonte V.<sup>4</sup>; Tonelli R.<sup>5</sup>

*Área de Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo<sup>1 2 3 4 5</sup>*  
carrizolilianac@gmail.com

La enfermedad de Chagas es un serio problema de salud pública, Mendoza fue incluida por el INCOSUR en el grupo de provincias de alto riesgo de infección vectorial por poseer: a) casos agudos vectoriales notificados, b) un Índice de Infestación Domiciliaria (IID) mayor al 5%, sin cobertura de vigilancia activa o deficiente y c) prevalencia serológica en menores de 5 años superior al 5 %. Esta realidad ha sido considerada, tradicionalmente, como una problemática del área rural. Nos propusimos evaluar la situación epidemiológica real, respecto del riesgo de contraer la infección por Trypanosoma cruzi en niños de 6 y 12 años que asisten a escuelas urbanas y urbano marginales de la ciudad de Maipú. Se realizaron reuniones informativas dirigidas a la comunidad educativa en las que se entregó a los padres de los alumnos una encuesta de tipo semi-estructurada, en la que se les consultó respecto de diferentes aspectos referidos a su situación epidemiológica. Tales como: tipo de vivienda (de material o mixta), la observación del triatomino vector en la vivienda, familiares chagásicos, presencia domiciliar de gallineros y/o palomares, etc. El análisis de las encuestas determinó que un 59,47 % de la población estudiada presenta riesgo epidemiológico de contraer la infección por Trypanosoma cruzi, ya que respondieron en forma afirmativa uno o más ítems de la encuesta. Siendo la presencia de viviendas mixtas el factor que se presentó con mayor frecuencia, seguido por la observación domiciliar del vector y la convivencia con familiares chagásicos. Estos datos nos permiten inferir la necesidad de realizar una búsqueda activa de la infección por este parásito en escolares de estas áreas consideradas de bajo riesgo.

## NEFROLOGÍA 2

**640. (85) MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA PROGRAMACIÓN DE ALTERACIONES RENALES POR DEFICIENCIA DE ZINC EN RATAS DE AMBOS SEXOS.**

Juriol L.<sup>1</sup>; Veiras L.<sup>2</sup>; Gobetto M.<sup>3</sup>; Secchiari F.<sup>4</sup>; Costa M.<sup>5</sup>; Arranz C.<sup>6</sup>; Tomat A.<sup>7</sup>

*Cátedra de Fisiología, FFyB, UBA, IQUIMEFA CONICET<sup>1 2 3 4 5 6 7</sup>*

lorenajuriol@gmail.com

Previamente mostramos que la deficiencia prenatal de zinc reduce el número de nefrones y genera hipertrofia glomerular compensadora en la vida postnatal temprana, que programaría enfermedades renales e hipertensión arterial en la adultez. Objetivo: Estudiar los mecanismos relacionados con los cambios morfológicos renales inducidos por la deficiencia de zinc durante la vida fetal y la lactancia. Ratas Wistar recibieron durante la preñez y la lactancia: Dieta control (30 ppm zinc) o baja (8 ppm zinc) en zinc. Crías: macho control (MC), hembra control (HC), macho bajo (MB), hembra baja (HB). A los 21 días se determinó en riñón: N° células apoptóticas (NCA) por TUNEL, colágeno perivascular/área arteria renal (CP), área de la pared arterial músculo-elástica/área arteria renal (PME %) e indicadores del estrés oxidativo: especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS nmol/mg prot), actividad de catalasa (CAT pmol/mg prot), superóxido dismutasa (SOD U/mg prot) y glutatión peroxidasa (GPx pmol/min/mg prot). MB presenta mayor CP que su control. MB y HB muestran menor PME, mayores niveles de TBARS y menor GPx que sus controles. Solo en HB se observa menor actividad SOD y CAT que su control. No hay diferencias en el NCA entre los grupos. \*p<0.01 vs MC; †p<0.01 vs HC.n=10

	MC	MB	HC	HB
CP	0.79±0.04	1.05±0.08*	0.68±0.04	0.88±0.11
PME	87±1	79±1*	84±2	70±3†
NCA	20±4	24±4	28±5	29±5
TBARS	0,13±0,02	0,35±0,09*	0,14±0,01	0,45±0,07†
SOD	13,2±0,9	12,2±0,9	19,1±1,0*	12,1±0,9†
CAT	6,1±0,8	5,6±0,5	10,3±0,3*	4,1±0,7†
GPx	252±27	166±10*	264±26	177±17†

La deficiencia de zinc induce un aumento del estrés oxidativo renal en etapas tempranas del desarrollo, más evidente en las hembras. La hipotrofia vascular impediría un adecuado flujo renal ante cambios de perfusión renal. Estas alteraciones contribuirían a los cambios morfológicos renales previamente descritos.

#### 641. (187) PARTICIPACION DEL ACIDO 20-HIDROXIEICOSATETRAENOICO (20-HETE) EN EL EFECTO NATRIURÉTICO DE LA DOPAMINA (DA).

Nowicki S.<sup>1</sup>; Gonzalez D.<sup>2</sup>; Williams J.<sup>3</sup>; Roman R.<sup>4</sup>  
 CEDIE CONICET<sup>1,2</sup>; University of Mississippi Medical Center<sup>3,4</sup>  
 nowickisusana@hotmail.com

El 20-HETE, principal producto del metabolismo del ácido araquidónico por el citocromo P450A renal (CYP4A), interviene en el control de la homeostasis renal de sodio. Demostramos previamente su rol en la inhibición de la actividad de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa por la DA en células aisladas del túbulo proximal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la participación del 20-HETE en el efecto natriurético de la DA in vivo. Se utilizaron ratas Sprague Dawley controles ó tratadas con el inhibidor del CYP4A, 1-aminobenzotriazol (50 mg/kg, ip, 18h antes) ó el inhibidor selectivo de la síntesis de 20-HETE (N-hydroxy-N'-(4-butyl-2methylphenyl)formamidine (HET0016, 10 mg/kg/día, ip, 3 d); y ratas Dahl sal sensibles (Dahl s, cuya actividad de CYP4A y síntesis renal de 20-HETE es deficiente) ó ratas que expresan el gen CYP4A de la cepa Brown Norway sobre el fondo genético de ratas Dahl s (ratas SSBN5). Los animales anestesiados con tiopental fueron preparados para estudios de clearance. Se recogieron muestras de orina y plasma para la determinación de inulina, sodio y litio durante el período basal, y luego de 30 y 60 min de infusión con DA (1.5 ug/kg/min). Todos los efectos renales de la DA en ratas controles (incremento sobre el valor basal: Diuresis, V, 90%\*; Natriuresis, UNaV, 160%\*; Excreción Fraccional de sodio, EFNa, 184%\*; EFNa proximal 50%\*; EFNa distal 75%\*) fueron disminuidos en un 60-70% por ambos inhibidores de la síntesis de 20-HETE (# en todos los parámetros). La respuesta a la DA fue menor en ratas Dahl s respecto de ratas SSBN5 (incremento sobre el basal: V, 20% vs 60%\*##; UNaV, 75%\* vs 85%\*##, y fue revertida en ratas SSBN5 por el HET0016 (###). En ningún caso la DA modificó los valores basales de presión arterial ni filtrado glomerular. Nuestros resultados demuestran la participación del CYP4A en el efecto natriurético de la dopamina, a través de su producto 20-HETE. (\*p<0,05 vs basal; #p<0,05 vs control; ##p<0,05 vs Dahl s; ###p<0,05 vs SSBN5).

#### 642. (520) CAMBIOS EN EL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE LA NA<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPASA Y DOPAMINA RENAL EN RATAS HEMBRAS ENTERAS Y OVARIECTOMIZADAS CON INGESTA DE DIETA HIPERSÓDICA.

Di Ciano L.<sup>1</sup>; Azurmendi P.<sup>2</sup>; Toledo J.<sup>3</sup>; Oddo E.<sup>4</sup>; Levin G.<sup>5</sup>; Arrizurieta E.<sup>6</sup>; Ibarra F.<sup>7</sup>  
 Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari UBA<sup>1,2,3,4,6,7</sup>;  
 CEDIE-CONICET Hospital de Niños R Gutiérrez<sup>5</sup>  
 eldisi@yahoo.com.ar

Las ratas adultas ovariectomizadas (oVx) desarrollan hipertensión arterial luego de la ingesta de una dieta hipersódica (SAIC 2010). En este trabajo se estudia si el sistema dopaminérgico (DA) renal y la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa (NKA) participan en esta alteración. Para ello ratas Wistar oVx a los 60 días de vida y hembras intactas (HE) fueron estudiadas a los 150 días

de vida. Durante cinco días recibieron NaCl 1% en el agua de bebida (HS) y a la mitad, se les inyectó SCH 23390 (1 mg/kg SC en 24 hs) antagonista específico de receptores D1 de DA (D1R) o vehículo. Los controles basales fueron ratas E y oVx con dieta normosódica. Se determinaron presión arterial media (PAM), diuresis (V), natriuresis (ExNa<sup>+</sup>) y DA urinaria (ExDA). En homogenatos de corteza (C) y médula (M) renal se evaluó por WB la expresión total de la subunidad alfa 1 de la NKA (T-NKA) y su estado de fosforilación en Ser 23 (F-NKA). Se utilizó beta actina como control. Resultados en HS: la PAM fue mayor en oVx 135±4 vs HE 112±2 mmHg, p<0.05 y la ENa<sup>+</sup> mayor en HE 2,88±0,21 vs oVx 2,09±0,12 mmol/d/100g PC (p<0.05). La ExDA en HE y oVx fue similar. El V no fue diferente. El tratamiento con SCH en HE redujo la ENa<sup>+</sup> y el V a la mitad y aumentó la PAM a 140±2 mmHg, mientras que no modificó los valores de ENa<sup>+</sup>, V o PAM en oVx. La expresión de T-NKA no cambió con SCH o vehículo. La fosforilación de F-NKA fue mayor en HE, 66% en C y 20% en M, que en oVx (C 33% y M 15%). SCH 23390 revirtió la fosforilación de F-NKA en HE en 40% en C y 89% en M. En cambio en oVx solo revirtió un 5% en C. Estos resultados in vivo muestran que la ingesta HS provoca un cambio del estado de fosforilación de Ser 23 subunidad alfa 1 de F-NKA en HE en C y M en parte debido a la activación del sistema de DA renal y mediado por D1R. En contraste, a igual DA renal, las ratas oVx tienen una respuesta disminuida de F-NKA a la dieta HS y al bloqueo de D1R. Un defecto de D1R podría estar implicado en el desarrollo de hipertensión.

#### 643. (618) PARTICIPACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE DOPAMINA EN CÉLULAS DEL TÚBULO PROXIMAL DE RIÑÓN.

Acquier A.<sup>1</sup>; Tome J.<sup>2</sup>; Mori Sequeiros García M.<sup>3</sup>; Gómez N.<sup>4</sup>; Gorostizaga A.<sup>5</sup>; Paz C.<sup>6</sup>; Mendez C.<sup>7</sup>  
 Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Cátedra de Farmacología, Facultad de Odontología, UBA<sup>1,7</sup>; Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, UBA<sup>2,3,4,5,6</sup>  
 acquierandrea@gmail.com

En células de túbulo proximal de riñón, dopamina (DA) regula la actividad de la Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa con la participación de la proteína quinasa C (PKC) y de la quinasa ERK1/2. Dado que la reacción de metabolización de DA por acción de la monoaminoxidasa genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y que la activación de ERK1/2 por DA se reduce en presencia del antioxidante N-acetilcisteína, nuestro objetivo fue investigar si DA modifica los niveles intracelulares de especies reactivas del oxígeno (ROS) y si estas modificaciones generan una respuesta de los mecanismos de defensa antioxidante. Se utilizaron células de la línea OK (opossum kidney) y los niveles de ROS se midieron utilizando el sensor 2'7'-dichlorofluoresceína, la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y de catalasa (CAT) espectrofotométricamente y la de NFκB por luminiscencia luego de la transfección de las células con un plásmido conteniendo tres copias de la secuencia kB unidas al ADNc de luciferasa. DA (10-6M) produjo un aumento de los niveles de ROS con un máximo alrededor de 90 seg de incubación y un efecto dependiente de la concentración (p< 0,05) entre 10-12 y 10-8M. La preincubación de las células con rotenona (10-6M) o Ro-318220 (10-8M) abolió el efecto de DA mientras que PD98059 (5x10-5 M) no modificó el efecto. DA (10-6M, 15 min) produjo un aumento significativo de la actividad de SOD (control: 62±5; DA: 83±8 U/mg) pero no modificó la actividad de CAT (control: 480±10; DA: 510±40 nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg/min). DA (10-6M) produjo también un aumento significativo y dependiente del tiempo (p<0,01) de la actividad de NFκB, que fue abolido por la preincubación de las células con rotenona o con PD98059. Nuestros resultados demuestran que la incubación de células OK con DA resulta en una elevación de los niveles intracelulares de ROS generados a nivel mitocondrial por un mecanismo que involucra la acción de la PKC, en un incremento de la actividad de SOD y del factor de transcripción NFκB en cuya activación participa ERK1/2.

**644. (720) LA DEFORMACIÓN MECÁNICA INDUCE APOPTOSIS DE CÉLULAS TUBULARES PROXIMALES HK2 POR INHIBICIÓN DE LA ISOFORMA 1 DEL INTERCAMBIADOR DE NA<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, NHE1.**

Bocanegra V.<sup>1</sup>; Gil Lorenzo A.<sup>2</sup>; Rinaldi Tosi M.<sup>3</sup>; Cacciamani V.<sup>4</sup>; Benardon E.<sup>5</sup>; Vallés P.<sup>6</sup>  
*IMBECU; UNCuyo<sup>1 2 3 4 5 6</sup>*  
*mvbocanegra@gmail.com*

**Introducción:** La nefropatía obstructiva constituye la primera causa de fallo renal crónico en niños. La injuria mecánica por obstrucción incluye incremento de presión hidrostática intraluminal y dilatación tubular, un importante estrés por estimulación mecánica de las células tubulares renales que conduce a muerte celular por apoptosis y atrofia tubular. La apoptosis requiere acidificación del pH intracelular para la acción de Caspasas resultando crítico para la célula la actividad de NHE1, que intercambia un H<sup>+</sup> intracelular por un Na<sup>+</sup> extracelular regulando el pH intracelular y el volumen celular. La actividad del intercambiador podría estar influenciada por las MAPKs y la vía de RhoA. **OBJETIVO:** Evaluación temporal de la inducción apoptótica en

células tubulares proximales sometidas a deformación mecánica in vitro y participación de MAPKs y RhoA en la regulación de NHE1. **MÉTODO:** Se utilizaron células epiteliales tubulares proximales humanas immortalizadas, HK2 sometidas a stretch mecánico. Se analizó apoptosis con Anexina V por citometría de flujo y expresión de NHE1, Bcl2, Caspasa 3, ERK 1/2 y RhoA por western blot. **RESULTADOS:** Demostramos apoptosis de HK2 luego de 90 y 180 minutos de stretch mecánico siendo positivas para Anexina V en un 31 y 33% respectivamente en comparación con los controles. Observamos disminución significativa en la abundancia de la proteína antiapoptótica Bcl2 y aumento de Caspasa 3 asociada a reducción de la expresión de NHE1 en células HK2 sometidas a 90 y 180 minutos de stretch mecánico, precedido por activación de las vías de señalización ERK 1/2 y RhoA (15 y 30 minutos). **CONCLUSIÓN:** Las células HK2 luego de 90 y 180 minutos de stretch experimentan disminución de NHE1 e inducción de la vía mitocondrial de la apoptosis. La secuencia de eventos por los cuales la activación de las MAPKs regula la actividad de NHE1 indica que la activación temprana de ERK1/2 y de RhoA en HK2 participa en la fosforilación de NHE1 y su posterior downregulación.